

Université de Montréal

Activation du système du complément dans les syndromes coronariens aigus

11618293

par
Catherine Martel

Institut de Cardiologie de Montréal
Département de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine



Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences biomédicales

Décembre 2004

©Catherine Martel, 2004



W

4

U58

2005

v.094

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Identification des membres du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Activation du système du complément dans les syndromes coronariens
aigus**

Présenté par :

Catherine Martel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Gilles Latour, PhD
président-rapporteur

Dr Pierre Thérioux, MD
directeur de recherche

Dr Joël Lavoie, PhD
codirecteur de recherche

Dr Danielle Libersan, PhD
membre du jury

Mémoire accepté le:

Avant-propos

Malgré son implication dans les réactions inflammatoires et immunitaires, le système du complément demeure encore peu étudié dans la physiopathologie des syndromes coronariens aigus (SCA). Seules quelques études mettent en relation les SCA sans élévation du segment ST (NSTE-SCA) à l'électrocardiogramme (ECG), les syndromes les plus fréquents dans la maladie coronarienne, et l'activation du complément. Ayant comme principale hypothèse que le complément a une implication potentielle dans la déstabilisation de la plaque associée avec les SCA, les objectifs visés par ce mémoire furent donc 1) d'établir les modalités d'activation des différentes voies du complément dans les NSTE-SCA; 2) de quantifier l'activation du complément à différents temps; 3) de valider l'influence de la variation sérique de divers composants inflammatoires ou nécrotiques sur l'activité du complément.

La première partie du présent ouvrage propose un bref survol de la découverte du système du complément, de ses fonctions, de ses mécanismes d'activation et de régulation, des pathologies associées à sa déficience et des tests utilisés dans le diagnostic de ces pathologies et finalement de la corrélation existant entre l'activation du complément et les SCA.

La contribution originale documente une activation du système du complément chez les patients avec SCA sans élévation du segment ST à l'électrocardiogramme et ce indépendamment de la présence de nécrose cellulaire, bien que dans ce cas précis, la voie classique semble subir une activation additionnelle. Une nécrose cellulaire croissante entraînerait un signal inflammatoire plus prononcé, ce qui, de fait, tend à favoriser une activation totale du complément, ce dernier étant grandement impliqué dans le processus inflammatoire. On y rapporte aussi une corrélation entre les niveaux des marqueurs d'inflammation à l'étude (interleukine-6 [IL-6] et

protéine-C réactive [CRP]) et toutes les protéines activées du système, à l'exception de la forme soluble du complexe terminal, ce dernier étant responsable de la lyse des cellules par le complément. La dernière section comprend une discussion approfondie de la contribution centrale présentée dans ce document.

En somme, les éléments telles l'activation prononcée du complément dans les SCA, la discrimination évidente entre l'activation des voies proximales et de la voie terminale et la fonction irréfutable du complément dans l'immunité humorale et l'inflammation, consolident l'importance qu'occupe l'axe CRP-complément dans la physiopathologie de la plaque athérosclérotique active ainsi que le rôle attribué à la CRP dans l'athérosclérose et les SCA. Les projets découlant de cette étude permettront de soutenir l'amplitude du lien relativement peu exploré entre l'inflammation, l'immunité, la thrombose et l'apoptose puis pourront conduire à l'élaboration de nouvelles thérapies innovatrices apportant un contrôle plus fondamental de la maladie en phase aigue et en prévention secondaire.

Résumé de la contribution originale

Activation du système du complément dans les syndromes coronariens aigus sans élévation du segment-ST

Catherine Martel, Pierre Thérout, Richard Gallo, Marta Ghitescu,
The Minh Luong, Joël Lavoie

L'inflammation est étroitement reliée à la physiopathologie des SCA. Bien que le système du complément joue un rôle physiopathologique majeur dans l'inflammation et l'immunité, peu de recherches sont centralisées sur son implication dans les NSTEMI-SCA.

L'objectif principal de la contribution originale est de documenter une activation du système du complément chez des patients avec SCA sans élévation du segment ST. Cette activation est ensuite mise en relation avec la présence de nécrose cellulaire myocardique et l'inflammation. Au total, 108 individus (N= 108) ont participé à l'étude. De ce nombre figuraient 50 sujets sans maladie coronarienne connue, 25 patients avec maladie coronarienne stable (sCAD) et 33 patients diagnostiqués avec un SCA, dont 19 avec TnT élevées et 23 avec CRP élevées. Les concentrations plasmatiques des protéines sélectionnées judicieusement des voies classique (C3a, C4a), alterne (C3a, Bb) et terminale (C5a, sC5b-9) de même que les niveaux de troponine-T (TnT), CRP et IL-6 ont été mesurés.

Comparativement à la situation chez les sujets sains, les voies classique et alterne étaient activées chez les patients avec SCA (C3a: $p=0.003$; C4a: $p<0.001$; Bb: $p=0.001$) et la voie terminale était activée à la fois chez les patients avec sCAD (C5a: $p=0.005$; sC5b-9 : $p=0.009$) et avec SCA (C5a : $p=0.021$; sC5b-9 : $p<0.001$). Parmi les patients avec SCA, des TnT élevées ont été associées avec des niveaux plus élevés de C4a ($p=0.012$). Des niveaux élevés de CRP ont été corrélés avec toutes les protéines activées ($p<0.05$), à l'exception du complexe sC5b-9. Les niveaux des composants C3a, C4a, C5a et de la CRP se sont avérés plus élevés 48

heures après l'admission à l'hôpital comparativement au moment même de l'admission ($p < 0.05$).

En somme, toutes les voies du système du complément sont activées chez les patients avec SCA. La présence de nécrose cellulaire myocardique est associée avec une activation additionnelle de la voie classique alors que les concentrations de CRP ne sont pas proportionnelles à la formation du complexe terminal soluble (sC5b-9).

Mots clé: Syndrome coronarien aigu, système du complément, complexe d'attaque membranaire, anaphylatoxine, protéine-C réactive, troponine-T.

Résumé de la contribution originale (anglais)

Objective: To assess the activation of the complement system and its relation to presence of cell necrosis and inflammation markers in non-ST-segment acute coronary syndromes (NSTE-SCA).

Setting: Inflammation is closely linked to the pathophysiology of ACS. Although the complement system has major roles in inflammation and immunity, little is known on its implication in NSTE-ACS.

Design: Measurements of plasma concentrations of selected proteins of the classical (C3a, C4a), alternative (C3a, Bb) and terminal (C5a, sC5b-9) activation pathways, and of troponin T, (TnT), C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) levels.

Patients: A total of 108 individuals: 33 with ACS, 19 having elevated TnT and 23 elevated CRP levels, along with 25 patients with stable coronary artery disease (sCAD) and 50 normal controls.

Results: Compared with controls, all classical and alternative pathways were activated in ACS patients (C3a: $p=0.003$; C4a: $p<0.001$; Bb: $p=0.001$) and the terminal pathway activated in both ACS and stable CAD patients (C5a: $p=0.005$ and $p=0.021$, respectively; sC5b-9: $p=0.009$ and $p<0.001$, respectively). Among ACS patients, elevated TnT levels were associated with higher C4a levels ($p=0.012$). Higher CRP levels were correlated with all activated proteins ($p<0.05$), but not with sC5b-9. C3a, C4a, C5a and CRP levels increased from baseline to 48 hours after hospital admission ($p<0.05$).

Conclusions: The various complement pathways are activated in patients with an ACS. The presence of cell necrosis results in additional activation of the classical pathway whereas CRP levels are not proportionnal to the assembly of the sC5b-9 complex.

Key words: Acute coronary syndrome, complement, membrane attack complex, anaphylatoxin, C-reactive protein

Table des matières

Identification des membres du jury.....	ii
Avant-propos.....	iii
Résumé de la contribution originale.....	v
Résumé de la contribution originale (anglais).....	vii
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	x
Liste des tableaux associés à la contribution originale.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des figures associées à la contribution originale.....	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xii
1 Introduction.....	1
1.1 Historique.....	1
1.2 Fonctions du système du complément.....	2
1.2.1 Fonctions des anaphylatoxines (C3a, C4a, C5a).....	3
1.2.2 Fonctions des opsonines (C3b, C4b).....	4
1.2.3 Fonctions des fragments Bb et Ba.....	5
1.2.4 Fonctions du CAM.....	6
1.3 Activation du complément.....	9
1.3.1 La voie classique.....	9
1.3.1.1 Les activateurs de la voie classique.....	9
1.3.1.1.1 Les immunoglobulines, principes généraux.....	9
1.3.1.1.2 La protéine C-réactive.....	11
1.3.1.1.3 La protéine amyloïde A sérique.....	12
1.3.1.1.4 Les cellules apoptotiques.....	14
1.3.1.1.5 Produits de dommages myocardiques.....	14
1.3.1.1.6 Facteur néphritique C4, myéline, complexe héparine-protamine.....	15
1.3.2 La voie alterne.....	16
1.3.2.1 Principes généraux; activation spontanée de faible intensité.....	16
1.3.2.2 Les activateurs de la voie alterne.....	17
1.3.2.2.1 Amplification par la voie classique.....	17
1.3.2.2.2 Substances naturelles.....	19
1.3.2.2.3 Complexes immuns IgA.....	19
1.3.3 La voie lectine.....	19

1.3.3.1	Activateurs de la voie lectine	20
1.3.4	La voie terminale	21
1.3.4.1	Principes généraux.....	21
1.3.4.1.1	Initiation de la cascade finale	21
1.3.4.1.2	Formation du complexe d'attaque membranaire	22
1.4	La régulation du complément.....	24
1.4.1	La dégradation naturelle.....	24
1.4.2	Les protéines régulatrices.....	25
1.4.2.1	Les protéines régulatrices membranaires.....	27
1.4.2.2	Les protéines régulatrices solubles	28
1.4.3	Régulation de la clairance des CAM	32
1.5	Activation du complément et pathologies.....	33
1.5.1	Déficiences en complément.....	33
1.5.2	L'athérosclérose	36
1.5.2.1	L'activation du complément dans l'athérosclérose.....	38
1.5.3	Les syndromes coronariens aigus (SCA).....	39
1.5.3.1	L'activation du complément dans les SCA	43
1.5.3.2	Traitement des NSTEMI-SCA.....	44
1.5.3.3	L'activation du complément dans le traitement des SCA.....	46
1.6	Thérapies anti-complément.....	47
1.7	Interrogations non résolues	52
2	Hypothèses et objectifs.....	55
3	Contribution originale (article).....	56
4	Discussion.....	85
5	Conclusion	93
6	Références.....	96

Liste des tableaux

Tableau I. Les effets des anaphylatoxines C3a, C4a et C5a.....	4
Tableau II. Résumé des principaux effets biologiques du complément.....	8
Tableau III. Fragments homologues fonctionnels et structuraux des différentes voies d'activation.	21
Tableau IV. Régulateurs membranaires et solubles de l'activation du complément.....	26
Tableau V. Déficiences en complément et pathologies associées.....	34
Tableau VI. Tests diagnostiques utilisés dans le but de détecter une déficience en complément.....	35
Tableau VII. Thérapies utilisées dans le traitement des NSTEMI-SCA.....	45
Tableau VIII. Cibles et thérapies relatives à l'inhibition de l'activité du complément.....	51

Liste des tableaux associés à la contribution originale

Tableau I. Caractéristiques générales des trois groupes de sujets à l'étude.....	78
Tableau II. Comparaison des niveaux des protéines activées du complément et des marqueurs de l'inflammation, au prélèvement de base et 48 heures après, chez 33 patients avec SCA.....	79
Tableau III. Comparaison des niveaux des protéines activées du complément et de la CRP entre les patients sains, les patients avec maladie coronarienne stable et les patients avec SCA	80
Tableau IV. Corrélation entre les niveaux des protéines activées du complément chez les patients avec maladie coronarienne stable (n=25) et avec SCA (n=33).....	81

Liste des figures

Figure 1. Activation et régulation du système du complément.	13
Figure 2. C3b: fragment central.....	18
Figure 3. Assemblage du complexe d'attaque membranaire (CAM).	23
Figure 4. Mécanismes de régulation de la voie alterne.	31

Liste des figures associées à la contribution originale

Figure 1. Niveaux plasmatiques des protéines activées du complément chez des individus normaux, avec maladie coronarienne stable et avec SCA sans élévation du segment ST.....	82
Figure 2. Niveaux plasmatiques des protéines activées du complément chez des patients avec SCA sans élévation du segment ST (TnT > 0.03 ug/l).....	83
Figure 3. Corrélation entre les niveaux de CRP et ceux des protéines des diverses voies d'activation du complément.....	84

Liste des sigles et abréviations

(Lorsque l'abréviation réfère à un terme anglais, ce dernier est inscrit en italique)

Ac :	Anticorps
ACE :	<i>Angiotensin-converting enzyme</i> ; enzyme de conversion de l'angiotensine
ACS :	<i>Acute coronary syndrome</i> ; Syndrome coronarien aigu
Ag :	Antigène
Apo :	Apolipoprotéine
AP50 :	<i>Alternative pathway 50%</i> ; Test représentant 50% de l'activité hémolytique du complément, générée par une activation de la voie alterne
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
Ba :	Produit d'activation de la voie alterne
Bb :	Produit d'activation de la voie alterne
BCX-1470 :	Inhibiteur de protéases sériques qui bloque l'activité hémolytique des enzymes C1s et facteur D du complément
C1 :	Premier composant de la voie classique du complément
C1qrs :	Premier complexe (C1) activé de la voie classique du complément
C1INH :	Inhibiteur du complexe C1 de la voie classique
C1s-INH-248 :	Inhibiteur synthétique du C1s
C2 :	Composant 2 du complément
C3 :	Composant 3 du complément
C4 :	Composant 4 du complément
C5 :	Composant 5 du complément
C6 :	Composant 6 du complément, deuxième composant du complexe lytique

C7 :	Composant 7 du complément, troisième composant du complexe lytique
C8 :	Composant 8 du complément, quatrième composant du complexe lytique
C9 :	Composant 9 du complément, dernière composant du complexe lytique
C2a :	Plus petit produit d'activation de la protéine C2
C3a :	Plus petit produit d'activation de la protéine C3
C4a :	Plus petit produit d'activation de la protéine C4
C5a :	Plus petit produit d'activation de la protéine C5
C2b :	Plus gros produit d'activation de la protéine C2
C3b :	Plus gros produit d'activation de la protéine C3
C4b :	Plus gros produit d'activation de la protéine C4
C5b :	Plus gros produit d'activation de la protéine C5, premier composant du complexe lytique
C4bBP :	<i>C4b binding protein</i> ; protéine de liaison du fragment C4b
C4b2a :	C3 convertase de la voie classique
C3bB :	C3 convertase de la voie alterne
C4b2a3b :	C5 convertase de la voie classique
C3bBb :	C5 convertase de la voie alterne
C3NF :	<i>C3 nephretic factor</i> , facteur néphritique C3
C4NF :	<i>C4 nephretic factor</i> , facteur néphritique C4
C8BP :	<i>C8 binding protein</i> ; protéine de liaison du fragment C8
CAB-2 :	<i>Combined activation blocker-2</i> ; molécule chimérique soluble qui engendre des activités inhibitrices
CABG :	<i>Coronary artery bypass graft</i> ; greffe de déviation de l'artère coronaire
CAM :	Complexe d'attaque membranaire
CD35 :	Récepteur des fragments C3b et C4b, protéine régulatrice

	membranaire du complément (CR1)
CD46 :	Cofacteur protéique membranaire (MCP)
CD55 :	Facteur accélérateur de la dissociation (DAF)
CD59 :	Inhibiteur membranaire de lyse réactive (protectine), MIRL
CD34+ :	Cellules endothéliales primitives
CH50 :	<i>Complement hemolytic 50%</i> :Test représentant 50% de l'activité hémolytique du complément, générée par une activation totale du complément
CK-MB :	Créatinine-kinase MB
CR1 :	<i>Complement receptor 1</i> ; Récepteur 1 du complément
CR2 :	<i>Complement receptor 2</i> ; Récepteur 2 du complément
CR3 :	<i>Complement receptor 3</i> ; Récepteur 3 du complément
CRP:	<i>C-reactive protein</i> ; protéine C-réactive
CS :	Cellule spumeuse
CVF :	<i>Cobra venom factor</i> , facteur venin de cobra
DAF :	<i>Decay acceleration factor</i> , facteur accélérateur de la dissociation
ECG :	Électrocardiogramme
E.Coli :	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA :	<i>Ethyle Diamine Tetraacetic Acid</i> ; chélateur de calcium
EGF :	Epidermal growth factor; facteur de croissance
LDL :	Low density lipoprotein; lipoprotéine de faible densité
E-LDL :	<i>Enzymatically remodeled LDL</i> ; LDL enzymatiquement modifiés
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay; principe de détection de protéines basé sur l'interaction anticorps/antigène
fB :	Facteur B, composant du complément
fI :	Facteur I, composant du complément
fH :	Facteur H, composant du complément
fD :	Facteur D, composant du complément
FACS :	<i>fluorescence-activated cell sorter</i> , méthode de tri cellulaire par

	fluorescence
Fut-175 :	<i>Futhan, Nafamostat Mesilate</i> ; inhibe l'activation <i>ex vivo</i> du complément
GlcNAc :	N-Acétyleglucosamine
HANE :	<i>Hereditary angioneurotic edema</i> ; Œdème angioneurotique héréditaire
HRF :	<i>C8 binding protein</i> ; protéine de liaison du fragment C8
HSP :	<i>Heat shock protein</i> ; protéine de choc thermique
HUS :	<i>Hemolytic uremic syndrome</i> ; syndrome hémolytique et urémique
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
IM :	Infarctus du myocarde
LES :	Lupus érythémateux systémique
LMWH :	<i>Low molecular weight heparin</i> ; héparine à faible poids moléculaire
LPS :	Lipopolysaccharides
MAC :	<i>Membrane attack complex</i> ; complexe d'attaque membranaire
MASP :	<i>MBL Associated Serine Protease</i> ; protéase sérique associée au MBL
MBL :	<i>Mannose binding lectin</i> ; lectine qui se lie aux structures mannoses
MCP :	<i>Membrane cofactor protein</i> ; cofacteur protéique membranaire (CD46)
MCP-1 :	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> ; protéine montrant une chimiotaxie spécifique pour les monocytes
MI :	Myocardial infarction
MMP :	Métalloprotéase matricielle
NSTE-SCA :	<i>Non ST-elevation acute coronary syndrome</i> ; Syndromes coronariens aigus sans élévation du segment ST

NSTEMI :	<i>Non ST-elevation myocardial infarction</i> ; Infarctus du myocarde sans élévation du segment ST
PCI :	<i>Percutaneous coronary intervention</i> ; angioplastie primaire
PCh :	Phosphocholine
PDGF :	<i>Platelet-derived growth factor</i> , Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEG :	Polyéthylène Glycol, tests qui permettent de détecter les complexes immuns circulants
PNH :	<i>Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria</i> ; Hémoglobinurie paroxystique nocturne
Protéine s :	Vitronectine
RCA :	Regulators of complement activity; régulateurs de l'activité du complément
RID :	<i>Radial immunodiffusion</i> , immunodiffusion radiale
sC5b-9 :	CAM soluble, complexe terminal de la cascade d'activation du complément
SA :	<i>Stable angina</i> ; Angine stable
SAA :	Sérum amyloïde A
SAP :	Sérum amyloïde P
SCA :	Syndrome coronarien aigu
sCAD :	<i>Stable coronary artery disease</i> ; maladie artérielle coronarienne stable
sCR1 :	<i>Soluble complement receptor 1</i> ; Forme soluble du Récepteur 1 du complément
STEMI :	<i>ST-elevation myocardial infarction</i> ; Infarctus du myocarde avec élévation du segment ST
TNF- α :	<i>Tumor necrosis factor α</i> ; Facteur de nécrose tumorale α
Tn-T :	Troponine-T
UA :	<i>Unstable angina</i> ; angine instable

1 Introduction

1.1 Historique

Par sa définition d'origine, le système du complément est composé d'une série de protéines qui travaillent en complémentarité avec les anticorps (Ac) dans la destruction des bactéries. Le complément est un puissant système de défense dont les protéines sont présentes dans le sérum sous forme inactive. Connue comme étant un des joueurs principaux dans l'immunité, ce système permet la lyse des cellules indésirables sans même nécessiter la présence des cellules tueuses. Il y a plus d'un siècle, Jules Bordet avait mis au point un système expérimental pouvant caractériser l'activité lytique du complément. C'est à l'Institut Pasteur de Paris qu'il a démontré que l'antisérum contre la bactérie *Vibrio cholerae* provoquait la lyse des bactéries et que le chauffage de l'antisérum faisait disparaître son activité bactériolytique. Il avait alors mélangé du sérum chauffé avec le sérum frais qui ne contenait pas d'anticorps dirigés contre la bactérie et qui était donc incapable de tuer par lui-même la bactérie. Étonnamment, la capacité à lyser les bactéries réapparaissait dans le sérum chauffé. À la lueur de ces observations, Bordet a conclu que l'activité bactériolytique nécessitait à la fois des anticorps bactériens spécifiques qui supportent le chauffage et un second composant sensible à la chaleur, responsable de l'activité lytique. D'un tel système totalement expérimental naissait le test de l'activité hémolytique du complément. Il avait alors nommé la substance responsable de cette activité l'*alexine*, du Grec *Alexein* qui signifie «éviter une maladie»¹. Quelques années plus tard, c'est au tour de Paul Ehrlich d'effectuer indépendamment des expériences et d'irradier le terme *alexine* pour forger le terme *complément*, le définissant comme «l'activité du sérum sanguin qui complète l'action de l'anticorps»².

1.2 Fonctions du système du complément

Le complément est un des systèmes les plus puissants impliqués dans la défense de l'organisme (Figure 1)^{3,4}. Il est un des systèmes les plus sophistiqués, jouant un rôle majeur dans la défense de l'organisme tant par son importance dans l'immunité innée qu'acquise. Il se compose d'une trentaine de protéines plasmatiques solubles et membranaires majoritairement synthétisées par les hépatocytes mais aussi par l'endothélium vasculaire, les adipocytes, les fibroblastes de la peau, les monocytes du sang et les macrophages tissulaires. Ces protéines sont présentes dans le sang sous formes inactives. Certaines substances, comme les lipopolysaccharides (LPS), viennent augmenter grandement les niveaux des ARNm des différents composants du complément produits par les hépatocytes. En masse, ces proenzymes constituent 15 pour cent des globulines sériques totales. Ces composants interagissent entre eux en agissant soit comme enzymes ou simplement comme protéines de liaison. Ce système compte aussi une dizaine de récepteurs cellulaires membranaires qui sont spécifiques aux différents fragments physiologiques du complément et qui sont présents sur plusieurs types de cellules, dont les cellules inflammatoires et les cellules du système immunitaire^{5,6}. Il existe aussi à l'intérieur de ce même système plusieurs protéines membranaires dites régulatrices qui protègent l'hôte contre une sur-activation du complément^{7,8}. Ensemble, toutes ces protéines interagissent, au sein d'une cascade hautement régulée, pour accomplir des activités physiologiques distinctes. Aussitôt qu'une proenzyme est clivée, son site actif devient exposé grâce à l'élimination du fragment inhibiteur qui lui était attaché. Cette protéine ainsi activée devient donc un catalyseur pour la prochaine étape de la cascade, d'où l'expression «cascade d'activation». Les effets biologiques du complément se produisent par l'entremise de ses divers récepteurs et par les signaux induits par le complexe d'attaque membranaire (CAM). Parmi les

activités dirigées par le complément, on dénote principalement la lyse des cellules étrangères, l'opsonisation et la capture d'antigènes particulaires, l'activation de la réponse inflammatoire suivie de la sécrétion de molécules qui amplifient ou modifient les réponses immunitaires spécifiques et finalement, l'élimination des complexes immuns circulants et des produits de réactions inflammatoires (i.e. cellules apoptotiques et nécrotiques) par la rate ou le foie.

1.2.1 Fonctions des anaphylatoxines (C3a, C4a, C5a)

Parmi les éléments intermédiaires de grande importance siégeant dans la cascade du complément, on retrouve les fragments C3a, C4a et C5a, aussi appelés anaphylatoxines (Tableau I). Ces produits de coupure du complément servent d'importants médiateurs de l'inflammation. Ces anaphylatoxines se lient à des récepteurs situés à la surface des mastocytes et des basophiles dans le but d'induire une dégranulation et une relâche d'histamine et d'autres médiateurs de l'inflammation. Ces trois mêmes protéines induisent aussi une contraction des cellules musculaires lisses de même qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les produits C3a et C5a entraînent l'agrégation des plaquettes ainsi que, de concert avec le complexe C5b67, l'extravasation et la chimiotaxie des neutrophiles et monocytes au site d'action du complément, soit sur les cellules endothéliales vasculaires. L'extravasation est le phénomène dans lequel les leucocytes passent à travers la paroi non interrompue d'un vaisseau pour se rendre dans les tissus ciblés. Plusieurs auteurs décrivent la protéine C5a, l'anaphylatoxine majeure, comme étant la seule à pouvoir provoquer la libération des enzymes hydrolytiques des neutrophiles tout en favorisant l'expression intensifiée des récepteurs du complément de type 1 et de type 3 (CR1 et CR3) sur ces derniers^{9,10}. Tout ce processus a donc pour but de permettre une infiltration des fluides dits inflammatoires qui transportent des anticorps et des cellules phagocytaires vers le site où se localisent les antigènes (Ag).

Cible	Effet
Cellules musculaires lisses	Contraction
Mastocytes	Libération d'histamine
Paroi des capillaires sanguins	Augmentation de la perméabilité vasculaire
Endothélium vasculaire	Augmentation de l'adhésion des leucocytes
Leucocytes	Adhésion
	Agrégation
	Chimiotaxie
	Libération d'enzymes lysosomiales
	Génération de radicaux d'oxygène
Plaquettes	Agrégation
	Libération de sérotonine
Réponse immune	Suppression/Augmentation de la réponse immune

Tableau I. Les effets des anaphylatoxines C3a, C4a et C5a.

1.2.2 Fonctions des opsonines (C3b, C4b)

Les deux fragments les plus volumineux provenant du clivage du C3 et du C4 sont des opsonines, c'est-à-dire qu'elles provoquent la phagocytose des antigènes en se liant à ces derniers. Ces protéines, les C3b et C4b, permettent de capturer les antigènes en les incluant dans une petite partie de la membrane plasmique qui s'invagine puis se referme sur elle même pour former une vésicule intracellulaire contenant le matériel ingéré. Le C3b est l'opsonine majeure du complément. Lors de l'activation du complément, les niveaux de ce fragment sont amplifiés à cause de la présence d'une boucle de rétroaction positive impliquant le C3. Dans un premier temps, les fragments C3b recouvrent les complexes immuns et les antigènes particuliers. Par la suite, les cellules phagocytaires et certaines autres cellules exprimant des récepteurs du complément se lient aux opsonines. Dans le cas où les cellules porteuses du CR1 sont des phagocytes,

(monocytes, macrophages ou neutrophiles), la phagocytose est intensifiée. Par conséquent, l'opsonisation des antigènes particuliers par le C3b et le C4b augmente grandement leur phagocytose¹¹.

Le C3b permet aussi la neutralisation virale¹²⁻¹⁴. En neutralisant, on cherche à réduire le nombre global de virus. En facilitant la formation de gros agrégats de virus, le C3b contribue à diminuer ce nombre. De fait, il a été démontré que, *in vitro*, lorsqu'on ajoutait du sérum contenant du C3 activé au virus de la poliomyélite recouvert d'anticorps, il y avait neutralisation¹⁵.

Un dernier rôle majeur joué par les opsonines, particulièrement le C3b, est la solubilisation et l'élimination des complexes immuns¹⁶⁻¹⁸. Chez les personnes souffrant de maladies auto-immunes, de grandes quantités de complexes immuns sont produites. Des études ont démontré qu'un déficit en complément interférerait avec la solubilisation et l'élimination efficace des complexes immuns^{19,20}. Les transporteurs par excellence de ces complexes sont les globules rouges. Avec leur petite masse et leur grand nombre, les érythrocytes possèdent environ 90 pour cent de la totalité des CR1 du sang. Ces cellules lient facilement les complexes immuns circulants enrobés de C3b et les transportent vers le foie et la rate au contact des macrophages résidents. Ces derniers, possédant beaucoup plus de récepteurs CR1 que les globules rouges, prennent alors en charge les complexes immuns, les phagocytent et les détruisent.

1.2.3 Fonctions des fragments Bb et Ba

Tel que nous le verrons dans les sections suivantes, la voie alterne conserve, à l'état basal, une activation stable, quoique faible, dans l'organisme. Cette perpétuelle activation est le résultat de l'hydrolyse du groupe thioester de la molécule C3. La molécule ainsi formée est la C3 (H₂O). Cette mince activation s'avère essentielle puisqu'elle permet à la molécule C3 d'être continuellement fonctionnelle et ainsi prête et disponible à une éventuelle réaction avec des pathogènes. Une autre raison majeure

décrivant l'utilité d'une telle activation est certes la courte demi-vie de la forme active et fonctionnelle de C3. Lorsqu'elle devient hydrolysée, la molécule de C3 est apte à se lier à la sous-unité catalytique de la voie alterne, le facteur B. Le facteur B est alors activé puis clivé par une protéase sérique, le facteur D, dans le but de former le fragment protéolytique Bb (66 kDa) et le fragment Ba (33 kDa). Le fragment Ba s'éloigne par diffusion alors que le fragment Bb participe à la formation de la C3 convertase de la voie alterne (C3bBb). Alors que le fragment Ba joue un rôle semblable aux anaphylatoxines en favorisant la chimiotaxie des neutrophiles, le fragment Bb favorise l'adhésion et la migration des monocytes et macrophages vers le foyer inflammatoire local.

1.2.4 Fonctions du CAM

Le dernier acteur de la longue cascade du complément est le CAM. Le CAM est avant tout reconnu pour sa capacité à provoquer la lyse cellulaire²¹. La formation et l'assemblage de ce complexe seront décrites plus en détail dans les prochaines sections. Globalement, le fragment activé C5b se lie respectivement aux fragments C6, C7 et C8. Le complexe ainsi formé catalyse la polymérisation du composant C9. L'assemblage de ce complexe permet la formation du CAM. Parce que l'enveloppe virale ressemble étroitement à la membrane plasmique de la cellule de l'hôte infecté, le CAM y forme facilement des pores. Ce sont donc les bactéries possédant une mince couche de peptidoglycanes qui seront grandement affectées. En fait, la plupart des bactéries Gram-négatives, sont sensibles à la lyse dirigée par le complément. Plusieurs types de mécanismes d'évasion des bactéries justifient ces exceptions. Par exemple, les longues chaînes latérales polysaccharidiques du LPS des parois cellulaires de souches résistantes de différentes bactéries, telles *E.Coli* et *Salmonella*, préviendraient l'insertion du CAM dans la membrane bactérienne. Chez les souches résistantes de *Neisseria gonorrhoeae*, une protéine de la membrane externe permet à la

bactérie d'échapper aux effets du complément. Cette protéine interagit avec le CAM et l'empêche ainsi de s'insérer dans la membrane bactérienne. Les bactéries gram-positives, quant à elles, sont généralement résistantes à l'insertion du complexe dans leur membrane interne grâce à leur épaisse paroi de peptidoglycanes. La capsule bactérienne de ces bactéries favorise aussi cette résistance en agissant comme barrière physique entre le C3b de la surface de la membrane bactérienne et le CR1 des cellules phagocytaires. Ainsi, l'élimination de complexes immuns par le C3b s'avère nettement moins efficace. Les cellules nucléées sont plus résistantes face à cette action que les érythrocytes. Alors qu'un seul CAM peut lyser un globule rouge du sang, de multiples CAM sont nécessaires pour percer la membrane des cellules nucléées.

Que ce soit par la lyse cellulaire, la réponse inflammatoire, l'opsonisation de l'antigène ou la neutralisation virale, le système du complément joue un rôle important dans la défense de l'organisme (Tableau II). Grâce à ce système, la réponse humorale est amplifiée et permet la destruction des agents envahisseurs, tels les micro-organismes et les virus. Bien que la formation du CAM soit la dernière étape de la cascade du système du complément, une grande part de l'importance physiologique de ce dernier réside par ses produits intermédiaires, générés lors de l'initiation de son activation²².

Fonction	Description
Opsonisation	Le fragment C3b et, à degré moindre, le C4b, sont des opsonines. L'opsonisation permet une augmentation de la phagocytose des particules par l'intermédiaire d'une liaison aux récepteurs du complément.
Inflammation	Majoritairement le fragment C5a, mais aussi le C4a et le C3a, sont des activateurs inflammatoires importants qui augmentent la perméabilité vasculaire, le recrutement et l'activation des leucocytes.
Lyse	Le fragment activé C5b se lie respectivement aux fragments C6, C7 et C8. Le complexe ainsi formé catalyse la polymérisation du composant C9. L'assemblage de ce complexe permet la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM). Ce complexe entraîne la lyse des cellules ciblées.
Élimination des complexes immuns	Le complément a un rôle important dans la solubilisation et l'élimination des complexes immuns de la circulation. Les protéines activées C4b et C3b sont des molécules liées de façon covalente aux complexes immuns. La liaison de l'une ou l'autre de ces molécules aux complexes immuns permet aux macrophages du foie ou de la rate d'éliminer efficacement les complexes immuns circulants.

Tableau II. Résumé des principaux effets biologiques du complément.

1.3 Activation du complément

Le système du complément peut être activé par trois différentes voies qui convergent en un même point, soit le clivage du fragment C3. Un des fragments ainsi produit, le C3b, s'avère être la molécule effectrice la plus importante de ce système. Ces trois voies sont la voie classique, la voie alterne et la voie lectine. La voie terminale, celle qui clôture l'activation du système du complément, se définit par la formation du CAM aussi appelé complexe lytique. (Figure 1)

1.3.1 La voie classique

La première voie à avoir été découverte est la voie classique^{23,24}. Son activité est généralement enclenchée par un mécanisme impliquant des complexes immuns mais peut aussi être initiée par des complexes non-immuns. Les principaux activateurs de ce type connus à ce jour sont les cellules apoptotiques membranaires, les produits de dommages myocardiques (produits de la nécrose), le sérum amyloïde A (SAA), la protéine C-réactive (CRP), le facteur néphritique C4 (C4NF) et la myéline.

1.3.1.1 Les activateurs de la voie classique

1.3.1.1.1 *Les immunoglobulines, principes généraux*

Le premier mécanisme initiateur à avoir été découvert est la liaison, à la surface cellulaire, d'un complexe anticorps/antigène ou d'immunoglobulines (IgG ou IgM) au complexe C1 (C1q₂r₂s₂), lequel se compose d'une molécule C1q, deux molécules C1r et deux molécules C1s^{25,26}. Les molécules C1r et C1s sont des protéases. La molécule C1 fait partie de la famille des collectines car elle est constituée d'un domaine de

type collagène et d'un domaine lectine. On dit de la voie classique qu'elle découle d'une immunité spécifique parce que les anticorps de classes spécifiques, formés en réponse à la stimulation antigénique, sont capables d'activer cette voie. La formation de ce complexe est sous la dépendance du calcium: sans la présence du calcium, les unités du complexe C1 se dissocient les unes des autres et la cascade d'activation ne peut s'initier. Lorsque la région variable (portion Fab) des IgG ou des IgM se lie à un antigène, la conformation de la région constante (portion Fc) de ces immunoglobulines est altérée. Cette altération permet au C1q de se lier à l'immunoglobuline. Pour être activé et initier la cascade, le C1q doit se lier à un minimum de deux (2) régions Fc des immunoglobulines. Par conséquent, deux molécules d'IgG sont nécessaires à l'activation du C1q. Les IgM sont d'excellents sites de fixation car une seule molécule de ce pentamère possède cinq (5) régions constantes, donc plusieurs sites de fixation pour le C1q²⁷. La liaison de C1q à l'immunoglobuline active la protéase C1r, lequel permet un changement de conformation du C1s dans le but de l'activer. Les IgG sont des monomères qui possèdent un seul site de fixation de C1q. Contrairement aux IgM, une seule molécule de IgG n'est pas suffisante pour changer la conformation du C1q et initier l'activation du complément. L'efficacité des IgG à activer le complément apparaît dans l'ordre IgG₃ > IgG₁ > IgG₂. La molécule IgG₄ ne fixe tout simplement pas le complément.

L'activité du complexe C1 est régulée par le fragment C1 estérase inhibiteur (C1 INH), qui se lie aux différentes protéines du complexe pour les inactiver de façon permanente et nécessite la présence d'ions calciques. La proenzyme C1s clive d'abord le fragment C4 en C4a et C4b. La protéine active C4a est un peptide médiateur de l'inflammation, c'est-à-dire une anaphylatoxine, qui ne participe pas directement à la cascade du complément. La portion C4b aura pour rôle de se lier et de cliver le fragment C2 en C2a et C2b. Le complexe enzymatique C4b2a ainsi formé devient le complexe portant l'activité C3 convertase de la voie classique. La portion C2b

s'éloigne par diffusion. La C3 convertase (C4b2a) de la voie classique convertit la proenzyme C3 en une forme enzymatique active (C3b) et en anaphylatoxine (C3a). Pour être fonctionnelle, cette C3 convertase nécessite la présence de magnésium et tend à devenir de moins en moins active avec le temps et ce à température physiologique. Une seule molécule de cette C3 convertase de la voie classique clive environ 1000 molécules de C3 en C3b. La liaison de C4b2a avec C3b forme le complexe C4b2a3b, aussi appelé C5 convertase, une opsonine majeure. Ce complexe enzymatique hétérotrimérique a pour fonction de cliver le fragment C5 en deux autres composants. Le premier, le C5a, est une anaphylatoxine et aussi le fragment soluble le plus important du système alors que le second, le C5b, est le premier composant du CAM.

1.3.1.1.2 La protéine C-réactive

Des mécanismes indépendants des anticorps peuvent aussi initier la voie classique. La protéine C-réactive (CRP), marqueur classique de l'inflammation, en est un exemple. En plus d'être un excellent marqueur de l'inflammation, la CRP est étroitement reliée à l'athérogenèse. La CRP est présentement fréquemment mesurée dans le but de prédire des événements coronariens indésirables, incluant les IM et la mort. Des niveaux modérément élevés de CRP sont associés avec pronostiques cardiovasculaires défavorables chez des patients sans maladie coronarienne préalablement connue. Cette protéine peut directement lier le C1q pour initier la cascade du complément par la voie classique et ce, sans la présence d'anticorps^{28,29}. La CRP est une protéine de phase aigue qui est régulée au niveau transcriptionnel par l'interleukine-6. Elle est composée de cinq sous-unités identiques mais non liées covalentiellement. La CRP possède une grande spécificité de liaison dépendante du calcium à la phosphocholine (PCh) ainsi qu'aux résidus de PCh des polysaccharides bactériens, ce qui lui permet de reconnaître une large gamme de cibles pathogènes, comme les membranes

des cellules endommagées et nécrotiques de l'hôte. La CRP se lie aussi aisément aux têtes polaires des PCh situées sur la membrane des phospholipides de même qu'à certains constituants nucléaires qui peuvent ne pas contenir de PCh. Le complexe multivalent formé par le ligand et de la CRP est reconnu par la fraction C1q du complément. Le C1q contient autant de sites de liaison à la CRP qu'il possède de têtes globulaires. Ainsi, on présume que le nombre de sites de liaison au C1q qui seront fonctionnels par molécule de CRP est déterminé par la taille relative des C1q³⁰. La reconnaissance du complexe CRP-ligand par le C1q initie la cascade du complément par la voie classique, entraînant la formation de la C3 convertase de cette même voie et permettant ainsi au complément d'opsoniser les agents pathogènes.

1.3.1.1.3 La protéine amyloïde A sérique

La protéine amyloïde A sérique (SAA) est, tout comme la CRP, une protéine de phase aigue dont les concentrations plasmatiques augmentent plus de 1000 fois lors de réactions inflammatoires³¹. Cette protéine de la famille des pentraxines se sert d'une liaison soit avec les histones ou la chromatine afin de lier le C1q et d'initier la voie classique. L'effet que la SAA a sur la formation du complexe est le même que celui qui est observé lors d'une activation par la CRP³². Ce phénomène sera approfondi dans les prochains chapitres. L'initiation du complément par la SAA a été l'objet de plusieurs études sur la maladie d'Alzheimer³³⁻³⁵.

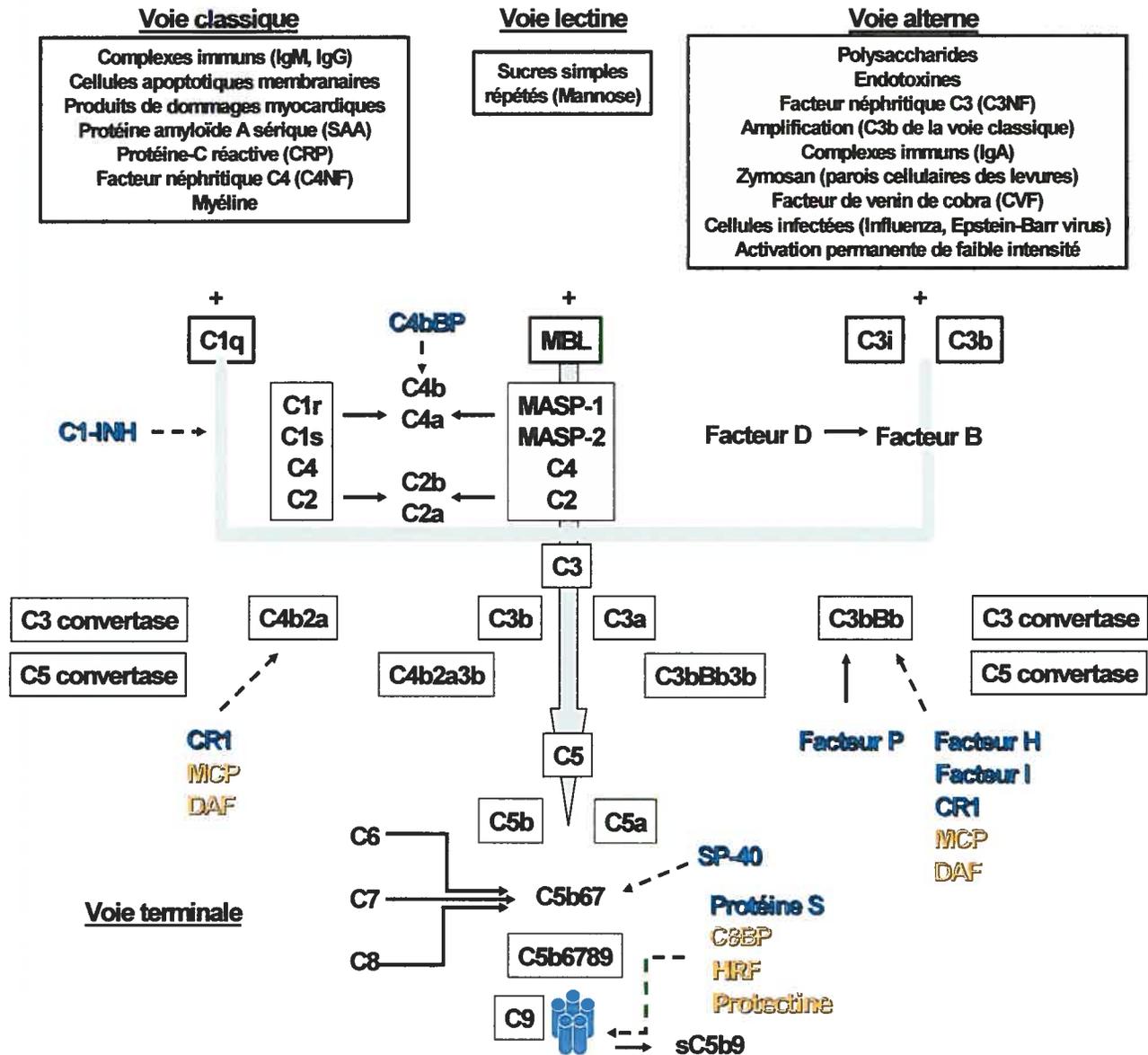


Figure 1. Activation et régulation du système du complément. Les quatre (4) voies d'activation sont représentées. Les flèches en pointillés représentent une réaction d'inhibition. Les protéines régulatrices membranaires sont en orange. Les protéines régulatrices solubles sont en bleu. L'activation du complément résulte en la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) ou en la formation d'un complexe soluble (sC5b-9). C1-INH= C1-inhibiteur. C4bBP= C4b-binding protein. C8BP= C8-binding protein. HRF= facteur homologue de destruction. SP-40= clusterine. Facteur P= properdine. DAF= facteur accélérateur de la dissociation (CD55). MCP= cofacteur de protéine membranaire (CD46) Protéine S = vitronectine. CR1= récepteur du complément 1 (CD35). Protectine= CD59.

1.3.1.1.4 Les cellules apoptotiques

Depuis quelques années, l'hypothèse voulant que les cellules apoptotiques activent la voie classique du complément grandit en popularité³⁶. Par cette fonction, les cellules apoptotiques ne provoquent pas d'inflammation. Par une liaison directe avec le C1q, les cellules apoptotiques seraient aptes à initier la cascade d'activation du complément par la voie classique³⁷. Ces cellules apoptotiques semblent aussi pouvoir activer la voie classique par d'autres mécanismes. Par exemple, il est connu que des concentrations importantes de CRP sont présentes localement lors de dommages tissulaires et que la CRP active le complément. Par conséquent, il devient donc fort probable que les cellules apoptotiques puissent, par des liaisons à la CRP qui sont dépendantes du calcium, lier le C1q et augmenter ainsi l'activation du complément par la voie classique³⁸. Une liaison indirecte entre le C1q et le sérum amyloïde P (SAP)³⁹ ou un IgM⁴⁰ peut aussi initier l'activation du complément par la voie classique de manière semblable.

1.3.1.1.5 Produits de dommages myocardiques

Un autre mécanisme bien connu dans l'activation du complément par la voie classique est la liaison entre les fragments C1q et certains produits en provenance des cellules nécrotiques dont les cardiomyocytes. Récemment, il a été démontré que les cellules nécrotiques et les cellules apoptotiques tardives employaient des mécanismes similaires dans l'activation du complément⁴¹. Les cellules apoptotiques primitives et tardives se distinguent par l'intégrité de la membrane. Majoritairement, les définitions actuelles spécifient que les cellules nécrotiques se distinguent des cellules apoptotiques par leur capacité à provoquer l'inflammation. Cependant, plusieurs études démontrent que les cellules apoptotiques sont aptes à initier l'activation du complément par la voie classique, leur conférant ainsi des propriétés proinflammatoires⁴¹. Bien qu'on s'entende maintenant pour dire

que les cellules apoptotiques tardives et nécrotiques peuvent activer et lier le complément, peu d'information est connu sur le mécanisme moléculaire d'une telle action. Pour réaliser un tel mécanisme, les cellules nécrotiques dépendent beaucoup des IgM. Ainsi, le complexe formé d'IgM et de produits de dommages myocardiques est reconnu par la molécule C1q et initie la cascade.

1.3.1.1.6 Facteur néphritique C4, myéline, complexe héparine-protamine

Depuis plus de deux décennies, on connaît le facteur néphritique C4 (C4NF) comme étant impliqué dans la cascade d'activation du complément initiée par la voie classique⁴². Le C4NF se retrouve dans les fragments d'IgG de certains patients avec glomérulonéphrite et prévient la dissociation intrinsèque du complexe C4b2a. Cet auto-anticorps, surtout présent dans le sérum des patients avec maladies rénales aiguës et chroniques, a donc comme fonction de stabiliser la C3 convertase de la voie classique⁴³.

L'activation de la voie classique par la myéline, élément permettant le passage rapide de l'influx nerveux le long des cellules neuronales, est plus spécifiquement étudiée dans le cas de pathologies liées à la dégénérescence neuromusculaire. Ce mécanisme serait aussi dépendant du calcium.

De plus, à des concentrations spécifiques équimolaires, l'héparine, un anticoagulant, et la protamine, un inhibiteur de l'action de l'héparine, peuvent activer la voie classique⁴⁴. Ce complexe héparine-protamine agit de façon identique aux complexes Ac-Ag: en se liant à la portion C1q, il initie l'activation de la voie classique.

Finalement, un autre mécanisme par lequel la voie classique pourrait être activée est par l'absence de toute liaison avec la molécule C1 mais par l'aboutissement du clivage du fragment C3. Ce mécanisme a fait l'objet de la création d'une nouvelle voie, la voie lectine.

1.3.2 La voie alterne

En plus d'être le mode d'activation du complément le plus ancien, la voie alterne est présente chez tous les vertébrés^{21,45}. Elle est la principale responsable du déclenchement de la réponse immunitaire en absence d'anticorps. La voie alterne ne requiert pas la présence des fragments C1, C4 et C2 mais conduit tout de même au clivage du fragment C3. Cette voie d'activation exploite les propriétés du fragment C3. Ce dernier, élément central du complément et protéine la plus abondante de ce système (3.1 mg/mL), accomplit plusieurs fonctions. L'initiation de cette voie repose sur la génération d'une molécule C3 activée.

1.3.2.1 Principes généraux; activation spontanée de faible intensité

Les multiples fonctions du C3 deviennent évidentes lorsque ce dernier est clivé par des protéines hautement spécifiques. L'assemblage de ces protéines porte le nom de C3 convertase. Une hydrolyse spontanée, mais lente, entraîne le clivage des ponts thioesters de la molécule native C3, lui permettant ainsi de devenir hautement réactive en prenant la forme d'une molécule C3H₂O (C3b-like ou iC3b)^{46,47}. C'est en fait cette molécule qui initie l'assemblage de la C3 convertase de la voie alterne. Le iC3, clivé en Bb par le facteur D, génère la convertase alterne soluble initiatrice, iC3bBb. Cette convertase est responsable du clivage, faible et continu, du fragment C3 en circulation. Par conséquent, des suppléments de petites concentrations de C3b sont constamment créés⁴⁸. Habituellement, le C3b est rapidement inactivé au contact des surfaces cellulaires des vertébrés et ce en se liant à des protéines inhibitrices et à l'acide sialique. Les bactéries et les autres agents pathogènes, quant à eux, n'ont que des taux faibles de ce même acide, ce qui permet au C3b de demeurer actif pendant de longues périodes. En fait, la cascade de la voie alterne confère au corps une défense rapide contre certains pathogènes. Bien que cette voie fonctionne indépendamment

de la présence d'anticorps, elle génère dans ce cas le même produit final que celui de la voie classique, soit le C5b.

1.3.2.2 Les activateurs de la voie alterne

Au moment où un activateur de la voie alterne est présent, l'activité de la C3 convertase de cette voie s'amplifie⁴⁹. Le mécanisme initiateur d'un tel processus est la liaison covalente dépendante du magnésium (Mg^{2+}), par des ponts esters ou amides, entre le C3b et la surface de l'activateur. Plus il y a de C3 convertase de formée, plus il y a de C3 qui s'active, générant alors plus de C3 convertase à la surface des activateurs et ainsi de suite. Ces étapes d'amplification conduisent à une augmentation des liaisons entre l'opsonine C3b et les différentes surfaces activatrices. En plus du C3b, l'activation du fragment C3 génère aussi le produit C3a, un peptide proinflammatoire^{21,50}. Les fonctions de C3a et C3b issus de la fragmentation de C3 ont été discutées précédemment.

1.3.2.2.1 *Amplification par la voie classique*

Les protéines actives par la voie classique pourraient aussi activer la voie alterne. En effet, le fragment C3b, créé suite à l'activation du fragment C3 de la voie classique, s'avère être un activateur facilement accessible pour la voie alterne (Figure 2). Ce C3b provenant du clivage du C3 par la C3 convertase de la voie classique (C4b2a) se lie aussi de façon covalente, par une liaison dépendante du Mg^{2+} , à l'activateur de la voie alterne.

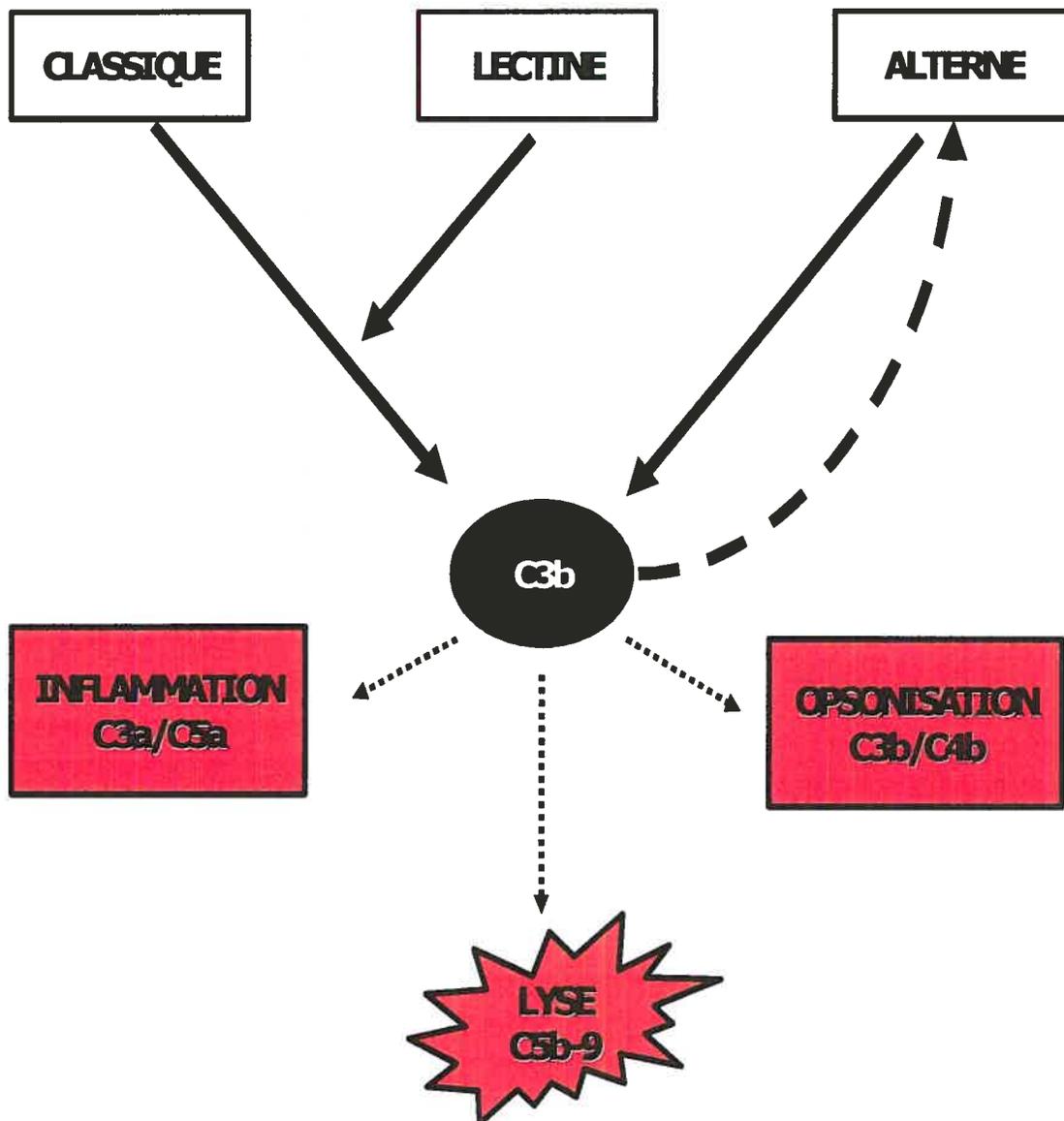


Figure 2. La déposition de fragments C3b sur une surface activatrice peut se faire à partir de plusieurs mécanismes distincts. Les complexes immuns, les lectines ou l'activation continue de faible intensité de la voie alterne elle-même n'en sont que quelques exemples. Une telle déposition de C3b devient le point de départ de l'amplification de cette déposition, créant ainsi un mécanisme nommé «boucle de rétroaction positive». Cette boucle est étroitement régulée dans le but de prévenir une activation excessive du complément causant des dommages tissulaires aux cellules de l'hôte.

1.3.2.2.2 Substances naturelles

La voie alterne est activée par plusieurs substances naturelles (i.e. Zymosan, facteur de venin de cobra, facteur néphritique C3, parois cellulaires bactériennes [endotoxines]). Tel que mentionné précédemment, chacun de ces agents activateurs forme une liaison covalente avec les ponts thioesters du fragment C3b du complément^{51,52}.

1.3.2.2.3 Complexes immuns IgA

Bien que son activation soit reconnue comme étant indépendante des complexes immuns, la voie alterne, tout comme la voie classique, peut être activée par des immunoglobulines (Ig). Les IgA sont des immunoglobulines formées suite à une réponse immune non-spécifique (innée), c'est-à-dire pouvant ne pas requérir de sensibilisation préalable⁵³. Cette immunoglobuline représente 15 à 20 pour cent des immunoglobulines sériques totales. Contrairement aux IgG et à l'IgM, l'IgA ne possède pas de site de liaison pour le C1q. C'est donc de façon indirecte et par la voie alterne que l'IgA peut activer le complément. L' IgA se lie donc à des bactéries dans le but de former un complexe immun facilement reconnaissable par les fragments C3b⁵⁴. Suite à cette liaison, la cascade s'en suit et s'amplifie.

1.3.3 La voie lectine

La dernière voie à avoir été découverte est la voie lectine. Cette voie est initiée par la *Mannose binding lectin* (MBL) ou par une ficoline, qui se lie à des structures glucidiques présentes sur plusieurs microorganismes⁵⁵. La MBL est décrite par plusieurs auteurs comme étant une protéine de phase aigue. Bien que, tout comme la voie alterne, la voie lectine ne requière pas la présence d'un anticorps et relève de l'immunité naturelle, elle s'apparente grandement à la voie classique.

1.3.3.1 Activateurs de la voie lectine

Suite à son initiation, la voie lectine produit la C5 convertase via l'action des fragments C4 et C2. De plus, la MBL, synthétisée par le foie en réponse aux cytokines produites par les macrophages activés par la liaison avec des pathogènes, possède une structure tridimensionnelle comparable au fragment C1q de la voie classique⁵⁶. Tout comme ce dernier, la MBL ainsi que la ficoline⁵⁷ font partie de la famille des collectines. En fait, le terme lectine regroupe toute protéine ou glycoprotéine, d'origine animale ou végétale, possédant au moins un domaine non-catalytique de fixation réversible à un mono- ou à un oligosaccharide spécifique, et ce à l'exception des immunoglobulines⁵⁸. Toutes deux, la ficoline et la MBL, se composent d'un groupe de sous-unités comportant un domaine *collagen-like*, une région riche en cystéine, une région N-terminale. À la différence de la MBL, la ficoline possède un domaine fibrinogène-like (semblable au fibrinogène β et γ). Les ficolines du sérum sont donc des lectines qui ont une spécificité de liaison commune avec la N-Acétyleglucosamine (GlcNAc)⁵⁹. Ce sont donc les extrémités globulaires de la ficoline et du MBL qui permettent une adhésion à des groupes «sucres», leur conférant ainsi leur fonction «lectine». En présence de calcium, ces deux groupements s'associent à la GlcNAc et au mannose. Après s'être liée à sa cible, la molécule de reconnaissance, soit le MBL ou la ficoline, se voit liée par une seconde protéine, une sérine protéase associée à la MBL (MASP, MBL Associated Serine Protease)⁶⁰⁻⁶². Ce complexe clive puis active C4 et C2. Il existe une grande similarité au niveau de la structure et de l'activité de la MASP-1 et de la MASP-2 avec celles du C1r et du C1s, respectivement²³. Une nouvelle MASP dont le rôle n'est pas encore clairement connu a été mise en évidence récemment : MASP-3^{63,64}. Le résultat est la production de la C3 convertase de la voie classique, soit le complexe C4b2a.

Bien que les trois voies d'activation du complément diffèrent beaucoup les unes des autres par leurs mécanismes d'initiation, elles se ressemblent

dans l'évolution de leurs fonctions respectives, soit en ayant en commun certains acteurs de la cascade, soit en ayant des composants qui jouent relativement le même rôle. (Tableau III)

Classique	Lectine	Alterne
C2		Facteur B
C1q	MBL	
C1r/C1s	MASP-1/MASP-2	
C3/C4/C5	C3/C4/C5	C3/C4/C5

Tableau III. Fragments homologues fonctionnels et structuraux des différentes voies d'activation.

1.3.4 La voie terminale

1.3.4.1 Principes généraux

La voie terminale est le point de rencontre des trois voies d'activation⁴⁵. Le CAM formé par l'activation du complément caractérise cette voie. Il est capable de lyser une grande diversité de microorganismes, la majorité des virus possédant une enveloppe, les érythrocytes et les cellules nucléées.

1.3.4.1.1 Initiation de la cascade finale

L'ajout d'un fragment C3b à chacun des deux types de C3 convertase préalablement formés, soit C3bBb pour la voie alterne et C4b2a pour la voie classique, forme la C5 convertase (C3bBb3b et C4b2a3b, respectivement). Cette enzyme clive la protéine C5 en C5a et C5b, d'où débute la formation du CAM. La plus grosse des protéines ainsi produite, le C5b, se lie à la surface des cellules cibles dans le but de fournir un site de liaison aux autres molécules impliquées dans la formation du CAM. Dans ce cas, C6, la

protéine suivante de la cascade s'ajoute au C5b pour former le C5b6. Cependant, si le fragment C6 ne se lie pas au fragment initial du CAM, ce dernier est déstabilisé et devient rapidement inactivé et ce, en moins de deux minutes. Si la formation du CAM est bien initiée, le C7 se lie au complexe et il en résulte le nouveau complexe C5b67, qui peut se lier aux surfaces hydrophiles des membranes des cellules, par la partie hydrophobe de la molécule C7 exposée par sa liaison avec C5b, ou aux complexes immuns. Les régions hydrophobes du complexe sont ainsi exposées dans le but de permettre aux phospholipides membranaires d'y être liés. Si le complexe moléculaire est lié aux membranes des cellules cibles, il pourra alors facilement s'insérer dans la double couche lipidique. De plus, l'exposition des résidus hydrophobes du complexe empêche sa liaison aux surfaces non cellulaires ou aux complexes immuns. Dans ce cas, il arrive parfois que le groupement de fragments C5b67 se lie à des cellules voisines et provoque leur lyse. Ce processus appelé «lyse du spectateur» est la cause de plusieurs maladies auto-immunes^{18,65}.

La protéine C8 se lie enfin aux autres composants du CAM, subissant ainsi un changement conformationnel qui lui permet d'exposer son site hydrophobe en vue d'interagir avec la membrane plasmique. Déjà, ce complexe forme un petit pore qui peut lyser quelques cellules sans noyaux, dont les globules rouges du sang.

1.3.4.1.2 Formation du complexe d'attaque membranaire

Finalement, le complexe multimoléculaire formé des protéines C5b à C8 peut se lier à plus d'une dizaine de protéines C9, provoquant leur polymérisation. Les molécules de C9 subiront les mêmes modifications conformationnelles que ses deux fragments précédents (C5b67 et C8), dans le but de pouvoir, elles aussi, s'insérer dans la membrane plasmique (Figure 3). Le phénomène de polymérisation contribue à affaiblir grandement la membrane cellulaire et à parachever la formation d'un pore de 70 à 100 Å

qui provoquera la lyse cellulaire par le CAM. Plus le nombre de pores formés est grand, plus la lyse est efficace. La création de ces cylindres transmembranaires donne le libre passage aux molécules de petites tailles, eau et petits ions, à travers la membrane plasmique. De cette façon, la cellule ciblée ne peut pas maintenir sa stabilité osmotique et meurt. Un tel évènement est plus sensible si le système du complément en jeu vient d'une espèce autre que les cellules cibles à lyser⁶⁶.

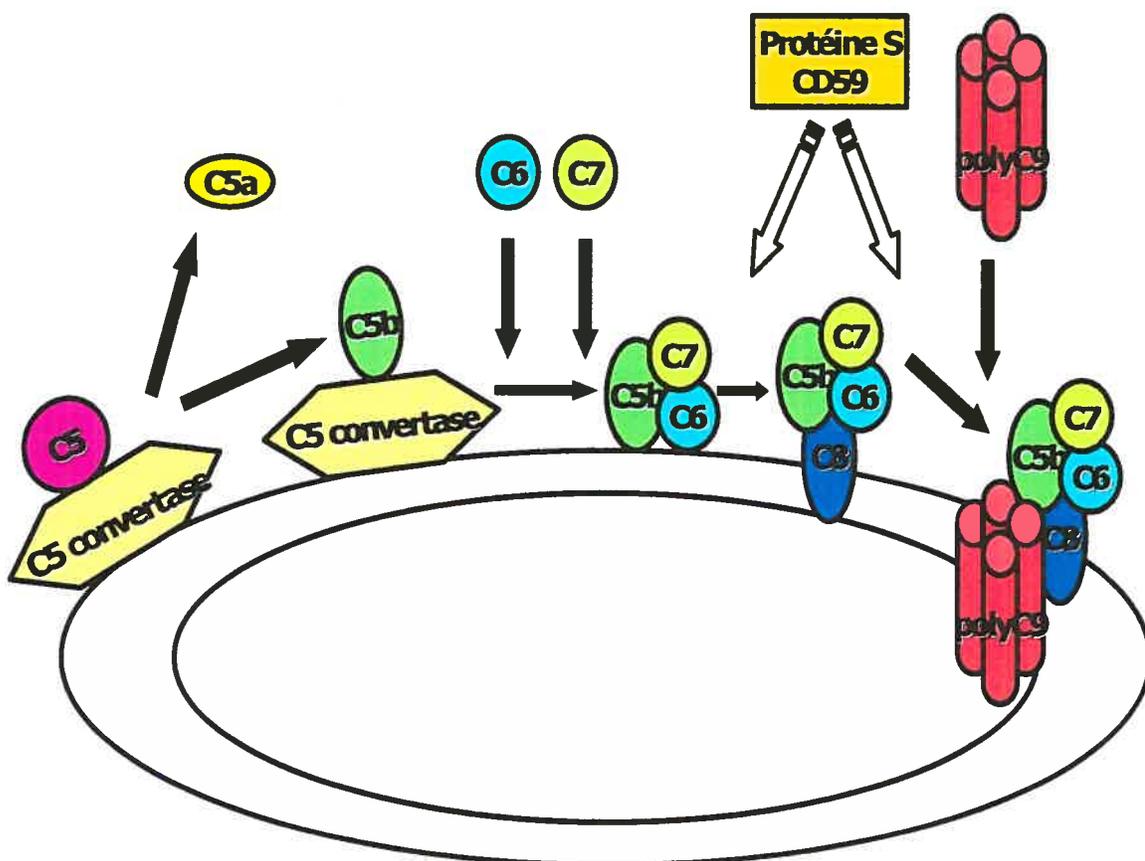


Figure 3. Assemblage du complexe d'attaque membranaire (CAM).

1.4 La régulation du complément

Idéalement, le système est potentialisé lors d'invasions par des organismes pathogènes alors que son activité sur les cellules et tissus normaux est restreinte. Malheureusement, étant non spécifique, ce système peut aussi bien s'attaquer aux cellules de l'hôte qu'aux micro-organismes. Dans ce cas, le mauvais fonctionnement ou le non fonctionnement du système du complément peut être à l'origine de plusieurs maladies auto-immunes. Pour contrer ce phénomène et limiter l'activité du complément à des cellules cibles, des mécanismes de régulation sont présents⁶⁷⁻⁷⁴. Parmi ces mécanismes, on compte notamment les niveaux sériques limités des différentes composants, la dégradation naturelle de certains fragments activés, les inhibiteurs de protéases sériques et les inhibiteurs spécifiques du complément⁷⁵. De plus, en se liant aux autres composants biologiquement actifs du complément, les récepteurs du complément jouent un rôle important dans la régulation.

1.4.1 La dégradation naturelle

Dans le cas de la dégradation naturelle, un contrôle passif est exercé par l'extrême instabilité des composants préalablement activés qui perdent leur activité rapidement, à moins qu'ils ne réagissent avec le composant suivant⁷⁶. Ainsi, l'activation du complément est régulée localement à la surface des pathogènes sur lesquels elle a été initiée. Ce sont en fait les fragments C3b ou C4b qui, souvent, favorisent la régulation du complément en le liant de façon covalente à la surface du pathogène via leur domaine thioester. Un autre mécanisme comparable à ce dernier peut avoir lieu dans les voies classique et lectine. En effet, si le fragment C2 n'est pas lié au C4b, il ne sera pas clivé et le C2b demeurera à la surface du pathogène.

1.4.2 Les protéines régulatrices

Présentes sur les membranes des cellules de l'hôte ou simplement dans le sérum, les protéines régulatrices inhibent l'activité du complément à plusieurs niveaux, tant lors de son activation que lors de la formation du CAM^{63,77}. Ce contrôle actif prévient une activation excessive du complément, protège les cellules contre les effets souvent inappropriés du complément et participe à l'élimination de complexes immuns. (Tableau IV)

	Facteurs de régulation	Cible	Fonction
Protéines régulatrices solubles	C1-INH	C1R	Stabilisation du complexe C1 _{r2s2} . Protection du domaine catalytique.
	C4bBP	C4b	En se liant au C4b, diminue la formation du complexe C4b2a.
	Facteur H	C3b	Liaison au fragment C3b. Cofacteur de l'activité de blocage par le facteur I.
	Facteur I	C4b/C3b	Clive les fragments C3b/C4b
	Properdine	C3bBb	Stabilise la C3-convertase de la voie alterne
	Protéine S (vitronectine)	C5b-7	Se lie au fragment C5b7 dans le but de prévenir la lyse cellulaire spontanée. Empêche l'ancrage membranaire.
	SP-40 (clusterine)	C5b-7	
Protéines régulatrices membranaires / récepteurs	CR1 (CD35)	C3b/C4b	Diminution de la formation des C3- et C5-convertases. Cofacteur de l'activité de blocage par le facteur I.
	MCP (CD46)	C3b/C4b	Cofacteur de l'activité de blocage par le facteur I.
	DAF (CD55)	C4b2a/C3bBb	Diminution de la formation des C3- et C5-convertases.
	C8BP	C5b-8/C9	Prévention de la formation du CAM par un processus autologue. Empêche la liaison C8-C9.
	HRF	C5b-8/C9	
	Protectine (CD59)	C5b-8/C9	

Tableau IV. Régulateurs membranaires et solubles de l'activation du complément.

1.4.2.1 Les protéines régulatrices membranaires

Les régulateurs du complément présents sur les membranes cellulaires offrent une protection contre l'inflammation excessive causée par le complément et participent à l'élimination des complexes immuns.

En absence de molécules stabilisatrices, la protéine C3b a une très courte demi-vie^{78,79}. Dans ces conditions, le C3b se liera à un récepteur qui reconnaît les particules opsonisées, transportera les complexes immuns et agira comme cofacteur dans l'inactivation des fragments C3b et C4b. Ce récepteur, nommé CR1 ou CD35, est un récepteur des fragments C3b et C4b, agissant donc au niveau des C3 et C5 convertases des voies classique et alterne. Il possède une large distribution cellulaire (globules rouges, lymphocytes B, monocytes, cellules polymorphonucléaires). Ce récepteur est couplé à une molécule membranaire qui prévient la liaison du facteur B, la DAF (facteur accélérateur de la dissociation ou CD55). La DAF est présente sur toutes les cellules sanguines, à l'exception des cellules endothéliales, épithéliales et tueuses. En absence de la liaison à la DAF et au CR1, la cascade du complément se poursuit pour ensuite se diriger vers la formation du complexe lytique. Les CR1 sont principalement retrouvés sur les phagocytes, mais aussi sur les lymphocytes B, les érythrocytes, les éosinophiles et les cellules de Langerhans⁷⁵. Contrairement à d'autres régulateurs du complément agissant au niveau des convertases, le CR1 ne semble pas agir en tant qu'inhibiteur intrinsèque du complément sur ces cellules où il est situé.

Le cofacteur protéique membranaire (MCP ou CD46) et la DAF sont deux autres régulateurs membranaires de l'activité du complément qui agissent au niveau des convertases⁸⁰. Tout comme le CR1, la MCP et la DAF limitent l'activation du complément. Alors que la DAF agit seulement au niveau des C3 convertases en accélérant leur dissociation, la MCP agit sur les C3 convertases de la même manière que le CR1, c'est-à-dire en se liant

au C3b et/ou au C4b. L'expression de MCP est élevée sur toutes les cellules, à l'exception de globules rouges. Ces deux protéines sont présentes sur les mêmes cellules, soient les cellules sanguines, l'endothélium vasculaire et l'épithélium vasculaire. La seule différence quant à leur manière de lier les cellules porteuses est que la DAF se lie aux phospholipides des membranes via un lien de glycoposphatidylinositol alors que la MCP, tout comme le CR1, est une protéine directement intégrée dans la membrane.

Finalement, le CAM est un des éléments les plus étroitement régulé dans tout le système du complément. Dans le but d'éviter la lyse des cellules de l'hôte, un système d'inhibition de la formation du CAM est mis en branle. La protectine (CD59 ou MIRL) et le C8BP sont des inhibiteurs membranaires de la lyse réactive et sont présents sur les mêmes types de cellules que la MCP et la DAF. En se liant au complexe C5b678 sur les cellules autologues, ils bloquent la liaison du C8 au C9. Ce blocage aura comme effet d'inhiber la formation du CAM et donc d'éviter une inflammation excessive dirigée par le complément. Le facteur de restriction homologue (HRF) agit sensiblement de la même manière que les deux protéines précédentes et devient donc efficace seulement si les composants du complément sont de la même espèce que les cellules cibles. Une telle propriété confère à ces trois protéines la fonction commune de restriction homologue.

Des protéines membranaires régulatrices, telles la DAF, la MCP, le CR1, le HRF, le C8BP et le MIRL, agissent souvent en étroite collaboration avec des protéines régulatrices solubles.

1.4.2.2 Les protéines régulatrices solubles

Généralement, les protéines régulatrices solubles du complément servent à inhiber l'activation excessive de ce dernier. La première protéine de ce genre à être rencontrée lors de l'activation de la cascade est l'inhibiteur du fragment C1 (C1INH)^{B1}. Cet inhibiteur de protéases sériques provoque la dissociation du complexe C1 (C1_{r2s2}) du C1q. En se liant aux C1r et C1s, le

C1INH arrête l'activité protéolytique en cours. Dans ce cas, lorsque le fragment C1 est activé par le complexe anticorps-antigène, seul un court laps de temps est possible pour permettre le clivage de C4 et de C2 avant que le C1INH joue son rôle de désactivateur et empêche l'activation du complément par la voie classique. Le C1INH est aussi un important régulateur des systèmes fibrinolytiques, du système des kinines et du système de la coagulation⁸².

Hautement régulés par les facteurs membranaires, les fragments C3b et C4b sont aussi soumis aux effets des protéines régulatrices solubles. Ces deux fragments activés sont régulés par des protéines qui ont pour rôle de bloquer la formation du C4b2a ou du C3bBb ou même d'induire la dissociation de l'un ou l'autre de ces complexes, dépendamment de l'opsonine ciblée. La voie alterne est initiée par la liaison du facteur B, à priori clivé en fragment Bb par le facteur D, à une molécule de C3(H₂O) ou C3i spontanément générée par une hydrolyse lente du fragment C3. Une telle liaison formera le complexe C3iBb. La génération du complexe C3iBb s'amplifie suite au clivage de la molécule C3 en fragments C3a et C3b, ce dernier se liant de nouveau avec le fragment Bb préalablement formé dans le but de générer la C3 convertase de la voie alterne (C3bBb). La properdine est une protéine régulatrice soluble qui aura pour but de stabiliser le complexe C3bBb pour ainsi retarder sa dégradation. Le facteur H est une protéine régulatrice soluble qui viendra limiter la formation d'un tel complexe^{83,84}. Il a la capacité d'interrompre la boucle de rétroaction positive en dissociant le facteur B de la C3 convertase⁸⁵. Le facteur H agit en synergie avec le facteur I, lequel dégrade le facteur B de la C3 convertase. Globalement, le facteur H empêche l'activation du complément par la voie alterne alors que le facteur I limite cette même activation. Le facteur H sera en compétition avec le facteur B pour le site de liaison au C3b. L'activité du facteur H dépend du contenu cellulaire en acide sialique. Ainsi, plus les concentrations en ce dernier sont élevées, plus l'activité du facteur H est

élevée et moins le facteur B a d'affinité pour le C3b. Sans le facteur I, ou même sans facteur H, l'activité du complexe C3bBb serait amplifiée^{3,79}. En d'autres mots, des quantités phénoménales de C3bBb se formeraient, entraînant ainsi la formation inhabituelle C4bBb3b puis de complexes C5b-9 (Figure 4). À l'inverse, beaucoup de micro-organismes, en particulier les bactéries gram-négatives exprimant des LPS à leur surface, activent efficacement la voie alterne; les surfaces glucidiques non chargées de ces pathogènes empêchent le facteur H d'accomplir ses fonctions.

Dans la régulation de l'activation de la voie classique, le facteur I peut cliver le C4b de manière semblable à celle utilisée dans la voie alterne; cette protéase sérique utilise divers cofacteurs lors de son action de clivage. Parmi ces facteurs, on dénote le facteur H, tel que mentionné précédemment, mais aussi le CR1, la DAF et la MCP. Le CR1 est, tout comme le facteur H, un cofacteur du facteur I impliqué dans l'activité de blocage. Il est lui aussi une protéine régulatrice soluble et aura pour effet de diminuer la formation des C3- et C5-convertases en liant le C3b ou le C4b. La DAF et la MCP sont des protéines régulatrices membranaires. Alors que le facteur H agit au niveau de la voie alterne seulement, la DAF, la MCP, le CR1 et le facteur I agissent tant au niveau de la voie classique que de la voie alterne.

La protéine de liaison du fragment C4b (C4bBP ou *C4b-binding protein*) est une protéine régulatrice soluble qui est homologue au facteur H tant par sa structure et ses fonctions, à la différence qu'elle agit par la voie classique et non par la voie alterne. La C4bBP diminue la formation du complexe C4b2a, soit la C3 convertase de la voie classique, en liant le C4b. Ainsi, la C4bBP est pour le C2 ce que le facteur H est pour le facteur B. Le C4bBP entre donc en compétition avec le fragment C2 pour la liaison au C4b.

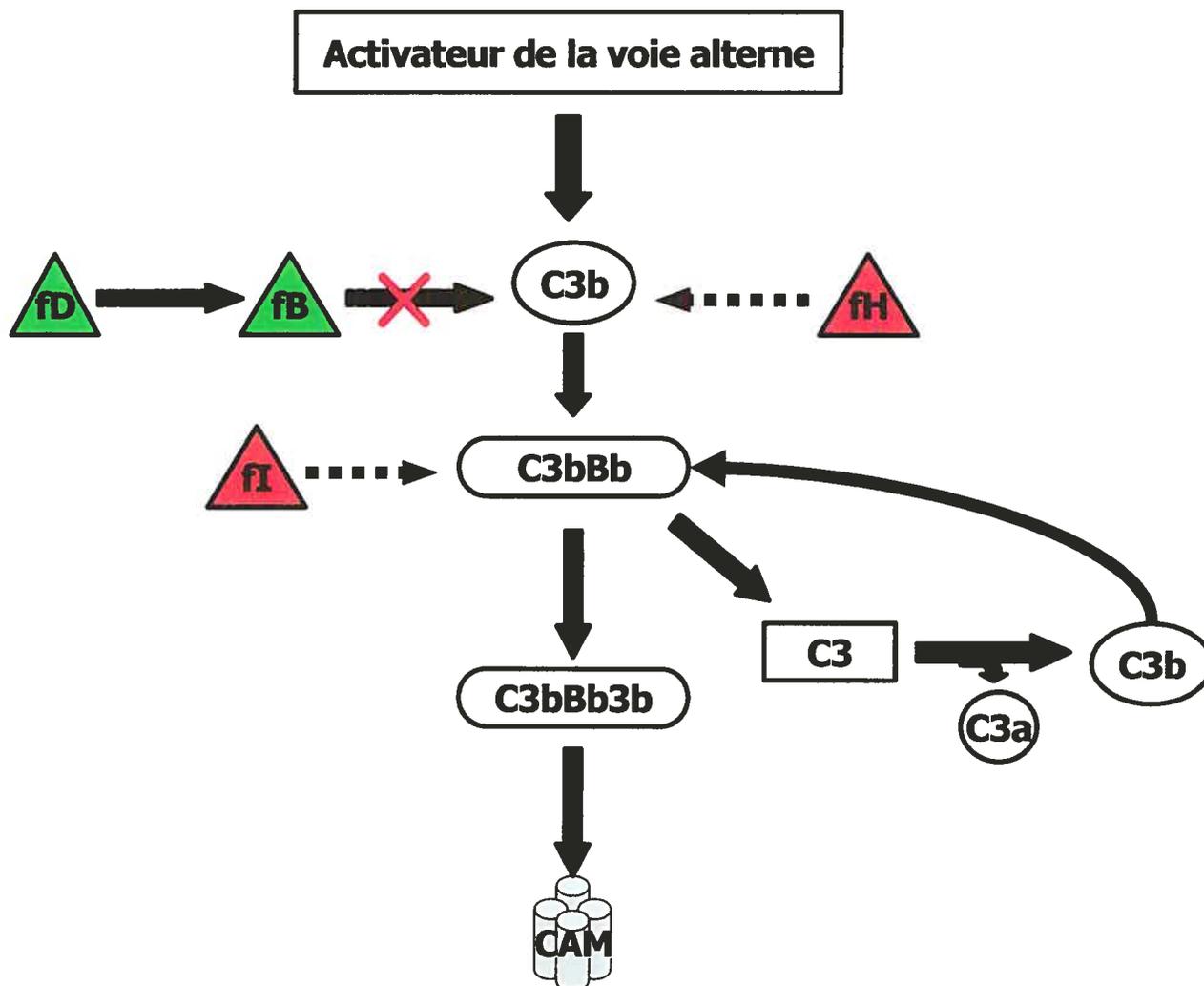


Figure 4. Mécanisme de régulation de la voie alterne. Le facteur H (fH) entre en compétition avec le facteur B (fB) pour un site de liaison commun, le C3b. La liaison du facteur H avec le C3b empêche la formation de la C3 convertase de la voie alterne. Par conséquent, moins de C5 convertases de la voie alterne (C3bBb3b) puis moins de CAM seront formés. Le facteur I (fI) dissocie le complexe C3bBb en clivant le fragment C3b. La présence du facteur B et du facteur D (fD) favorise l'amplification de la boucle de rétroaction positive et par conséquent la lyse des cellules par le CAM. Le facteur I et le facteur H favorisent la dissociation du complexe C3bBb et par conséquent la diminution de formation de CAM. Les flèches pointillées représentent des réactions d'inhibition de la cascade d'activation.

À l'inverse, certaines surfaces activatrices fournissent une protection pour le fragment C3b. La properdine⁸⁶, une autre protéine sérique, a pour fonction d'amplifier l'activité de la convertase⁸⁷. En se liant au C3bBb, elle le stabilise et permet à la protéine C3b de résister à l'activité du facteur I. Ainsi, grâce à la properdine, la demi-vie de l'activité C3 convertase C3bBb passe de 5 à 30 minutes. Une fois stabilisé, le complexe C3bBb clive plus de C3 et engendre la formation d'un second complexe, le C3bBb3b. Cet ensemble protéique possède une activité C5 convertase qui est responsable du clivage du fragment C5 en C5a et C5b.

Tout comme les autres étapes de la cascade, le CAM est aussi régulé de façon précise par des protéines solubles. La protéine S, ou vitronectine, et la clusterine (Apo-J) sont deux protéines plasmatiques solubles qui agissent en s'associant au complexe terminal soluble dans le but de contrôler son insertion dans la membrane cellulaire⁸⁸. Par cette action, le complexe moléculaire ne pourra pas attaquer les cellules voisines ni la cellule cible car son ancrage membranaire sera empêché.

1.4.3 Régulation de la clairance des CAM

Dans le but de résister à l'attaque et à la lyse cellulaire dirigées par le complément, certaines cellules nucléées ont acquis des mécanismes de défense hautement efficaces. Les neutrophiles⁸⁹, les cellules épithéliales glomérulaires⁹⁰ et les plaquettes⁹⁰ résistent à une telle attaque grâce à des mécanismes telles l'ectocytose et l'endocytose. Par l'ectocytose, le CAM est engorgé dans des vésicules alors que l'endocytose implique une invagination d'une petite partie de la membrane de la cellule cible. Ce phénomène de clairance du CAM se produit même dans les cellules ischémiques⁹¹, bien qu'il en demeure inexplicé qu'un tel mécanisme nécessitant de l'énergie puisse se produire dans ces cellules.

1.5 Activation du complément et pathologies

1.5.1 Déficience en complément

Le système du complément est un système qui doit être hautement régulé. En plus de jouer un rôle primordial dans la défense de l'hôte contre les pathogènes, le système du complément est un médiateur à la fois de la pathogenèse et de la prévention des maladies autoimmunes, tels le lupus érythémateux systémique (LES) et l'arthrite rhumatoïde^{92,93}. De telles fonctions reflètent bien la dualité du rôle du système du complément. Le complément confère une excellente protection à l'organisme lorsqu'il est efficacement et modérément utilisé contre les pathogènes. Cependant, par la même occasion, l'inflammation engendrée par son activation peut entraîner d'importants dommages tissulaires s'il n'est pas étroitement régulé ou si certaines composantes sont déficientes. En plus d'être étroitement associées avec les risques de développer une maladie autoimmune, les déficiences en complément prédisposent les patients à des infections récurrentes par deux mécanismes : 1) une opsonisation non fonctionnelle ou 2) une dysfonction dans l'activité lytique faite par le CAM. Le type de pathologie impliqué varie en fonction du composant du complément qui est déficient^{5,94-96}. En laboratoire, plusieurs tests ont été mis au point dans le but de déceler et caractériser de telles déficiences⁹⁷. Des analyses portant sur l'activité du CAM ainsi que des analyses plus précises de chacun des composants de la cascade sont d'une grande utilité dans le dépistage de plusieurs maladies auto-immunes ou inflammatoires. Le tableau V résume les principaux déficits en complément et les différentes pathologies qui leur sont associées alors que le tableau VI décrit les différents tests utilisés dans le diagnostic des différentes déficiences.

Composant déficient	Manifestation clinique
C1q, s	LES, infections bactériennes
C2	LES, infections respiratoires, Infections récurrentes (Neisseria)
C3	Infections bactériennes, glomérulonéphrites
C4, C4a, C4b	Maladies autoimmunes
C5	Infections récurrentes (Neisseria)
C6	Infections récurrentes (Neisseria)
C7	Infections récurrentes (Neisseria)
C8	Infections récurrentes (Neisseria)
C9	Infections récurrentes (Neisseria), LES (souvent asymptomatique)
Properdine	Infections sévères et fulminantes (Neisseria), septicémie
Facteur H	Infections (Neisseria), glomérulonéphrites, syndrome hémolytique et urémique (HUS)
Facteur I	Méningite, infections pyogéniques
C1-INH	Œdème angioneurotique héréditaire (HANE)
C8BP	Hémoglobinurie paroxystique nocturne (PNH)
DAF	PNH
CD59	PNH
CR3	Infections bactériennes récurrentes de la peau

Tableau V. Déficiences en complément et pathologies associées

Tests	Principe du test
Activité hémolytique <ul style="list-style-type: none"> - CH50 - AP50 	- Mesurer l'habilité des voies classique (CH50) et alterne (AP50) à lyser des cellules <ul style="list-style-type: none"> - Détecte déficiences voies classique (C1q, r, s/C2/C4/C3) et terminale (C5-9). - Quantité de sérum requise pour lyser 50% des érythrocytes de moutons recouverts d'Ac sensibilisés (IgG) (CH50) - Détecte déficiences voies alterne (C3, fB et fD) et terminale - Quantité de sérum requise pour lyser 50% des érythrocytes de lapins non sensibilisés dans une solution de Mg²⁺ - EDTA
Mesure de complexes immuns circulants <ul style="list-style-type: none"> - PEG (Polyéthylène Glycol) 	- Mesure complexes Ac/Ag (en suspension dans PEG) - La détection des complexes immuns circulants résulte en un C4, un C3 et un CH50 anormal.
Dosages individuels des composants du complément	
<ul style="list-style-type: none"> - ELISA (<i>Enzyme linked immunoabsorbent assay</i>) - RID (immunodiffusion radiale) - Électrophorèse - FACS (Cytométrie de flux) 	<ul style="list-style-type: none"> - Détecte complexe enzyme/substrat qui lui est lié à un composant spécifique (donne un produit de réaction coloré perceptible à différentes longueurs d'ondes). Tests peu sensibles pour le diagnostic d'activation. - Concentration relative d'un composant donné. Le spécimen qui contient la protéine est déposé dans un puit d'une gelée d'agar contenant une dilution appropriée d'un antisérum. Le précipité, c'est-à-dire le complexe antigène-antisérum, forme un anneau autour du puit (proportionnel à la concentration de la protéine étudiée) - Sépare les fragments en fonction de leur taille et de leur charge électrique. - Faisceau laser et un détecteur de lumière pour compter les cellules isolées intactes en suspension.

Tableau VI. Tests diagnostiques utilisés dans le but de détecter une déficience en complément

1.5.2 L'athérosclérose

Traditionnellement, l'athérosclérose a été associée à l'accumulation de lipides dans la paroi des artères en raison des concentrations plasmatiques élevées de cholestérol LDL⁹⁸. En effet, les concentrations plasmatiques élevées de cholestérol LDL figurent parmi les principaux facteurs de risque de l'athérosclérose. Cependant, depuis près d'une décennie, l'inflammation est un des mécanismes qui explique la présence de l'athérosclérose⁹⁹. L'initiation, la progression et la rupture de la plaque résultent en une réponse inflammatoire.

Au début de sa physiopathologie, l'athérosclérose se développe de façon chronique et progresse de façon silencieuse (plaque athéromateuse stable). L'évolution de la plaque d'athérosclérose est marquée par des poussées évolutives (plaque athéromateuse instable) qui correspondent aux tableaux cliniques des maladies cardiovasculaires (i.e. SCA) et qui font toute la gravité de cette affection. Par ces poussées évolutives, l'athérosclérose représente la principale cause de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés⁹⁹.

L'athérosclérose est reconnue comme étant une maladie inflammatoire proprement dite car de ce point de vue, chaque étape de sa progression implique des cellules inflammatoires. En effet, les molécules impliquées, tant dans la réponse inflammatoire innée que acquise, sont susceptibles de participer à plusieurs processus qui conduisent à la formation, à la progression et à la rupture de la plaque. Ce processus est dirigé par l'activation des monocytes et macrophages, du système du complément et des lymphocytes T^{100,101}. En utilisant une approche moléculaire, les recherches actuelles permettent une meilleure connaissance des bases physiologiques de l'athérosclérose.

La première étape de l'athérosclérose est la dysfonction endothéliale¹⁰², dont les facteurs responsables sont l'augmentation des LDL oxydées, le diabète, la présence de radicaux libres (induit par le tabagisme)

ou des facteurs infectieux (infection par *Chlamydia pneumoniae* ou cytomégalovirus). Les conséquences de cette inflammation engendrée par la dysfonction endothéliale sont l'accumulation de lymphocytes T et de macrophages dans la paroi artérielle, la formation de cellules spumeuses (CS) ou *Foam cells*, des modifications de la perméabilité endothéliale et des modifications dans l'adhésion des plaquettes¹⁰³. À un stade plus avancé, les CS forment un amas lipidique recouvert par une enveloppe fibreuse, riche en cellules musculaires lisses. L'accumulation de lipides et de macrophages, l'activité protéolytique et l'apoptose (mort cellulaire programmée) ainsi engendrées font de l'amas lipidique un véritable centre nécrotique. C'est en fait ce centre nécrotique qui sera susceptible de transformer la plaque stable en plaque instable.

Souvent, aucune rupture n'apparaît dans la plaque athérosclérotique avant plusieurs mois ou même plusieurs années; inversement, la plaque peut se compliquer brutalement d'une thrombose qui révèle la maladie. L'évolution vers la complication (rupture, érosion, hémorragie) ne dépend pas seulement du volume de la plaque mais de trois facteurs : la taille du noyau lipidique de la plaque, le degré d'inflammation locale (qui peut dégrader l'enveloppe fibreuse) et les modifications de la matrice extracellulaire¹⁰⁴.

L'instabilité et la rupture de la plaque sont directement liées à un état inflammatoire. La connaissance des éléments qui déterminent l'instabilité de la plaque a un énorme intérêt clinique. L'instabilité de la plaque est en fait la capacité de la plaque d'athérome à se compliquer, souvent à se fissurer. La stabilité de la plaque dépend de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

Le facteur intrinsèque déterminant est la composition de la plaque. Généralement, les quantités relatives en lipides, en macrophages, en cellules musculaires lisses et en collagène sont les éléments clés de la composition de la plaque. La présence d'un amas lipidique important diminue la résistance physique de la plaque; cette dernière se fissurera donc plus facilement. Inversement une enveloppe fibreuse épaisse, formée de cellules musculaires

et de collagène, est un élément stabilisant; la rupture d'une telle plaque sera moins facilement occasionnée.

L'inflammation est le facteur extrinsèque primordial dans la déstabilisation de la plaque. Elle influence la progression et les complications de la plaque par des effets sur la matrice extracellulaire et par l'apoptose. L'inflammation favorise l'accumulation des lipides dans l'intima. Les cytokines pro-inflammatoires induisent la production de métalloprotéinases matricielles (MMP)¹⁰⁵ qui sont capables de dégrader les constituants de la matrice. Il existe, dans une plaque inflammatoire, une grande accumulation de lipides et une production de MMP capable de fragiliser la plaque et d'entraîner sa rupture¹⁰⁶. Enfin, les cytokines pro-inflammatoires ont deux autres effets thrombogènes : la diminution de l'activité fibrinolytique des cellules endothéliales et l'induction de mort cellulaire par apoptose, responsable de la formation de l'activation du facteur tissulaire (TF)¹⁰⁷. Finalement, les lésions qui surviennent dans la plaque d'athérome évoluent selon plusieurs stades : la strie lipidique, qui est une phase précoce et réversible, la plaque athéromateuse simple puis la plaque instable qui entraîne l'expression clinique de la maladie. Cette vision physiopathologique de l'athérosclérose procure toute une gamme de cibles de choix dans le but de cibler les processus inflammatoires en cours. La grande amplitude de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion, de produits d'activation hépatique (CRP, SAA) et de réactants de la phase aiguë, impliqués dans cette cascade, sont d'excellentes cibles thérapeutiques. Toutes ces cibles peuvent avoir un rôle précis et direct dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

1.5.2.1 L'activation du complément dans l'athérosclérose

Récemment, plusieurs études ont démontré une association entre les pathologies cardiovasculaires et l'activation du complément. Beaucoup de protéines du complément contribuent à la formation et à la progression de l'athérosclérose. L'athérosclérose implique plusieurs mécanismes distincts

qui peuvent activer le complément. La CRP liée à un ligand, les complexes immuns, les LDL enzymatiquement modifiés (E-LDL) liés à la CRP, le matériel apoptotique, les phospholipides et les protéines mitochondriales sont tous des activateurs potentiels de la voie classique qui sont présents dans l'athérosclérose. Alors que les hydrates de carbone (mannose) activent la voie classique, le C3b et les protéines de la coagulation sont des activateurs de la voie alterne.

Il est maintenant connu que les gènes du complément sont exprimés dans l'athérosclérose et que les composants du complément sont eux-mêmes exprimés dans la plaque athérosclérotique¹⁰⁸. Les récepteurs des anaphylatoxines C3a et C5a (C3aR et C5aR, respectivement) sont exprimés dans cette plaque¹⁰⁹. Plusieurs études démontrent que le CAM y est aussi souvent co-localisé avec la CRP et les cellules apoptotiques¹¹⁰⁻¹¹². Une telle association démontre bien l'importance du rôle qu'occupe le complément lors de la réponse inflammatoire dans l'athérosclérose. Une autre étude a clairement démontré qu'une activation et une prolifération des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales était engendrée lors de l'assemblage du CAM. Ces événements ont pour effet d'augmenter les concentrations d'ARNm et les sécrétions protéiniques de l'interleukine-8 (IL-8) et de la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)¹¹³. Ces deux chimiokines ont pour fonction de favoriser l'interaction entre les monocytes et les cellules endothéliales, les monocytes étant grandement impliqués dans la progression de la plaque athérosclérotique¹¹⁴. Finalement, dans une étude faite chez des lapins dont la diète était riche en cholestérol, la présence de CAM dans l'intima corrélait avec une augmentation de la teneur en cholestérol, précédant l'infiltration des monocytes et la formation des CS¹¹⁵.

1.5.3 Les syndromes coronariens aigus (SCA)

Les SCA sont des manifestations cliniques inflammatoires excessives de l'athérosclérose et sont souvent associés avec l'ischémie myocardique

aigue⁹⁹. Les SCA sont caractérisés par une cascade d'événements initiée par l'athérosclérose, l'inflammation, la rupture de la plaque athérosclérotique la formation d'un thrombus intravasculaire et l'ischémie qui résultera en une nécrose cellulaire. L'apparence physiologique des SCA varie selon la gravité du cas. Parfois, les SCA ne présentent aucun signe apparent, si ce n'est qu'à l'électrocardiogramme (ECG). À priori, les patients qui présentent les signes d'une ischémie aiguë du myocarde subiront un ECG. Cet ECG peut ou non présenter une élévation du segment ST. Une élévation du segment ST à l'ECG entraîne, la majorité du temps, le développement d'un IM avec onde-Q. En plus de l'examen physique et de l'électrocardiogramme, la mesure de marqueurs sériques d'inflammation est une des méthodes utilisées dans la reconnaissance clinique des SCA¹¹⁶. Les SCA sont des pathologies cardiovasculaires qui incluent l'angine instable (*unstable angina*), les infarctus du myocarde sans élévation du segment ST (*non ST-elevation myocardial infarction* : NSTEMI) et les infarctus du myocarde avec élévation du segment ST (*ST-elevation myocardial infarction* : STEMI)¹¹⁷. Les patients qui présentent une ischémie mais dont l'élévation du segment ST n'est pas présente sont atteints soit d'angine instable, soit d'infarctus du myocarde sans élévation du segment ST qui conduira habituellement à un infarctus du myocarde sans onde-Q. Les patients ciblés par mon article présenté dans mon mémoire démontrent les signes d'un SCA sans élévation du segment ST (NSTEMI-SCA). Les manifestations de tels SCA sans élévation du segment ST sont très fréquentes dans la maladie coronarienne.

L'angine instable (UA) et les IM sans élévation du segment ST (NSTEMI) sont, dans la majorité des cas mais non exclusivement, causés par une maladie coronarienne stable et associée avec les IM qui souvent entraînent la mort. Ces deux types de NSTEMI-SCA présentent des conditions pathologiques et cliniques très semblables. Le degré de sévérité est la caractéristique qui distingue les deux syndromes. La production de marqueurs myocardiques spécifiques est un bon indicateur du type de NSTEMI-SCA sans

élévation du segment ST qui est présent¹¹⁸. Si des marqueurs tels la troponine (T ou I) de même que la CK-MB sont détectables en quantité suffisante dans le sang, l'ischémie s'avère donc assez sévère pour produire des dommages myocardiques. Par conséquent, ces marqueurs représentent un STEMI. Dans la situation inverse où les concentrations de ces marqueurs myocardiques ne sont pas détectables, le diagnostic dévoilera une UA¹¹⁹.

De plus, des changements à l'ECG peuvent parfois être des indicateurs du type de SCA en cours. Les NSTEMI présentent toujours, à l'ECG, des changements persistants du segment ST ou de l'onde T. Dans la majorité des cas, un patient qui présente une UA ne présentera pas ce type de changements à l'ECG. Cependant, dans le cas où ces changements se produiraient, ils ne seraient que transitoires¹²⁰. Finalement, il n'est pas rare de ne pas pouvoir distinguer, immédiatement à leur arrivée à l'hôpital, les patients avec NSTEMI et ceux avec UA; les concentrations sanguines des marqueurs myocardiques ne peuvent être dévoilées que quelques heures après le début des symptômes. Par conséquent, les patients choisis dans l'étude centrale de mon mémoire ont été choisis parce qu'il présentaient les symptômes d'une NSTEMI-SCA, mais sans nécessairement savoir s'ils souffraient d'une UA ou d'un NSTEMI.

Ces NSTEMI-SCA sont caractérisés par un apport insuffisant d'oxygène vers le myocarde par rapport à la demande de ce dernier¹²¹. Bien que la diminution de l'apport sanguin au myocarde occasionnée par la formation d'un thrombus non oblitérant soit la principale cause des NSTEMI-SCA, d'autres facteurs de risques sont associés à ces syndromes. La cause de ces UA/NSTEMI peut être multifactorielle, c'est-à-dire qu'elle peut être un ensemble de plusieurs facteurs. Globalement, l'équilibre interrompu entre l'apport en oxygène et la demande vers le myocarde s'explique par deux façons : soit qu'il y a réduction de l'apport de l'oxygène vers le myocarde, soit que les besoins en oxygène dans le myocarde augmentent.

En effet, la cause première des NSTEMI-SCA découle sans aucun doute de la rupture de la plaque athérosclérotique sur laquelle était localisé un thrombus. Bien que ce thrombus n'obstrue pas totalement la lumière du vaisseau, une élévation marquée des différents marqueurs myocardiques chez ces patients avec NSTEMI-SCA est notée. Ces marqueurs proviennent en fait des différents composants de la plaque fissurée de même que des microembolisations engendrées par les agrégats de plaquettes¹²².

Dans un deuxième temps, l'hypercontractilité des cellules musculaires lisses et la dysfonction endothéliale¹²³ peuvent tous deux causer des spasmes ou constrictions qui seront à l'origine d'une obstruction coronarienne dynamique, c'est-à-dire qui évolue progressivement. Cette deuxième situation, bien que moins fréquente que la première, converge aussi vers la réduction de l'apport en oxygène au niveau du myocarde.

L'inflammation, souvent responsable du rétrécissement des artères, de la rupture de la déstabilisation de la plaque, de sa rupture et de la thrombogénèse, peut aussi être une des causes de l'apparition de NSTEMI-SCA. L'activation de plusieurs médiateurs de l'inflammation, tels les lymphocytes-T et les macrophages, favorise la sécrétion de cytokines et d'enzymes qui viendront épaissir puis fissurer la plaque pour éventuellement diminuer l'apport en oxygène vers le myocarde¹²⁴.

Finalement, les patients qui présentent les symptômes associés aux NSTEMI-SCA peuvent être des patients qui souffrent de pathologies telles la tachycardie, l'hypotension ou l'anémie. Ces pathologies sont souvent associées aux NSTEMI-SCA car elles peuvent augmenter les besoins du myocarde en oxygène, diminuer le débit sanguin vers le myocarde et y diminuer l'apport en oxygène¹²⁵.

1.5.3.1 L'activation du complément dans les SCA

En rapport avec les SCA, plusieurs études ont démontrés qu'une activation du complément était présente dans les plaques athérosclérotiques coronariennes fissurées¹²⁶.

Dans un premier temps, l'activation du complément a été associée aux IM (avec élévation du segment ST). Une étude a démontré que l'ARNm des protéines C5 à C9 du complément ont été remarquées dans les zones touchées par l'infarctus du myocarde. Des dépôts de CAM ont aussi été localisés sur les cardiomyocytes endommagés¹²⁷. La même étude a aussi démontré que les infarctus qui évoluaient durant plus de 12 heures comptaient plus de CRP, de protéines activées du complément et plus de complexes CRP-complément. Ces corrélations sont reproductibles jusqu'à cinq jours.

Bien que le système du complément soit bien connu pour son rôle dans les infarctus aigus du myocarde, peu d'études se sont penchées sur l'implication de chaque composant de ce système lors de syndromes coronariens aigus (SCA) avec peu ou pas de nécrose cellulaire minimale. Yasuda *et al.*¹²⁸, ont corrélé des niveaux élevés de sC5b-9 avec la taille de l'infarctus chez des patients avec infarctus aigu du myocarde. La même étude, mais cette fois menée chez des patients avec angine instable (UA), n'a démontré qu'une modeste élévation des niveaux de C3a sans toutefois noter une élévation des niveaux de sC5b-9. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont soulevé l'hypothèse qu'une forte activation du complément surviendrait lors de nécrose cellulaire et que cette activation ne conduirait pas, dans l'angine instable, à la formation du CAM. Paradoxalement, une étude distincte a démontré la présence de niveaux élevés de CAM associés avec des niveaux élevés de CRP chez des patients avec UA alors qu'aucune élévation des niveaux des protéines proximales de la cascade d'activation n'a été remarquée¹²⁹.

1.5.3.2 Traitement des NSTEMI-SCA

Les traitements utilisés pour traiter les NSTEMI-SCA sont différents de ceux utilisés pour traiter les infarctus du myocarde avec élévation du segment ST (STEMI). Les STEMI sont caractérisés par une obstruction complète de l'artère coronaire par un thrombus et sont généralement immédiatement traités par angioplastie primaire (PCI). Au contraire, les NSTEMI-SCA ne présentent généralement pas une obstruction complète de l'artère coronaire; par conséquent, une revascularisation n'est pas toujours nécessaire. Par conséquent, une liste complète des thérapies, interventions et traitements a été élaborée dernièrement dans le but de mieux contrôler et traiter les NSTEMI-SCA¹³⁰. Le tableau VII est une adaptation du tableau qui figure dans l'article de Gluckman et al. (2005).

Intervention/ Traitement	Agents/ Modalités du traitement	Population traitée
Anti-thrombotiques		
Anti-plaquettaires	Aspirine	Tous les patients*, durée indéfinie. Dose initiale 162-325 mg; 75-160 mg/jour
	Antagonistes des récepteurs de l'ADP, les P2Y12 (Clopidogrel)	Tous les patients, sauf ceux qui devront subir un CABG d'urgence
	Inhibiteurs du GpIIb-IIIa (abciximab, eptifibatide, tirofiban)	Tous les patients avec ischémie continue, TnT élevée et PCI anticipée
Anti-coagulants	Héparine non fractionnée (HNF)	Alternatif au traitement par LMWH
	LMWH (enoxaparin)	Alternatif au traitement par HNF; à éviter si CABG dans les 24h
Anti-ischémiques		
Inhibiteurs des ACE	Aucun agent en préférence (captopril)	Patients avec hypertension
Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine	Aucun agent en préférence (candésartan)	Tous les patients intolérants aux inhibiteurs des ACE
Bêta-bloquants	Aucun agent en préférence (propranolol)	Tous les patients
Prévention secondaire		
Antagoniste calcique	Diltiazem, Nifédipine	Patients réfractaires, malgré l'utilisation de bêta-bloquant
Inhibition du HMGC _o A-réductase	Statines (simvastatin)	Tous les patients; obtenir un C-LDL < 70 mg/dL

Tableau VII. Thérapies utilisées dans le traitement des NSTEMI-SCA. Adapté de Gluckman et al. (2005) * Implique tous les patients dont les symptômes sont relatifs aux NSTEMI-SCA.

1.5.3.3 L'activation du complément dans le traitement des SCA

Parce que les patients avec SCA sont les types de sujets ciblés dans mon article, il s'avère important de relever les effets des différentes thérapies utilisées dans le traitement de ces syndromes sur l'activation du complément.

Une étude faite chez des patients ayant subi une angioplastie primaire a démontré que l'activation du complément était augmentée suite à une telle intervention¹³¹. Un prélèvement ayant été fait avant et après l'intervention a permis de constater une activité hémolytique totale diminuée suite à l'angioplastie. Les concentrations en facteur B étaient aussi diminuées. De tels résultats reflètent une activation du système du complément.

La chirurgie cardiaque (CABG) est associée avec une réponse inflammatoire systémique qui est accentuée lors de circulation extracorporelle. Lorsque le sang est exposé aux surfaces du circuit utilisé pour la circulation extracorporelle, il y a activation du complément, des leucocytes, des plaquettes, de la cascade de la coagulation de même qu'une production de cytokines. Dans ce processus, toutes les voies d'activation du complément semblent être impliquées. L'héparine et le matériel chirurgical employé qui est recouvert d'héparine réduisent cette activation du complément. Cependant, l'administration de la protamine, tel que mentionné précédemment, renverse l'effet de l'héparine et active ainsi la cascade du complément. Cette activation semble être induite par l'association du complexe protamine-héparine à la CRP, qui s'attache ensuite au fragment C1q de la voie classique¹³².

Les statines, utilisées dans l'inhibition de la synthèse du cholestérol, sont souvent utilisées chez les patients avec NSTEMI-SCA. Une étude a démontré que, *in vitro*, les statines n'avaient pas d'effet sur l'activation du complément¹³³. Incubés avec différentes statines, aucun des composants spécifiques des différentes voies d'activation du complément n'a été augmenté en concentration. Les effets des agents anti-plaquettaires sur l'activité du complément n'ont pas encore été clairement définis mais l'on

peut probablement s'attendre à ce que la cascade du complément y soit activée.

1.6 Thérapies anti-complément

Depuis que l'on sait que l'activation du complément est présente dans les plaques d'athérosclérose, beaucoup d'études ont ciblé l'activité du complément dans les syndromes coronariens aigus^{129,134}. Tel que vu précédemment, les dommages tissulaires ont rapidement été reliés à la formation du CAM. Que ce soit par l'activation de la voie classique, alterne ou lectine, le complexe formé suite à l'activation totale de la cascade possède des propriétés auto-destructives.

En général, les protéines de régulation du complément ont pour but de protéger les cellules contre les dommages d'une attaque du complément sur les cellules de l'hôte¹³⁵. Cependant, une mauvaise régulation du complément dans les maladies inflammatoires (infarctus aigu du myocarde, angine instable, ischémie) ou lors d'interventions chirurgicales où les tissus sont endommagés (reperfusion, pontages coronariens) peut endommager gravement les cellules de l'hôte et contribuer au développement d'un grand nombre de pathologies^{128,136,137}. Parce qu'une telle activation peut engendrer des dommages tissulaires irréversibles, il s'avère d'une grande importance de remédier à ce phénomène. Pour ce faire, des thérapies utilisent l'interruption sélective des protéines de la cascade du complément.

L'inhibition de la cascade du complément en des endroits stratégiques peut se faire de façon spécifique, tel que le font le Futhan-175¹³⁸⁻¹⁴⁰ (nafamostat mesilate), une protéase inhibitrice à large spectre, et les immunoglobulines. En effet, de fortes doses d'immunoglobulines peuvent inhiber les protéine C3 et C4 de même que l'assemblage du CAM^{141,142}. Plusieurs autres agents peuvent aussi inhiber de façon plus spécifique les protéines ou les différentes voies du complément. Le tableau VIII est un

résumé des différentes cibles du complément et des divers agents thérapeutiques utilisés pour inhiber la cascade d'activation.

Dès le début de la cascade d'activation du complément par la voie classique, une inhibition peut se faire. Le C1-INH est un petit peptide qui se lie au C1q de la voie classique de façon naturelle. Dans le but de prévenir et de traiter certaines pathologies associées à une déficience en C1-INH, des molécules de C1-INH provenant d'une banque de plasma humain sont maintenant couramment utilisées¹⁴³. Une formule recombinante de C1-INH a été produite⁷².

Alors que la voie alterne peut être inhibée par un anticorps monoclonal anti-facteur D, la voie lectine peut être inhibée par un anticorps monoclonal anti-MBL. Administrés chez des babouins soumis à une circulation extracorporelle hypothermique, l'Ac monoclonal anti-facteur D inhibait, comparativement aux contrôles, les composantes plasmatiques Bb, C3a, sC5b-9, la génération de CD11b sur les neutrophiles et les monocytes et réduisait les niveaux d'IL-6 et de CK-MB¹⁴⁴.

Un large spectre de protéines recombinantes du CR1 (sCR1) inhibe les C3- et C5-convertases en se liant aux fragments C3b et C4b. Ces sCR1 sont reconnus pour leur capacité à supprimer les dommages reliés à l'angioplastie, les traumatismes thermiques et l'inflammation causée par les complexes immuns. Le médicament dont l'appellation est TP10 est un exemple de sCR1 recombinant qui est présentement à l'étude chez l'humain^{145,146}. Depuis sa toute première découverte, beaucoup de modifications ont été apportées à ce bloqueur de C3 et de C5 convertases. Une des altérations possibles au sCR1 offre à la molécule un caractère inhibiteur spécifique pour la voie alterne, laissant intacte la voie classique dans le but de continuer à éliminer les complexes immuns par la voie classique¹⁴⁷. Ainsi cet agent inhibiteur de deuxième génération, le sCR1[desLHR-A], est plus spécifique et plus efficace que les agents de première génération. Parmi tous les antagonistes découverts, le Compstatin

est l'inhibiteur de C3 le mieux connu¹⁴⁸. Ce polypeptide synthétique est entre autre un inhibiteur peptidique du C3, c'est-à-dire que cette petite molécule spécifique inhibe le clivage de C3 en C3b et C3a^{148,149}. Bien qu'il ait offert de bons résultats chez le modèle animal¹⁵⁰, les tests *in vivo* de Compstatin ont été limités à cause de leur spécificité de liaison chez certaines espèces seulement. Parce que l'une des stratégies importantes vise à imiter l'action des inhibiteurs solubles et des récepteurs du complément qui régulent l'activation du complément^{23,151}, plusieurs types de protéines régulatrices synthétiques voient le jour. La première stratégie vise à inhiber le complément par des peptides spécifiques aux récepteurs de ce dernier, tels les C3aR et C5aR. La deuxième stratégie fait référence aux nombreuses glycoprotéines de surface et implique des agents qui portent le nom de «régulateurs de l'activité du complément» (RCA) car ils préviennent les dommages engendrés par une activation du complément. Parmi les RCAs les plus étudiés on retrouve le DAF, le MCP, la clusterine et la protectine¹⁵².

Une autre protéine ciblée dans l'inhibition de la cascade est le C5^{67,153}. En bloquant le complément à ce niveau, les effets normaux du système de défense assurés par les voies en amont du C5 sont intacts: ainsi, les agents infectieux sont quand même éliminés et plusieurs fonctions du système immunitaire demeurent inchangées. Le C3 et les autres fragments précédents de la cascade conservent leur fonction dans la prévention contre les maladies. En attaquant le point central du complément, on inhibe la voie la plus propice à l'apparition de plusieurs maladies associées particulièrement à l'ischémie. Le C5a est une anaphylatoxine majeure qui est grandement pro-inflammatoire, tout comme le complexe C5b-9. Une surproduction de ces dernières entraîne une vasoconstriction ainsi qu'une trop grande activation des leucocytes et des plaquettes. Plusieurs facteurs tissulaires et endothéliaux, telles les molécules d'adhésion cellulaire, sont également relâchés en plus grand nombre et amènent les globules blancs du sang à adhérer à la paroi de l'endothélium. Des dommages tissulaires, tels

l'ischémie, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance rénale sont particulièrement présents lors de la suractivation de ces facteurs. Les thérapies spécifiques à C5 auront donc pour effet de diminuer de façon significative l'inflammation et les dommages tissulaires subséquents. Cette inhibition thérapeutique du complément cible en premier lieu les pathologies auto-immunes ou maladies coronariennes. Les anticorps monoclonaux anti-C5 ont fait leur apparition dans le but de prévenir la progression de la cascade terminale dans les lésions ischémiques¹⁵⁴. Le pexelizumab^{67,153} a été testé dans le cadre des complications relatives aux pontages coronariens, aux infarctus aigus du myocarde ou à l'angioplastie. L'usage d'anticorps monoclonaux dirigés contre les fragments C5 humains a démontré qu'en bloquant le clivage du C5, l'activation des leucocytes et des plaquettes était inhibée¹⁵⁵. Finalement, la conclusion clé de ces études est qu'une telle inhibition de la cascade terminale protège effectivement les tissus.

Cible	Agent
Non spécifique	Futhan Hautes concentrations d'Ig
Voie classique -C1q	Peptide C1q
Voie lectine -MBL	Ac monoclonal anti-MBL
Voies classique et lectine	C1-INH
Voie alterne	Ac monoclonal Anti-factor D sCR1 [des LHR-A]
C3 et C5 convertase C3 convertase	RsCR1 Compastatin
Voie terminale -C5 -assemblage du C9	Ac monoclonal Anti-C5 (pexelizumab) Clusterin (CD59) conjugués
Anaphylatoxine	Ac monoclonal Anti-C5a
Récepteurs du complément -C3aR -C5aR	peptide peptide
Régulateurs de l'activité du complément -MCP (CD46)	sMCP rMCP
-DAF (CD55) -CD59	Crry --

Tableau VIII. Cibles et thérapies relatives à l'inhibition de l'activité du complément.

1.7 Interrogations non résolues

Bien que les connaissances sur l'activation du système du complément, ses mécanismes de régulation, son rôle dans les maladies autoimmunes et inflammatoires, dont les pathologies cardiovasculaires, progressent à un rythme impressionnant, de nombreuses interrogations demeurent à résoudre;

1) Quels sont, précisément, les mécanismes inflammatoires impliqués lors de la rupture de la plaque d'athérosclérose?

Des études plus approfondies sur le mécanisme moléculaire de la formation de la plaque sont capitales dans l'étude du mécanisme d'athérosclérose.

2) Quelle est l'implication du complément dans les SCA avec ou sans nécrose myocardique, son rôle dans la physiopathologie de la plaque instable et quelles corrélations peut-on établir avec les autres marqueurs d'inflammation?

Le système du complément joue un rôle fondamental dans l'inflammation et l'auto-immunité, mais n'a été que peu étudié dans les SCA sans élévation du segment ST. Récemment, nous démontrions, dans une étude multicentrique impliquant des patients avec IM aigu traité par angioplastie primaire, une diminution de la mortalité en bloquant la voie terminale du complément avec en parallèle une diminution des marqueurs d'inflammation. Une étude plus approfondie du mécanisme d'activation du complément dans les SCA sans élévation du segment ST s'avère d'une grande utilité.

3) Quelle est l'importance relative de l'activation des voies proximales et de la voie terminale du complément, particulièrement lors de SCA?

Des tests impliquant des marqueurs spécifiques des différentes voies seront requis pour obtenir réponse à cette question.

4) Quels types de courbes dose-réponse l'activité des voies tracera-t-elle suite à l'ajout d'agonistes (protéine C-réactive (CRP), lipopolysaccharides (LPS)) et d'antagonistes (NaCl, anti-properdine) sélectifs du complément?

Des tests ciblant l'activité hémolytique du complément suite à l'ajout de divers agents inhibiteurs et activateurs spécifiques des différentes voies du complément, et ce dans différentes concentrations et conditions de température, devront être investigués et validés.

5) Quelle corrélation existe-il entre les bénéfices cliniques du blocage de C5 par un anticorps monoclonal (pexelizumab) dans l'IM et les niveaux sériques de CRP et de cytokines?

Une étude antérieure a démontré que l'utilisation de pexelizumab ne diminuait pas la taille de l'infarctus mais diminuait la mortalité chez les patients avec IM subissant une intervention coronarienne percutanée. Qu'en est-il des marqueurs de l'apoptose et d'autres cytokines médiateurs de l'inflammation?

6) Quelle sera l'activation des cellules sanguines circulantes en parallèle avec les études ci-haut, incluant celle des neutrophiles, des cellules endothéliales et des endothéliales primitives (CD34+), et finalement celle des agrégats hétérotypiques plaquettaires?

Lors de son activation, le système du complément active et favorise la sécrétion de plusieurs types de cellules, tel que vue dans les sections précédentes. Par conséquent, il devient important de connaître son impact

sur ces cellules (i.e. neutrophiles, cellules endothéliales, cellules endothéliales primitives (CD34+), agrégats hétérotypiques plaquettaires) suite à diverses activations ou inhibitions, qu'elles soient *in vitro* ou *in vivo*.

7) Par quelles méthodes pourra être détectée l'apoptose des cellules circulantes, tels les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules endothéliales primitives (CD34+) et les agrégats plaquettaires?

Une sérieuse investigation et puis une validation des différentes méthodes pour détecter l'apoptose des cellules circulantes énumérées ci-dessus seront nécessaires.

8) Quelle est l'influence de certains états inflammatoires sur la réponse à la médication anti-thrombotique?

La réponse plaquettaire à des médicaments anti-plaquettaires, tel le clopidogrel, semble être sensible aux anticoagulants sanguins utilisés *ex vivo*. De plus amples études seront conduites dans le but de tester l'influence des médications anti-thrombotiques sur divers états inflammatoires.

Les réponses à ces multiples questions auront pour objectif d'établir une meilleure connaissance du rôle du système du complément, particulièrement dans les syndromes coronariens aigus, en plus d'élargir notre compréhension des mécanismes survenant lors de la réponse inflammatoire^{67,153,155-157}. L'élaboration de telles études pourrait avoir une portée clinique importante; la poursuite de ce projet permettra de soutenir l'amplitude du lien relativement peu exploré entre l'inflammation, l'immunité, la thrombose et l'apoptose. Les études ultérieures qui découleront de ce projet pourront éventuellement conduire à l'élaboration de nouvelles thérapies innovatrices apportant un contrôle plus fondamental de la maladie en phase aiguë et en prévention secondaire.

2 Hypothèses et objectifs

Bien que le système du complément soit reconnu pour son rôle prédominant dans les réactions inflammatoires et immunitaires, il n'en demeure pas moins qu'il reste encore peu connu pour son implication dans la physiopathologie des syndromes coronariens aigus (SCA) sans élévation du segment ST.

Les patients inclus dans l'étude actuelle présentent soit de l'angine stable, soit une ischémie mais dont l'élévation du segment ST n'est pas présente. Ces derniers sont donc atteints soit d'angine instable (UA), soit d'infarctus du myocarde sans élévation du segment ST (NSTEMI) qui conduira habituellement à un infarctus du myocarde sans onde-Q. Les manifestations de tels NSTEMI-SCA sont très fréquentes dans la maladie coronarienne. Notre étude porte sur ce type de patients car, malgré que les NSTEMI-SCA soient les syndromes les plus fréquents dans la maladie coronarienne, peu d'études ont mis en relation ce type de SCA et l'activation du complément.

L'hypothèse de mon travail était que différents composants de la cascade du complément sont significativement activés chez les patients se présentant avec un SCA sans élévation du segment ST.

Le premier objectif visé fut donc de décrire l'activation des différents composants de la cascade d'activation du complément chez des patients présentant un SCA sans élévation du segment ST. Par la suite, les niveaux des protéines activées ont été corrélés avec ceux des principaux marqueurs d'inflammation (protéine-C réactive, interleukine-6) et de nécrose cellulaire myocardique (Troponine-T).

3 Contribution originale (article)

Sujet de l'article scientifique:

L'activation du système du complément dans les syndromes coronariens aigus sans élévation du segment-ST.

Soumis à HEART

**Activation of the complement system in non-ST-segment
elevation acute coronary syndromes**

Catherine Martel, Pierre Thérout, Richard Gallo, Marta Ghitescu,
The Minh Luong, Joël Lavoie.

Short title: Complement activation in ACS

From the Department of Medicine, Montreal Heart Institute and University of
Montreal, Montreal, Canada

Financial sources: COPSE Grant, School of Medicine, University of Montreal

Total word count: 3978

Address correspondence to Pierre Thérout, MD, 5000 Belanger Street East,
Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8.

Phone: (514) 376-3330 ext. 3616

Fax: (514) 376-1076

E-mail: pierre.theroux@icm-mhi.org

ABSTRACT

Objective: To assess the activation of the complement system and its relation to presence of cell necrosis and inflammation markers in non-ST-segment acute coronary syndromes (NSTE-SCA).

Setting: Inflammation is closely linked to the pathophysiology of ACS. Although the complement system has major roles in inflammation and immunity, little is known on its implication in NSTE-ACS.

Design: Measurements of plasma concentrations of selected proteins of the classical (C3a, C4a), alternative (C3a, Bb) and terminal (C5a, sC5b-9) activation pathways, and of troponin T, (TnT), C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) levels.

Patients: A total of 108 individuals: 33 with ACS, 19 having elevated TnT and 23 elevated CRP levels, along with 25 patients with stable coronary artery disease (sCAD) and 50 normal controls.

Results: Compared with controls, all classical and alternative pathways were activated in ACS patients (C3a: $p=0.003$; C4a: $p<0.001$; Bb: $p=0.001$) and the terminal pathway activated in both ACS and stable CAD patients (C5a: $p=0.005$ and $p=0.021$, respectively; sC5b-9: $p=0.009$ and $p<0.001$, respectively). Among ACS patients, elevated TnT levels were associated with higher C4a levels ($p=0.012$). Higher CRP levels were correlated with all activated proteins ($p<0.05$), but not with sC5b-9. C3a, C4a, C5a and CRP levels increased from baseline to 48 hours after hospital admission ($p<0.05$).

Conclusions: The various complement pathways are activated in patients with an ACS. The presence of cell necrosis results in additional activation of the classical pathway whereas CRP levels are not proportionnal to the assembly of the sC5b-9 complex.

Key words: Acute coronary syndrome, complement, membrane attack complex, anaphylatoxin, C-reactive protein

INTRODUCTION

Atherosclerosis is associated with an inflammatory reaction that is heightened in patients with an acute coronary syndrome (ACS). Levels of C-reactive protein (CRP) and of other acute phase reactants and inflammation proteins are often elevated in these patients and are hallmarks of an adverse clinical outcome^{1,2}.

Although complement is the most important innate humoral defense against infection and has a major role in eliciting inflammation and autoimmune reactions, little is known on its role in ACS and the mechanisms involved in its activation. CRP is a well-recognized activator of the complement cascade³⁻⁶ and may be implicated in the pathophysiological mechanisms of atherosclerosis and of ACS⁷⁻⁹. Complement genes are expressed within human atherosclerosis¹⁰, and complement components within the human atherosclerotic plaque, the terminal component co-localizing frequently with CRP¹¹⁻¹³.

Previous studies on complement activation in coronary artery disease focused mainly on patients with an acute myocardial infarction, where complement activation is linked with ischemic and reperfusion injury¹²⁻¹⁶. The importance of this relationship is revealed in benefits of complement inhibition observed in both experimental^{16,17} and clinical settings^{18,19}. The complement system is mildly activated in patients with unstable angina, whereas it is not activated in patients with stable angina²⁰. In this study, levels of complement

proteins of the classical, alternative and terminal pathways in non ST-segment elevated ACS patients were compared to those observed in patients with stable CAD (sCAD) and in control individuals. Particular attention was given to its relationship with elevations of troponin T and C-reactive protein^{20,21}.

METHODS

Study population

The study consisted of 33 patients admitted to the coronary care unit for an ACS, 25 patients with stable coronary artery disease, and 50 normal individuals with no clinical evidence of cardiovascular disease. ACS was defined as the presence of one or more episodes of typical chest pain (10 minutes or more in duration) at rest within the previous 24 hours, along with ischemic ST-T changes on a 12-lead ECG and/or elevations of the serum troponin-T levels. Patients with persisting ST-segment elevation or a complete left bundle branch block and all subjects with any evidence of a chronic inflammatory disease were excluded. Signed informed consent was obtained from all participating individuals.

Blood sampling

Complement proteins, CRP and interleukin-6 (IL-6) levels were determined in ACS patients at hospital admission and 48 hours later, and TnT levels at admission and 12 hours later. Stable CAD and controls were measured for complement proteins, IL-6 and CRP at one time point.

Blood samples were collected atraumatically from an antecubital vein in a 5 ml tube containing ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) (BD Vacutainer™ K₃ EDTA) and in a 10 ml tube containing a coagulation activator (Vacutainer SST Gel & Clot Activator), and placed in ice. Fifty µl of a stock

solution of 5 mg/mL of nafamostat mesilate (Futhan™, BD PharMingen, Mississauga, Ontario, Canada) was added in the EDTA tube to a final concentration of 0.05 mg/ml immediately after the sampling. Futhan is a broad-spectrum protease inhibitor that prevents *ex-vivo* complement activation, particularly of C4a²². The 5 mL tubes were transported on ice while the 10 mL tubes were transported at room temperature to our laboratory. The tubes were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes at 4°C (5mL tubes containing EDTA/Futhan) and at room temperature (10 mL tubes). The plasma and serum were subsequently frozen at -70°C in aliquots of approximately 500 µL each for subsequent batch analysis with the same reagent kits.

Blood analysis

The plasma levels of C3a, C4a, Bb, C5a, sC5b-9 (BD PharMingen OptEIATM/Quidel, San Diego, California) and IL-6 (BIOSOURCE IL-6 EASIA kit, BioSource Europe S.A., Belgium) were analyzed by solid phase sandwich ELISA tests following the manufacturer's recommendations. All analyses were performed in duplicate on a Personal Lab-Routine ELISA (Adaltis Inc. Montreal, Quebec, Canada). The average of the two readings were used for data analysis. The minimum detectable concentrations for the various tests as reported by the manufacturer are: C3a, 7.3 ng/mL; C4a, 6.2 pg/mL; Bb, 0.007 µg/mL; C5a, 0,06 ng/mL; sC5b-9, 20.0 ng/mL; IL-6, 2.0 pg/mL. The intra-

individual and inter-individual reproductibilities are: C3a, 7% and 8.5%; C4a, 5.8 and 7.4%; Bb, 3.0 and 5.8%; C5a, 6.3 and 6.3 %; sC5b-9, 5.4 and 4.0%; IL-6, 5.6 and 7.5%). CRP levels were measured by immunonephelometry (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany) and TnT levels were measured by electrochemiluminescence (Roche Diagnostics Elecsys, Indianapolis, IN, USA). Values of CRP \geq 3.0 mg/L and of TnT $>$ 0.03 μ g/L were considered elevated in this study.

Statistical analysis

The primary analyses compared levels of complement proteins at 48 hours in ACS patients to those obtained in controls and stable CAD patients. Due to the skewed nature of many of the results, raw data are expressed as medians and interquartile ranges. Levels were log-transformed, for the complement component (C4a) and inflammation markers (CRP, IL-6) that did not closely resemble a normal distribution. The baseline and 48 hour results were compared using paired t-tests. Intergroup comparisons were implemented through a one-way ANOVA, with post-hoc tests via the Bonferroni method for pairwise comparisons. Analyses were repeated using analysis of covariance methods using baseline characteristics to adjust for slight imbalances in age, gender, body mass index, medical treatments and risk factors such as diabetes, dyslipidemia, hypertension and smoking status. A cross-correlation table between various parameters was built using

Pearson coefficients and subsequently tested for significance. P-values <0.05 from a two-sided test were considered to be statistically significant. The SPSS (v.10.0) statistical software package was used for statistical purposes.

RESULTS

Population

The baseline characteristics of individuals from the three study groups are summarized in Table I. ACS patients were slightly older than controls and stable patients; controls had a slightly higher proportion of women and had less risk factors. Standard antithrombotic therapy, like aspirin and clopidogrel, and investigative procedures, including coronarography and primary angioplasty when needed, were used for the management of ACS while some controls used aspirin or a statin for primary prevention, with two on clopidogrel due to an aspirin allergy.

Complement proteins

As seen in Table II, complement proteins increased slightly from baseline to 48 hours in ACS patients, C3a from 1099 to 1199 ng/ml ($p=0.037$), C4a from 105 to 129 pg/ml ($p=0.031$) and C5a from 5.80 to 6.87 ng/ml ($p=0.010$). Complement proteins Bb and sC5b-9 did not significantly change from baseline to 48 hours ($p=ns$).

Median concentrations and interquartile ranges for the various tests at 48 hours for ACS patients and controls and stable CAD patients are provided in Table III and illustrated in Figure 1. In ACS patients, all components of the classical and alternative pathways were higher compared with controls (C3a: $p=0.006$, C4a: $p<0.001$, Bb: $p=0.007$) and compared with stable CAD patients

(C3a: $p < 0.001$, C4a: $p = 0.029$ and Bb: $p = 0.030$). The terminal pathway was higher in both ACS (C5a: $p = 0.009$, sC5b-9: $p = 0.001$) and stable patients (C5a: $p = 0.021$, sC5b-9: $p < 0.001$) than in controls. In ACS patients, CRP and IL-6 levels were markedly elevated compared to controls ($p < 0.001$), with CRP being higher relative to sCAD subjects ($p < 0.001$). IL-6 ($p < 0.001$) was higher in sCAD than in controls, but not CRP. The procedures adjusting for age, sex, body mass index and risk factors reached the same conclusions.

As the subject of this study is the complement activation in artery disease, we assessed the correlation between all complement components in all patients undergoing coronary artery disease (Table IV). A strong correlation existed between levels of the proximal proteins C3a, C4a and Bb. C5a had a high correlation with C4a and Bb, whereas sC5b-9 did not appear to be related with any of those proteins.

Correlations with troponin T, IL-6 and CRP levels

The levels of complement proteins in ACS patients with and without troponin T leakage are compared in Figure 2. C3a, C5a, Bb and sC5b-9 levels are similar in either subgroup, whereas C4a levels are significantly higher in patients with elevated troponin ($p = 0.01$).

The two inflammation markers, IL-6 and CRP, were correlated. IL-6 was correlated with C4a and Bb, the proteins specific to both classical and alternative pathways, respectively. CRP levels were highly correlated with those of C3a and C4a but less with Bb and C5a; it appeared there was no

proportionnal correlation ($r=-0.225$, $p=0.089$) between CRP levels and sC5b-9 levels (Table IV, Figure 3).

DISCUSSION

This study documents an activation of complement in patients with a non-ST segment elevation acute coronary syndrome, and confirms the results of several previously published reports. In addition, it shows that the classical, alternative and terminal pathways are all activated regardless of cell necrosis, although higher levels of C4a levels are seen in its presence. It furthermore reports there were correlations between levels of CRP, IL-6 and most complement proteins that, however, are not present with those of the terminal component. The data further reinforces an association of complement activation with the pathophysiology of the unstable coronary artery lesions, additional activation of the classical pathway with myocardial infarction, and a non-proportionnal correlation between CRP and the assembly of the sC5b-9 complex.

Complement and ACS

The complement system is an extremely important innate humoral modulator of inflammation and autoimmunity. It involves numerous activators, modulators, and inhibitors. The classical, lectin and alternative proximal activation pathways all converge to the formation of a C3 convertase which cleaves C3 into C3a and C3b, and a C5 convertase cleaving C5 into C5a and C5b. The classical pathway is mainly antibody/antigen-mediated, thus implicating the C1 complex, C2 and C4. The lectin pathway bypasses the C1

complex and is activated by carbohydrates with the mannose terminal through MASPs, C2 and C4. The alternative pathway is cell surface activated, and the C3 convertase forms as a result of interactions of various proteins including C3b and factor B; factor H stabilizes its assembly.

C3a, C4a and C5a are potent anaphylatoxins involved in cellular immune response and in inflammation²³. C5b complexes with C6, C7, C8 and C9 to form the membrane attack complex (MAC), which is cytotoxic; when this does not occur, C5b complexes with C6, C7, and protein S to form sC5b-9, a soluble lytically inactive complex.

Although complement activation has long been recognized in acute myocardial infarction^{12-16,24}, very few studies have looked at its components in acute coronary syndromes with no or minimal cell necrosis^{20,21}. Yasuda *et al.*²⁰ described sC5b-9 elevations that were correlated with infarct size and a modest elevation of C3a in patients with acute myocardial infarction, but found no such elevations of sC5b-9 in unstable angina. They concluded that the strong complement activation observed in unstable angina with cell necrosis and self-limited activation did not progress to a formation of the terminal cytolytic pathway²⁰. A second study of 47 patients in unstable angina reported elevated sC5b-9 levels and CRP levels but did not assess proximal pathways^{20,21}.

In our study, the classical, alternative and terminal pathways were all activated as shown by elevations of C3a and C4a, C3a and Bb, and of C5a, respectively. Since proteins of this pathway were explicitly evaluated in our

study, the role of the lectin pathway in generating C4a cannot be ruled out. However, the levels of sC5b-9 were elevated to a lesser degree and tend to be inversely correlated with CRP levels.

Complement activation, troponin T, interleukin-6 and CRP

Interleukin-6 is produced by inflammatory cells and promotes the synthesis of CRP. In this study, elevations of both IL-6 and CRP were observed in concurrence with those of complement proximal proteins. This general inflammation was present without cell necrosis, as detected by the leakage of troponin T, a very sensitive marker of cardiomyocyte necrosis, suggesting a link with active inflammatory plaques exists. Troponin elevations are related to C4a elevation, which signifies further activation of the classical pathway or, alternatively, of the lectin pathway could be activated by cell necrosis. This activation can be related to several triggers released from infarcting myocardium including immune complexes, apoptotic material, phospholipids and mitochondrial proteins, and CRP, a well know activator of the classical pathway. Oxidative stress is also known to activate the lectin pathway.

Although CRP levels were elevated in most patients with activated proximal components, they were not correlated with the terminal component and even showed a slight trend towards being inversely correlated. The combination of this particular inhibition of the terminal complement with activation of the proximal pathways has been described as possibly allowing

debris to be removed from tissues and apoptotic cells, while at the same time preventing excessive inflammation and autoimmune responses mostly mediated by the MAC²⁵. Similarly, it was shown that low concentrations of enzymatically remodeled LDL (E-LDL) produced CRP-mediated activation of the proximal complement, whereas high concentrations activated the terminal complement sequence through CRP-independent mechanisms²⁶. These effects have been linked to the ability of CRP to bind factor H on binding sites distinct from the C3b binding site and inhibit assembly of the membrane attack complex²⁷.

Our data suggest that these mechanisms could be operative in NSTEMI-ACS. In such cases, CRP combined with factor H may target suppressions of the alternative pathway activation by lowering levels of inhibitors and may also accelerate inactivation of C3b in iC3b. In this scenario, CRP would stimulate the proximal complement pathways, producing anaphylatoxins that contribute to plaque inflammation, but at the same time inefficiently generating the sC5b-9 complex. The response to more extensive cell necrosis associated with larger infarction may still elicit more profound inflammation and cell death signaling, resulting in activation of the full complement cascade and production of the sC5b-9 complex. The higher C4a levels observed in this study in patients with TnT elevation are compatible with this hypothesis. The dissociation between activation of the proximal and the terminal pathway could be pathophysiologically important relative to the putative role of CRP in atherosclerosis and in acute coronary syndromes.

Study limitations and conclusions

This study had a small sample size and the observed results and hypotheses need to be validated in future appropriately designed studies. Ideally, patients with a large spectrum of manifestations of coronary artery disease and myocardial infarctions of various sizes would be investigated, allowing differential pathways to complement activation and the time course of their activation to be characterized. Complement is an innate and fundamental system that signifies the links between inflammation and immunity, and those between cell survival and death. It possesses highly pleiotropic effects that range from host protection to tissue demolition. This study is based on clinical events and does not allowed direct comparisons between TnT-elevated ACS subgroup and the controls and/or the sCAD patients. A better knowledge of complement's role at various levels in ACS may help in developing a better understanding of its pathophysiologic mechanisms, and complement modulation could eventually lead to more efficient therapies.

The local ethics committee approved this study, and there are no conflicts of interest with any of the authors.

REFERENCES

1. Liuzzo, G. et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* **331**, 417-24 (1994).
2. Lindahl, B., Toss, H., Siegbahn, A., Venge, P. & Wallentin, L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* **343**, 1139-47 (2000).
3. Mold, C., Gewurz, H. & Du Clos, T. W. Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* **42**, 23-30 (1999).
4. Volanakis, J. E. Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann N Y Acad Sci* **389**, 235-50 (1982).
5. Gabay, C. & Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* **340**, 448-54 (1999).
6. Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M. & Hemmes, M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 2348-54 (1999).
7. Pasceri, V., Willerson, J. T. & Yeh, E. T. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* **102**, 2165-8 (2000).
8. Zwaka, T. P., Hombach, V. & Torzewski, J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* **103**, 1194-7 (2001).
9. Verma, S. et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* **106**, 913-9 (2002).

10. Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G. & McGeer, P. L. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* **158**, 1039-51 (2001).
11. Torzewski, J. et al. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1386-92 (1998).
12. Nijmeijer, R. et al. C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am J Pathol* **163**, 269-75 (2003).
13. Schafer, H., Mathey, D., Hugo, F. & Bhakdi, S. Deposition of the terminal C5b-9 complement complex in infarcted areas of human myocardium. *J Immunol* **137**, 1945-9 (1986).
14. Griselli, M. et al. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med* **190**, 1733-40 (1999).
15. Langlois, P. F. & Gawryl, M. S. Detection of the terminal complement complex in patient plasma following acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* **70**, 95-105 (1988).
16. Vakeva, A. P. et al. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* **97**, 2259-67 (1998).
17. Amsterdam, E. A. et al. Limitation of reperfusion injury by a monoclonal antibody to C5a during myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol* **268**, H448-57 (1995).
18. de Zwaan, C. et al. Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* **23**, 1670-7 (2002).
19. Mahaffey, K. W. et al. Effect of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial

- infarction: the COMPLEMENT inhibition in myocardial infarction treated with thromboLYtics (COMPLY) trial. *Circulation* **108**, 1176-83 (2003).
20. Yasuda, M. et al. The complement system in ischemic heart disease. *Circulation* **81**, 156-63 (1990).
 21. Hoffmeister, H. M. et al. Comparison of C-reactive protein and terminal complement complex in patients with unstable angina pectoris versus stable angina pectoris. *Am J Cardiol* **89**, 909-12 (2002).
 22. Pfeifer, P. H., Kawahara, M. S. & Hugli, T. E. Possible mechanism for in vitro complement activation in blood and plasma samples: futhan/EDTA controls in vitro complement activation. *Clin Chem* **45**, 1190-9 (1999).
 23. Peerschke, E. I., Reid, K. B. & Ghebrehiwet, B. Platelet activation by C1q results in the induction of alpha IIb/beta 3 integrins (GPIIb-IIIa) and the expression of P-selectin and procoagulant activity. *J Exp Med* **178**, 579-87 (1993).
 24. Laine, P. et al. Evidence for complement activation in ruptured coronary plaques in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **90**, 404-8 (2002).
 25. Gershov, D., Kim, S., Brot, N. & Elkon, K. B. C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* **192**, 1353-64 (2000).
 26. Jarva, H., Jokiranta, T. S., Hellwage, J., Zipfel, P. F. & Meri, S. Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11. *J Immunol* **163**, 3957-62 (1999).

27. Bhakdi, S. et al. Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence. *Circulation* **109**, 1870-6 (2004).

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1

Plasma levels of activated complement proteins in normal individuals, patients with stable CAD and patients with a non-ST-segment acute coronary syndrome (ACS). All complement proteins are activated in ACS patients. $P < 0.05$: * significant difference between ACS and controls or ACS and sCAD.

Figure 2

Plasma levels of activated complement proteins in patients with a non-ST-segment acute coronary syndrome, according to troponin T elevation ($> 0.03 \mu\text{g/L}$).

Figure 3

Correlation between CRP levels and proteins of the various activation pathways. Note the decreasing values of sC5b-9 with increasing CRP levels. White circles are stable CAD patients, black triangles are ACS patients.

Table I. Baseline characteristics of individuals in the three study groups

	Ctrls (50)	Stable (25)	ACS (33)
Age (years)	61(7)	61 (6)	65(11)
Male (%)	62	76	75
BMI	28 (5)	28 (4)	28 (5)
Diabetes (%)	6	80	27
Dyslipidemia (%)	50	92	84
Family history (%)	64	68	55
Hypertension (%)	40	48	73
Current smoker (%)	14	28	30
Aspirin (%)	26	68	100
Clopidogrel (%)	4	28	79
Statins (%)	24	96	82

Table II. Comparisons of complement proteins and inflammation markers between baseline and post-baseline in 33 (ACS) patients

	Base (n=33)	24-48h (n=33)	<i>p</i>
C3a (ng/mL)	1099 (1039-1176)	1199 (1124-1253)	0.037
C4a (pg/mL)	105 (90-159)	129 (108-164)	0.031
Bb (ng/mL)	1.11 (0.89-1.39)	1.09 (0.84-1.45)	0.728
C5a (ng/mL)	5.80 (4.53-7.88)	6.87 (5.42-8.02)	0.010
sC5b-9 (ng/mL)	139.6 (117.0-162.3)	151.2 (108.8-185.1)	0.398
CRP (mg/L)	5.22 (1.91-11.81)	6.80 (4.87-11.89)	0.012
IL-6 (pg/mL)	13.54 (8.57-17.99)	12.62 (6.90-20.16)	0.712

Comparisons using paired t-test.

Table III. Comparisons of complement proteins and CRP levels between controls, stable coronary artery disease (sCAD) and acute coronary syndrome (ACS) patients

	Controls (n=50)	sCAD (n=25)	ACS (n=33)	<i>p</i> -value	<i>p</i> (<i>adj</i>)
C3a (ng/mL)	977 (776- 1215)	949 (852-1099)	1199 (1124- 1253)	<0.001*†	0.001*†
C4a (pg/mL)	88 (75-111)	95 (80-135)	129 (108-164)	<0.001*†	0.001*†
Bb (ng/mL)	0.90 (0.75- 1.09)	0.94 (0.73-1.15)	1.09 (0.84-1.45)	0.001*†	0.034*†
C5a (ng/mL)	5.78 (4.79- 6.76)	7.45 (5.35-8.06)	6.87 (5.42-8.02)	0.002*	0.041*
sC5b-9 (ng/mL)	98.3 (70.7- 142.4)	168.7 (134.9- 222.0)	151.2 (108.8- 185.1)	<0.001*	<0.001*
CRP (mg/L)	1.44 (0.75- 3.50)	1.91 (1.42-2.75)	6.80 (4.87- 11.89)	<0.001*†	<0.001*†
IL-6 (pg/mL)	5.19 (3.57- 8.55)	11.29 (8.52- 14.18)	12.62 (6.90- 20.16)	<0.001*	<0.001*

*Significant difference between ACS and controls.

†Significant difference between ACS and sCAD.

P-value: Using one-way ANOVA for comparisons between 3 groups, pairwise comparisons via Bonferroni method. *P* (*adj*): *p*-values from an ANOVA adjusting for age, gender, BMI, hypertension, diabetes, dyslipidemia and smoking status.

Table IV. Correlations between the various protease-activated complement components in stable CAD (n=25) and ACS (n=33) patients.

	C4a	Bb	C5a	sC5b-9	CRP	IL-6
C3a	0.486**	0.354**	0.094	-0.255	0.544**	-0.094
<i>p</i>		<i>0.008</i>	<i>0.496</i>	<i>0.060</i>	<i>0.000</i>	<i>0.497</i>
C4a		0.479**	0.384**	0.068	0.380**	0.262*
<i>p</i>		<i>0.000</i>	<i>0.003</i>	<i>0.611</i>	<i>0.003</i>	<i>0.047</i>
Bb			0.343**	-0.038	0.288*	0.329*
<i>p</i>			<i>0.008</i>	<i>0.777</i>	<i>0.028</i>	<i>0.012</i>
C5a				-0.003	0.271*	0.087
<i>p</i>				<i>0.980</i>	<i>0.040</i>	<i>0.517</i>
sC5b-9					-0.225	0.121
<i>p</i>					<i>0.089</i>	<i>0.368</i>
CRP						0.268*
<i>p</i>						<i>0.042</i>

Pearson correlation coefficient between complement proteins and inflammation markers, p-values in italics.

** Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the .05 level (2-tailed).

Figure 1

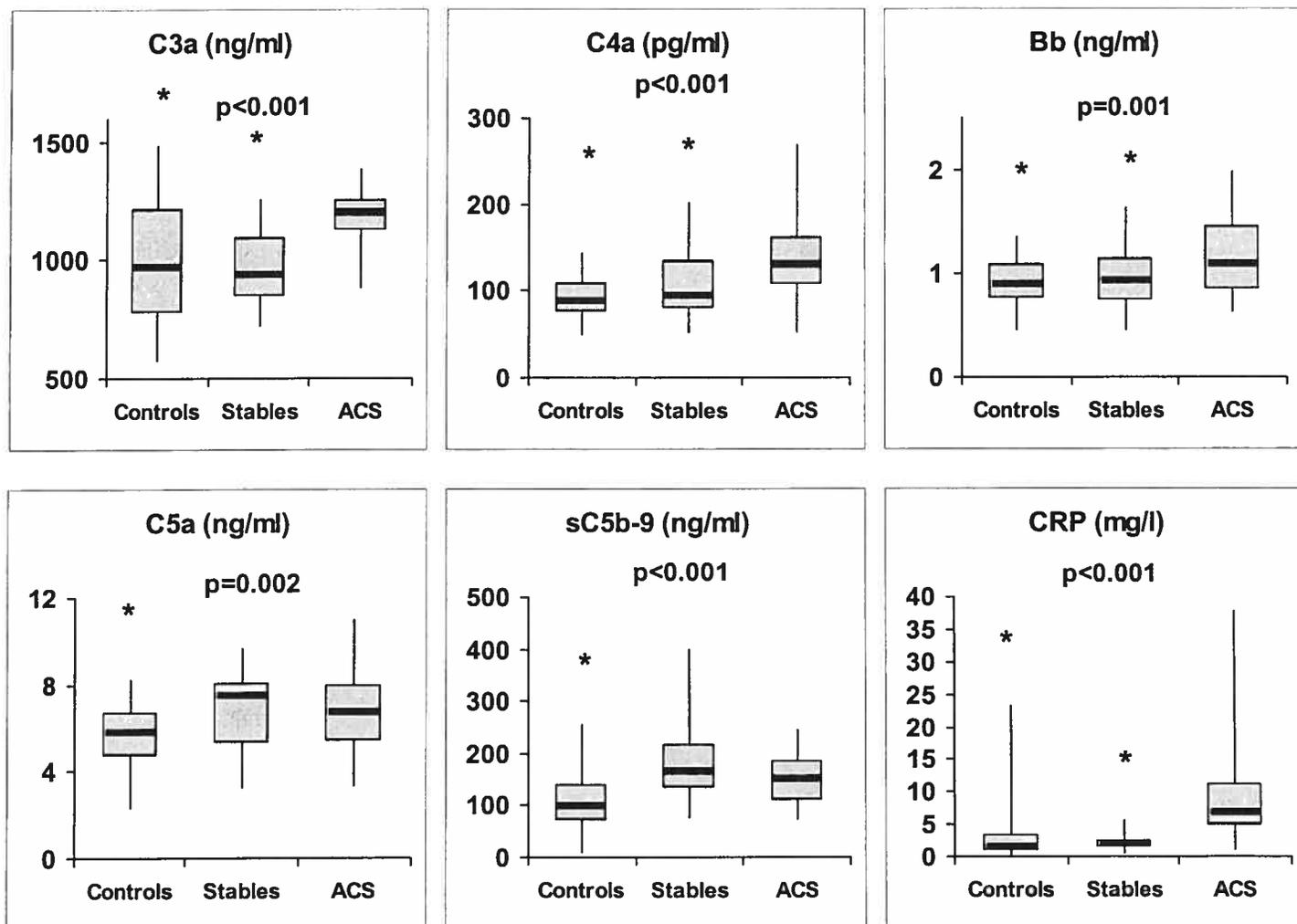


Figure 2

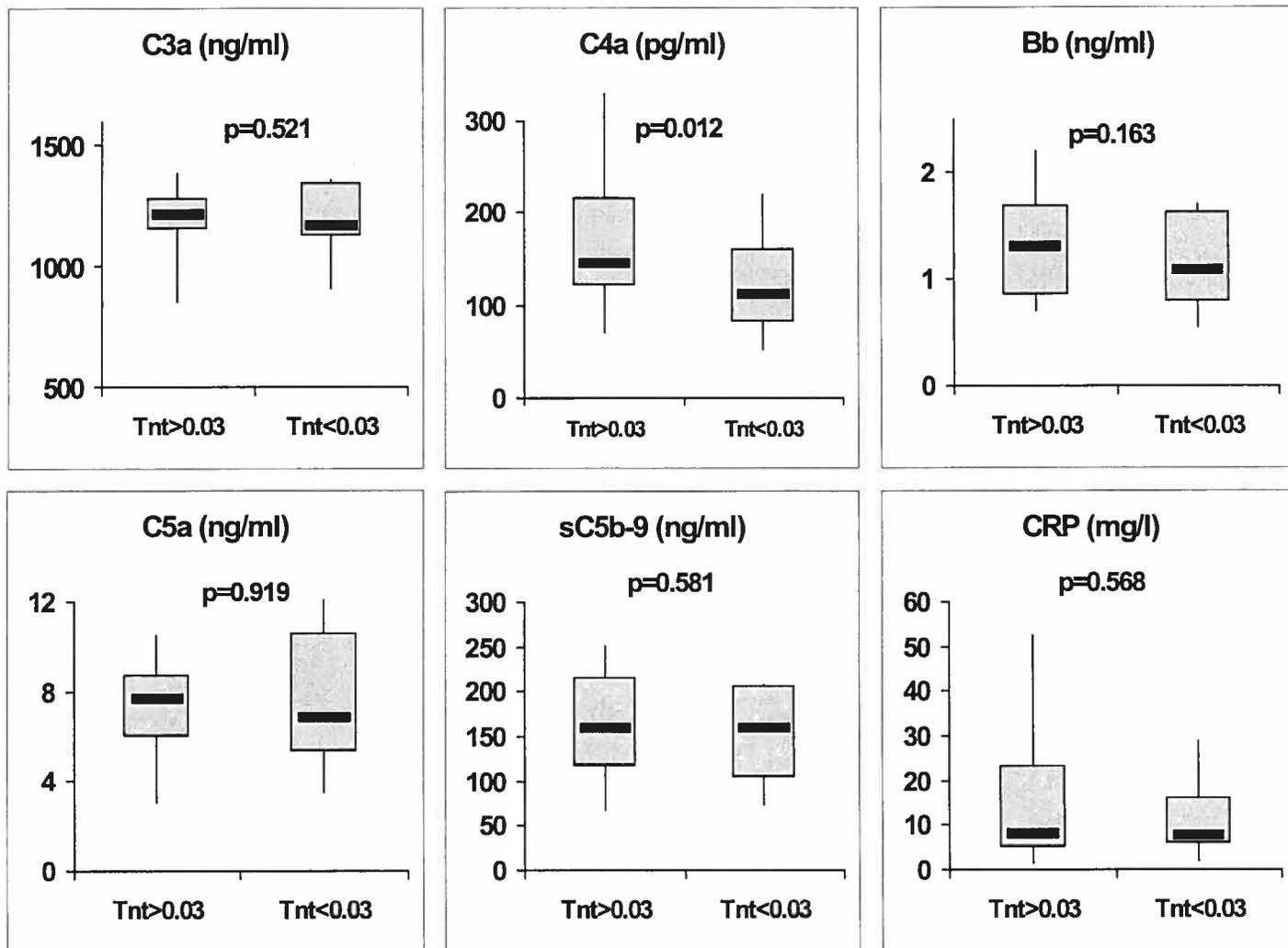
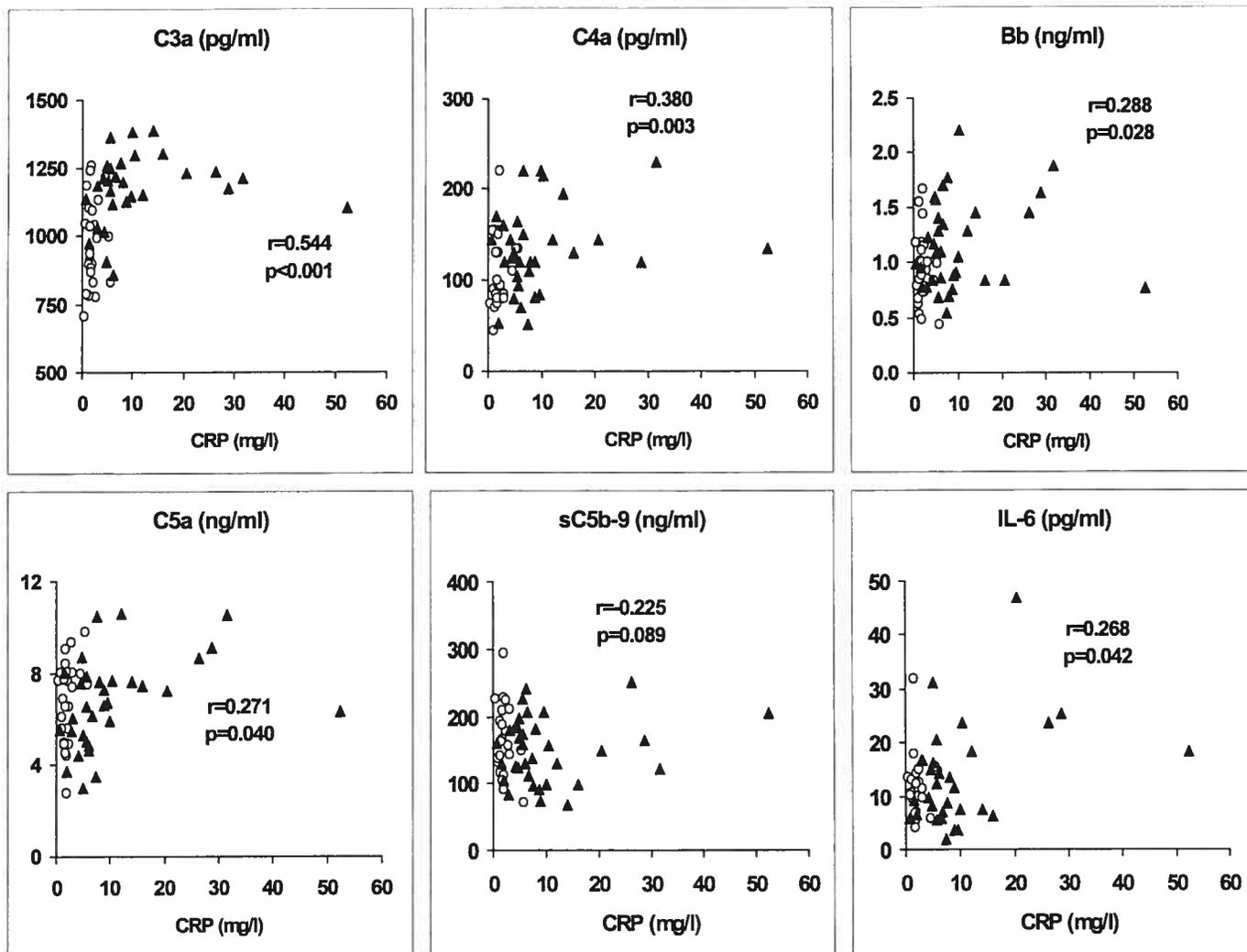


Figure 3



4 Discussion

Par la synthèse des protéines découlant de son activation, le système du complément figure comme l'un des mécanismes les plus importants impliqués dans la défense de l'hôte. Différents mécanismes résultant de l'initiation de la cascade d'activation du complément sont impliqués tant dans l'immunité que dans l'inflammation. Toutes les voies proximales impliquées dans la cascade d'activation du complément convergent à la formation d'une C3 convertase qui scinde le C3 en deux produits de coupure, le C3a et le C3b. Par la suite, une C5 convertase se forme et scinde à son tour le C5 en C5a et C5b. L'activation du complément par la voie classique est principalement dépendante de la présence d'un complexe antigène/anticorps, impliquant à son origine le complexe C1 et les fragments C2 et C4. L'activation de la voie lectine se rapproche beaucoup de celle établie dans la voie classique, à l'exception que cette voie n'implique pas la présence du complexe C1 mais est plutôt initiée par la présence d'hydrates de carbone avec une structure terminale mannose. Cette activation se fait grâce aux fragments C2, C4 et à des protéines appelées MASPs. La voie alterne est activée par un mécanisme impliquant la surface cellulaire des cellules cibles. La C3 convertase ainsi formée résulte en l'interaction de plusieurs protéines, incluant le fragment C3b et le facteur B. Le facteur H stabilise l'assemblée de cette convertase.

La génération des anaphylatoxines, C3a, C4a et C5a, induit principalement une réponse inflammatoire, entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire, du recrutement, de la chimiotaxie et de l'activation des leucocytes. L'implication des autres fragments consiste surtout à l'opsonisation des antigènes, à l'élimination des complexes immuns et à la lyse des cellules étrangères. Le fragment C5b se lie aux fragments C6, C7 et C8, respectivement pour ensuite s'attacher au fragment C9 dans le but de former le complexe d'attaque membranaire (CAM) qui est cytotoxique et

cytolytique. Dans le but de prévenir la cytotoxicité en empêchant l'insertion de ce complexe dans la membrane de la cellule cible, le complexe se lie à la protéine S pour former le complexe sC5b-9. L'activité lytique du complexe devint alors inefficace. Le complément est un système hautement régulé qui est aussi impliqué dans des activités pro-inflammatoires et pro-coagulantes.

Le présent article documente l'activation du système du complément chez des patients avec SCA sans élévation du segment ST. Les principaux points soulevés dans cette contribution originale sont : 1) une légère augmentation des niveaux des anaphylatoxines (C3a, C4a et C5a) et de la CRP est notée 48 heures après l'admission ($p < 0.05$); 2) comparativement aux sujets sans maladie coronarienne connue, une activation des voies classique et alterne du complément a été observée chez les patients avec SCA (C3a: $p = 0.003$; C4a: $p = < 0.001$; Bb: $p = 0.001$) alors qu'une augmentation de la voie terminale a été observée à la fois chez les patients avec SCA et avec sCAD (C5a: $p = 0.005$ et $p = 0.021$, respectivement; sC5b-9: $p = 0.009$ et $p < 0.001$, respectivement); 3) parmi les patients avec SCA, des TnT élevées ont été associées avec des niveaux plus élevés de C4a ($p = 0.012$); 4) des niveaux élevés de CRP ont été associés avec des niveaux élevés de toutes les protéines activées ($p < 0.05$), à l'exception du sC5b-9; 5) une indépendance marquée, voire même des concentrations qui pourraient s'avérer inversement proportionnelles advenant une population plus grande, entre les niveaux de CRP et la formation de sC5b-9. Par conséquent, les différences, mais aussi les ressemblances, reliées aux mécanismes d'activation de chacune des voies pourraient permettre une meilleure compréhension de l'implication du système du complément dans les SCA.

Dans le but d'éclaircir notre vision sur le complément, des études concernant l'implication des différentes voies d'activation du complément sont présentement en cours dans notre laboratoire.

Beaucoup d'études antérieures ont établi l'existence d'une étroite relation entre l'activation du complément et l'infarctus aigu du myocarde. En

dépit de ce fait, très peu d'études se focalisent sur l'implication de ce même système dans les syndromes coronariens aigus avec nécrose cellulaire myocardique minimale. À quelques reprises, des chercheurs ont rapporté, chez des patients avec infarctus aigu du myocarde, une interdépendance entre les niveaux de sC5b-9 et la taille de l'infarctus^{128,129}. En bloquant le complément au début de la cascade terminale, c'est-à-dire la cascade initiant la formation du CAM, un autre groupe de chercheurs croyait pouvoir diminuer la taille de l'infarctus^{67,153}. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre le C5, le pexelizumab, s'est avérée négative dans la quête de cet objectif. Cependant, de cette même étude, une diminution du nombre de décès reliés à l'infarctus fut établie. Par conséquent, cette étude entraîne l'hypothèse que des facteurs, autres que la taille de l'infarctus, soient étroitement reliés à l'activation du complément.

Lors de l'angine instable, seule une petite élévation du fragment C3a avait été décelée alors que cette pathologie ne semblait aucunement impliquer l'élévation du fragment sC5b-9^{67,153}. Une autre étude a été conduite chez le même type de patients, mais cette fois en rapportant une élévation des niveaux du fragment sC5b-9 en corrélation avec les niveaux de CRP, sans cependant étudier l'activation des voies proximales. C'est la vision globale et surtout l'entrecroisement de toutes ces études qui a entraîné la nécessité de conduire le présent projet.

Dans notre étude, deux prélèvements sanguins ont été effectués chez les patients avec SCA : l'un lors de l'admission à l'hôpital et l'autre 48 heures après l'admission. Un seul prélèvement a été nécessaire pour les sujets sains ou avec sCAD. L'analyse des divers composants du complément et des différents marqueurs de l'inflammation nous a permis d'établir une première corrélation entre les différents niveaux d'activation du complément et le degré d'inflammation. Tel que le dévoile le tableau II de mon article, l'hypothèse voulant que les fragments de la voie classique soient les premiers à être générés lors des premiers signes d'inflammation est appuyé. En effet, les

niveaux des fragments C3a, C4a et C5a, de même que la CRP ont augmenté dans les 48 heures suivant le premier prélèvement. Le marqueur IL-6, interleukine à l'origine de la production hépatique de la CRP, semble avoir déjà été augmentée préalablement. La croissance des niveaux des protéines activées de la voie classique va de pair avec celle des niveaux de la CRP, suggérant que la CRP serait à l'origine de cette activation. La voie alterne, puis la voie terminale, serait activée dans un deuxième temps, soit suite à la synthèse des produits d'activation de la cascade de la voie classique, qui eux sont augmentés dans les 48 premières heures après le début des symptômes. La synthèse de C3b par la voie classique, tel que vu dans les chapitres précédents, peut être à l'origine de l'activation de la voie alterne, ou plus précisément à l'origine de la boucle d'amplification de cette voie. La production d'anaphylatoxines (C3a, C4a et C5a) suite à l'activation de la voie classique est à l'origine de l'augmentation de l'inflammation au site de la lésion. Par conséquent, l'apport de l'augmentation de cette inflammation sera propice à l'élévation des niveaux du CAM.

Contrairement à l'une des études relatées ci-haut, le présent projet montre que chez les sujets avec NSTE-SCA, comparativement aux sujets sans maladies coronariennes connues, les voies classique, alterne et terminale du complément sont activées, tel que le certifie l'élévation des fragments C3a et C4a, C3a et Bb, et C5a, respectivement (figure 1, tableau III). Parce que les protéines de ces voies ont été spécifiquement étudiées dans cette étude, le rôle de la voie lectine dans la génération du fragment C4a n'a pu être évalué. Le complexe sC5b-9 a, quant à lui, semblé être moins formé que les autres fragments activés et tendait à ne pas être corrélé avec les niveaux de CRP (figure 1).

En bref, il semble donc que la présence d'inflammation associée ou consécutive à la déstabilisation de la plaque en cause dans les SCA, augmente l'activation du système du complément. Ainsi, l'activité totale du

complément est largement supérieure chez les patients avec SCA par rapport aux sujets sans maladie coronarienne connue.

Tel que décrit dans la littérature, l'IL-6 est une interleukine produite par les cellules inflammatoires et engendre la synthèse de CRP par les cellules du foie. Dans cette étude, une élévation des niveaux de la CRP et de l'IL-6 est observée en concordance avec celle des protéines des voies proximales. Cette inflammation semble être indépendante de la présence de nécrose cellulaire. Aucune activation générale du complément n'est observée en relation avec les niveaux de TnT, marqueur ultrasensible de la nécrose des cardiomyocytes. Cependant, une élévation des troponines semble avoir entraîné une activation additionnelle de la voie classique (augmentation du C4a avec une élévation de la TnT). Ces observations suggèrent un lien étroit entre l'activation du complément et la plaque athérosclérotique active. Étant donné l'homologie entre la voie lectine et la voie classique, l'élévation des TnT pourrait avoir entraîné, le cas échéant, une activation additionnelle de la voie lectine. De tels phénomènes pourraient être reliés aux différentes substances pro-inflammatoires relâchées lors de la nécrose des cardiomyocytes lors d'un infarctus du myocarde. Parmi ces éléments initiateurs figurent les complexes immuns, les cellules apoptotiques, les phospholipides, les protéines mitochondriales, la CRP et le stress oxydatif. Tous ces éléments sont des initiateurs probables de l'une ou l'autre des voies d'activation du complément, tel que mentionné dans les sections précédentes.

En analysant de pair la figure 3 et le tableau IV, nous pouvons observer que, bien que les niveaux de CRP soient en étroite corrélation avec les protéines des voies proximales du complément, une légère corrélation négative, bien que non significative, semble être dessinée entre les niveaux de CRP et ceux du sC5b-9. L'inhibition du complexe terminal de pair avec l'activation des voies proximales s'avèrerait très utile dans l'élimination de débris cellulaires mais aussi dans la prévention d'une inflammation excessive

et d'une réponse autoimmune, principalement contrôlées par le CAM. De façon similaire, il a été démontré que des concentrations faibles de LDL enzymatiquement modifiés (E-LDL) produiraient une activation des composants proximaux du complément par un mécanisme dépendant de la CRP, alors que des concentrations élevées de E-LDL activeraient la voie terminale du complément par un mécanisme indépendant de la CRP. Ce phénomène est étroitement relié à l'habileté que possède la CRP à lier le facteur H. En effet, la CRP se lie de façon covalente au facteur H, protéine soluble dont la fonction principale est de stabiliser, à l'aide du facteur I, la C3 convertase de la voie alterne. En se liant au facteur H par des sites distincts de ceux utilisés pour lier le C3b, la CRP semble amplifier le clivage du C3b par le facteur H. De plus, cette liaison permet de cibler la suppression de l'activation de la voie alterne en diminuant les niveaux des protéines régulatrices qui inhibent habituellement cette voie. De cette façon, l'inactivation de C3b en iC3b serait accélérée et la formation du complexe d'attaque membranaire en serait diminuée.

Les données que nous avons obtenues favorisent grandement ces hypothèses chez les patients avec SCA. Ainsi, la liaison covalente entre la CRP et le facteur H engendre une diminution des niveaux des protéines inhibitrices de cette voie et serait la cause d'une suppression de l'activation de la voie alterne. De cet angle, nous pouvons avancer que la CRP stimulerait l'activation des voies proximales, favorisant une augmentation des niveaux des anaphylatoxines qui contribuent à l'inflammation de la plaque et, de manière parallèle, ne corrèlerait pas avec la formation du complexe sC5b-9, marqueur de l'activation globale du complément. Ainsi, les propriétés à la fois cytolytique et cytotoxique qu'engendre un tel complexe seraient grandement diminuées. Le sC5b-9 est en fait la forme soluble du CAM et ne s'insère pas dans les membranes des cellules pour y entraîner la lyse. Cependant, dans les études actuelles, le sC5b-9 représente l'activation totale

du complément et son activation est associée avec une activation de la voie terminale, donc du CAM.

Tel que rapporté dans le tableau II de mon article, la présence de nécrose cellulaire est corrélée avec les niveaux de C4a en corrélation avec une activation additionnelle de la voie classique. L'hypothèse plausible dans ce cas se baserait sur le fait qu'une nécrose cellulaire croissante est évidemment associée avec une taille d'infarctus supérieure. De ce fait, un infarctus imposant fait inévitablement jaillir une inflammation et un signal de mort cellulaire plus prononcés, résultant ainsi en une activation totale du système du complément, y compris une augmentation de la synthèse du CAM. Un tel processus permet de mieux schématiser et comprendre la dissociation qui existe entre l'activation des composants proximaux et terminaux de la cascade du complément. Une distinction de la sorte pourrait s'avérer importante d'un point de vue physiopathologique dans l'étude du rôle présomptif de la CRP dans l'athérosclérose et les syndromes coronariens aigus. Cet article démontre les effets de la présence d'une nécrose myocardique sur l'activation du complément. Cependant, les résultats de l'étude ne permettent pas de corréler les niveaux de TnT et l'activation du complément chez tous les groupes de patients. En effet, les résultats ne dévoilent pas la comparaison entre une activation du complément engendrée par la nécrose myocardique et une activation du complément présente chez des sujets avec sCAD ou des sujets sains, qui présentent habituellement des troponines normales. Les niveaux des troponines chez les contrôles et les sujets avec sCAD n'ont pas été mesurés dans le cadre de cette étude.

Finalement, toutes ces observations créent des liens entre l'inflammation, l'autoimmunité, la thrombose et l'apoptose et fournissent des indices sur cet axe primordial mais relativement peu connu. Suite à toutes ces observations, la caractérisation des différentes voies impliquées dans l'activation du complément s'avère un atout nécessaire à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués.

Dans les semaines précédant l'avis de la remise de ce présent mémoire, d'autres avancements portant globalement sur le même sujet ont été faits dans notre laboratoire. Dans le but d'avoir une meilleure connaissance du fonctionnement du système du complément dans les SCA, des protocoles ont été faits. Ces nouvelles études exploratoires nous permettront, dans un avenir très rapproché, de qualifier et de quantifier l'activation de chacune des voies d'activation du complément chez des patients avec SCA.

L'importance de l'activation du complément observée chez les patients avec SCA dans l'article de ce mémoire, la dissociation décrite entre l'activation des voies proximales et de la voie distale et la fonction critique préétablie du complément dans l'immunité humorale laissent présager un rôle d'une grande importance pour l'axe CRP-complément dans la physiopathologie de la plaque athérosclérotique active. De plus, toutes ces interrelations soulignent l'importance de la CRP dans l'athérosclérose et les SCA. Toutes ces données entraînent sans contredit la solidification du lien existant entre l'inflammation, l'immunité et la survie cellulaire. Finalement, ce rapport contribue à la continuité et à l'avancement des recherches dans ce domaine d'étude pouvant même entraîner la découverte de thérapies plus efficaces.

5 Conclusion

Finalement, les hypothèses et objectifs établis dans l'article figurant au cœur de ce mémoire ont été atteints. Le présent travail documente l'activation du système du complément chez des patients avec SCA sans élévation du segment ST. Les résultats obtenus nous ont permis d'observer une légère augmentation des niveaux des protéines, des anaphylatoxines et de la CRP 48 heures après l'admission. De plus, une activation du complément chez les patients avec SCA, caractérisée par une activation des composants spécifiques de chacune des voies proximales et de la voie terminale du complément, a été notée comparativement à des patients sans maladie coronarienne stable. L'absence de différence statistiquement significative entre l'activation de la voie terminale du complément chez les patients avec SCA et ceux avec maladie coronarienne stable (sCAD) fut décrite. Un des points principaux de ce travail a été l'existence d'une corrélation entre les niveaux de CRP et l'activation des voies proximales du complément mais d'une absence de corrélation entre les niveaux de CRP et la formation du sC5b-9. Finalement, une nécrose cellulaire, caractérisée par les niveaux de troponine-T, semblait corrélérer avec une activation additionnelle de la voie classique. Par conséquent, les différences, mais aussi les ressemblances, reliées aux mécanismes d'activation de chacune des voies ont permis une meilleure compréhension de l'implication du système du complément dans les SCA.

Bien que les objectifs de départ relatifs à l'article ci-joint ont été accomplis, plusieurs connaissances sur l'activation du système du complément, ses mécanismes de régulation, son rôle dans les maladies autoimmunes et inflammatoires, dont les pathologies cardiovasculaires, demandent à être résolues.

Par exemple, des études plus approfondies sur le mécanisme moléculaire de la formation de la plaque seront capitales dans l'étude des

mécanismes inflammatoires impliqués lors de la rupture de la plaque d'athérosclérose. De telles études nous permettront certes de déterminer l'implication du complément dans les SCA avec ou sans nécrose myocardique et d'établir son rôle dans la physiopathologie de la plaque instable de même que les corrélations possibles avec certains marqueurs d'inflammation. Avec les études déjà amorcées dans notre laboratoire, nous pourrons élucider l'importance relative de l'activation des voies proximales et de la voie terminale du complément, particulièrement lors de SCA. La mise au point de tests ciblant l'activité hémolytique du complément suite à l'ajout de divers agents inhibiteurs et activateurs spécifiques des différentes voies du complément, et ce dans différentes concentrations et conditions de température, auront pour objectif de répondre à ces interrogations.

Lors de son activation, le système du complément active et favorise la sécrétion de plusieurs types de cellules, tel que vu dans les sections précédentes. Par conséquent, il s'avèrera important de connaître l'impact du complément sur ces cellules (i.e. neutrophiles, cellules endothéliales, cellules endothéliales primitives (CD34+), agrégats hétérotypiques plaquettaires) suite à diverses activations ou inhibitions, qu'elles soient *in vitro* ou *in vivo*. Une sérieuse investigation puis une validation des différentes méthodes pour détecter l'apoptose des cellules circulantes, tels les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules endothéliales primitives (CD34+) et les agrégats plaquettaires, sera menée dans notre laboratoire.

D'un point de vue plus clinique, la poursuite des études dans ce domaine aidera à corréler les bénéfices cliniques du blocage de C5 par l'anticorps monoclonal pexelizumab dans l'IM et les niveaux sériques de CRP et de cytokines. La réponse plaquettaire à des médicaments anti-plaquettaires, tel que le clopidogrel, semble être sensible aux anticoagulants sanguins utilisés *ex vivo*. De plus amples études seront conduites dans le but de tester l'influence des médications anti-thrombotiques sur divers états inflammatoires.

En somme, les résultats et hypothèses obtenus de l'article de ce mémoire nécessitent d'être validés dans des études à plus grande échelle. De plus, la présente étude inclut des patients avec SCA sans élévation du segment ST, donc sans infarctus aigu du myocarde. Les prochaines études devront idéalement inclure des patients avec une plus large gamme de manifestations relatives à la maladie coronarienne et des IM d'une sévérité variée. La caractérisation des différentes voies d'activation du complément en cours contribuera certainement à une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie. L'élaboration des études suggérées pourrait avoir une portée clinique importante; la poursuite de ce projet permettra de soutenir l'amplitude du lien relativement peu exploré entre l'inflammation, l'immunité, la thrombose et l'apoptose. Les études ultérieures qui découleront de ce projet pourront conduire à l'élaboration de nouvelles thérapies innovatrices apportant un contrôle plus fondamental de la maladie en phase aiguë et en prévention secondaire.

6 Références

1. Gardinali, M., Conciato, L., Cafaro, C. & Agostoni, A. Complement system in coronary heart disease: a review. *Immunopharmacology* **30**, 105-17 (1995).
2. Hammerschmidt, D. E., Greenberg, C. S., Yamada, O., Craddock, P. R. & Jacob, H. S. Cholesterol and atheroma lipids activate complement and stimulate granulocytes. A possible mechanism for amplification of ischemic injury in atherosclerotic states. *J Lab Clin Med* **98**, 68-77 (1981).
3. Walport, M. J. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* **344**, 1058-66 (2001).
4. Walport, M. J. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* **344**, 1140-4 (2001).
5. Schmidt, B. Z. & Colten, H. R. Complement: a critical test of its biological importance. *Immunol Rev* **178**, 166-76 (2000).
6. Prodeus, A. P. Complement System: New Insight on the "Old" System. *Russ J Immunol* **4**, 243-246 (1999).
7. Song, W. C. Membrane complement regulatory proteins in autoimmune and inflammatory tissue injury. *Curr Dir Autoimmun* **7**, 181-99 (2004).
8. Bohana-Kashtan, O., Ziporen, L., Donin, N., Kraus, S. & Fishelson, Z. Cell signals transduced by complement. *Mol Immunol* **41**, 583-97 (2004).
9. Weinmann, O. et al. Up-regulation of C5a receptor expression and function on human monocyte derived dendritic cells by prostaglandin E2. *Immunology* **110**, 458-65 (2003).
10. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868-74 (2002).

11. Jack, D. L., Klein, N. J. & Turner, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* **180**, 86-99 (2001).
12. Spear, G. T., Hart, M., Olinger, G. G., Hashemi, F. B. & Saifuddin, M. The role of the complement system in virus infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **260**, 229-45 (2001).
13. Muscari, A. et al. Relationship between serum C3 levels and traditional risk factors for myocardial infarction. *Acta Cardiol* **53**, 345-54 (1998).
14. Muscari, A. et al. Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction. *Am J Med* **98**, 357-64 (1995).
15. Bernet, J., Mullick, J., Singh, A. K. & Sahu, A. Viral mimicry of the complement system. *J Biosci* **28**, 249-64 (2003).
16. Kurita, M. et al. Antibody-independent classical complement pathway activation and homologous C3 deposition in xeroderma pigmentosum cell lines. *Clin Exp Immunol* **116**, 547-53 (1999).
17. Mustafa, A., Hamsten, A., Holm, G. & Lefvert, A. K. Circulating immune complexes induced by food proteins implicated in precocious myocardial infarction. *Ann Med* **33**, 103-12 (2001).
18. Shevchenko, V. S. [The formation of autoimmune complexes as an index of bioincompatibility in reconstructive heart operations]. *Fiziol Zh* **45**, 69-73 (1999).
19. Fiane, A. E. et al. Mechanism of complement activation and its role in the inflammatory response after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Circulation* **108**, 849-56 (2003).
20. Tungtrongchitr, R. et al. The effect of cigarette smoking on ceruloplasmin and C3 complement: risk of cardiovascular disease (atherosclerosis). *Asian Pac J Allergy Immunol* **20**, 23-8 (2002).
21. Sim, R. B. & Tsiftoglou, S. A. Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* **32**, 21-7 (2004).

22. Cole, D. S. & Morgan, B. P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clin Sci (Lond)* **104**, 455-66 (2003).
23. Petersen, S. V. et al. Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. *Mol Immunol* **37**, 803-11 (2000).
24. Moller-Kristensen, M., Thiel, S., Hansen, A. G. & Jensenius, J. C. On the site of C4 deposition upon complement activation via the mannan-binding lectin pathway or the classical pathway. *Scand J Immunol* **57**, 556-61 (2003).
25. Tenner, A. J. C1q interactions with cell surface receptors. *Behring Inst Mitt*, 220-9 (1989).
26. Kishore, U. & Reid, K. B. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* **49**, 159-70 (2000).
27. McGreal, E. & Gasque, P. Structure-function studies of the receptors for complement C1q. *Biochem Soc Trans* **30**, 1010-4 (2002).
28. Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M. & Hemmes, M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 2348-54 (1999).
29. Mold, C., Gewurz, H. & Du Clos, T. W. Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* **42**, 23-30 (1999).
30. Agrawal, A., Shrive, A. K., Greenhough, T. J. & Volanakis, J. E. Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J Immunol* **166**, 3998-4004 (2001).
31. Hicks, P. S., Saunero-Nava, L., Du Clos, T. W. & Mold, C. Serum amyloid P component binds to histones and activates the classical complement pathway. *J Immunol* **149**, 3689-94 (1992).
32. Cadman, E. D. & Puttfarcken, P. S. Beta-amyloid peptides initiate the complement cascade without producing a comparable effect on the terminal pathway in vitro. *Exp Neurol* **146**, 388-94 (1997).

33. Emmerling, M. R., Spiegel, K. & Watson, M. D. Inhibiting the formation of classical C3-convertase on the Alzheimer's beta-amyloid peptide. *Immunopharmacology* **38**, 101-9 (1997).
34. Daly, J. t. & Kotwal, G. J. Pro-inflammatory complement activation by the A beta peptide of Alzheimer's disease is biologically significant and can be blocked by vaccinia virus complement control protein. *Neurobiol Aging* **19**, 619-27 (1998).
35. Bergamaschini, L. et al. Alzheimer's beta-amyloid peptides can activate the early components of complement classical pathway in a C1q-independent manner. *Clin Exp Immunol* **115**, 526-33 (1999).
36. Korb, L. C. & Ahearn, J. M. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol* **158**, 4525-8 (1997).
37. Mold, C. & Morris, C. A. Complement activation by apoptotic endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Immunology* **102**, 359-64 (2001).
38. Gershov, D., Kim, S., Brot, N. & Elkon, K. B. C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* **192**, 1353-64 (2000).
39. Familian, A. et al. Chromatin-independent binding of serum amyloid P component to apoptotic cells. *J Immunol* **167**, 647-54 (2001).
40. Zwart, B. et al. Complement activation by apoptotic cells occurs predominantly via IgM and is limited to late apoptotic (secondary necrotic) cells. *Autoimmunity* **37**, 95-102 (2004).
41. Ciurana, C. L., Zwart, B., van Mierlo, G. & Hack, C. E. Complement activation by necrotic cells in normal plasma environment compares to

- that by late apoptotic cells and involves predominantly IgM. *Eur J Immunol* **34**, 2609-19 (2004).
42. Gigli, I., Sorvillo, J., Mecarelli-Halbwachs, L. & Leibowitch, J. Mechanism of action of the C4 nephritic factor. Deregulation of the classical pathway of C3 convertase. *J Exp Med* **154**, 1-12 (1981).
 43. Seino, J. et al. Quantitation of C4 nephritic factor by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* **128**, 101-8 (1990).
 44. te Velthuis, H., Jansen, P. G., Hack, C. E., Eijnsman, L. & Wildevuur, C. R. Specific complement inhibition with heparin-coated extracorporeal circuits. *Ann Thorac Surg* **61**, 1153-7 (1996).
 45. Matsushita, M. [Activation mechanism of the complement system]. *Nippon Rinsho* **57**, 291-7 (1999).
 46. Pangburn, M. K. & Muller-Eberhard, H. J. Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of C3. *Ann N Y Acad Sci* **421**, 291-8 (1983).
 47. Pangburn, M. K. Activation of complement via the alternative pathway. *Fed Proc* **42**, 139-43 (1983).
 48. Pangburn, M. K., Schreiber, R. D. & Muller-Eberhard, H. J. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* **154**, 856-67 (1981).
 49. Pangburn, M. K. & Muller-Eberhard, H. J. The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. *Biochem J* **235**, 723-30 (1986).
 50. del Balzo, U. H., Levi, R. & Polley, M. J. Cardiac dysfunction caused by purified human C3a anaphylatoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 886-90 (1985).
 51. Schifferle, R. E., Wilson, M. E., Levine, M. J. & Genco, R. J. Activation of serum complement by polysaccharide-containing antigens of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* **28**, 248-54 (1993).

52. Vukajlovich, S. W., Hoffman, J. & Morrison, D. C. Activation of human serum complement by bacterial lipopolysaccharides: structural requirements for antibody independent activation of the classical and alternative pathways. *Mol Immunol* **24**, 319-31 (1987).
53. Hiemstra, P. S., Gorter, A., Stuurman, M. E., Van Es, L. A. & Daha, M. R. Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur J Immunol* **17**, 321-6 (1987).
54. Bogers, W. M., Stad, R. K., van Es, L. A. & Daha, M. R. Immunoglobulin A: interaction with complement, phagocytic cells and endothelial cells. *Complement Inflamm* **8**, 347-58 (1991).
55. Dumestre-Perard, C. et al. Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma. *Mol Immunol* **39**, 465-73 (2002).
56. Gal, P. & Ambrus, G. Structure and function of complement activating enzyme complexes: C1 and MBL-MASPs. *Curr Protein Pept Sci* **2**, 43-59 (2001).
57. Matsushita, M., Endo, Y., Hamasaki, N. & Fujita, T. Activation of the lectin complement pathway by ficolins. *Int Immunopharmacol* **1**, 359-63 (2001).
58. Hansen, S. & Holmskov, U. Structural aspects of collectins and receptors for collectins. *Immunobiology* **199**, 165-89 (1998).
59. Matsushita, M. et al. Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). *J Immunol* **168**, 3502-6 (2002).
60. Hajela, K. et al. The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). *Immunobiology* **205**, 467-75 (2002).
61. Cseh, S. et al. Characterization of the interaction between L-ficolin/p35 and mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Immunol* **169**, 5735-43 (2002).

62. Presanis, J. S., Hajela, K., Ambrus, G., Gal, P. & Sim, R. B. Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol Immunol* **40**, 921-9 (2004).
63. Wong, N. K., Kojima, M., Dobo, J., Ambrus, G. & Sim, R. B. Activities of the MBL-associated serine proteases (MASPs) and their regulation by natural inhibitors. *Mol Immunol* **36**, 853-61 (1999).
64. Kuraya, M., Matsushita, M., Endo, Y., Thiel, S. & Fujita, T. Expression of H-ficolin/Hakata antigen, mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 by human glioma cell line T98G. *Int Immunol* **15**, 109-17 (2003).
65. Nielsen, E. W. et al. Hereditary angio-oedema: new clinical observations and autoimmune screening, complement and kallikrein-kinin analyses. *J Intern Med* **239**, 119-30 (1996).
66. Hughes, J. et al. C5b-9 membrane attack complex mediates endothelial cell apoptosis in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F747-57 (2000).
67. Granger, C. B. et al. Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: the COMplement inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty (COMMA) trial. *Circulation* **108**, 1184-90 (2003).
68. de Zwaan, C., van Dieijen-Visser, M. P. & Hermens, W. T. Prevention of cardiac cell injury during acute myocardial infarction: possible role for complement inhibition. *Am J Cardiovasc Drugs* **3**, 245-51 (2003).
69. Roos, A., Ramwadhoebe, T. H., Nauta, A. J., Hack, C. E. & Daha, M. R. Therapeutic inhibition of the early phase of complement activation. *Immunobiology* **205**, 595-609 (2002).
70. Harris, C. L., Fraser, D. A. & Morgan, B. P. Tailoring anti-complement therapeutics. *Biochem Soc Trans* **30**, 1019-26 (2002).

71. de Zwaan, C. et al. Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* **23**, 1670-7 (2002).
72. Horstick, G. et al. Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects. *Circulation* **104**, 3125-31 (2001).
73. Sahu, A. & Lambris, J. D. Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics. *Immunopharmacology* **49**, 133-48 (2000).
74. Lazar, H. L., Bao, Y., Gaudiani, J., Rivers, S. & Marsh, H. Total complement inhibition: an effective strategy to limit ischemic injury during coronary revascularization on cardiopulmonary bypass. *Circulation* **100**, 1438-42 (1999).
75. Kawano, M. Complement regulatory proteins and autoimmunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **48**, 367-72 (2000).
76. Wiese, A., Gutschmann, T. & Seydel, U. Towards antibacterial strategies: studies on the mechanisms of interaction between antibacterial peptides and model membranes. *J Endotoxin Res* **9**, 67-84 (2003).
77. Hansen, T. K. Growth hormone and mannan-binding lectin: emerging evidence for hormonal regulation of humoral innate immunity. *Minerva Endocrinol* **28**, 75-84 (2003).
78. Brodbeck, W. G., Kuttner-Kondo, L., Mold, C. & Medof, M. E. Structure/function studies of human decay-accelerating factor. *Immunology* **101**, 104-11 (2000).
79. Kraus, D., Medof, M. E. & Mold, C. Complementary recognition of alternative pathway activators by decay-accelerating factor and factor H. *Infect Immun* **66**, 399-405 (1998).
80. Barilla-LaBarca, M. L., Liszewski, M. K., Lambris, J. D., Hourcade, D. & Atkinson, J. P. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol* **168**, 6298-304 (2002).

81. Fukuta, D. et al. Effect of various forms of the C1 esterase inhibitor (C1-INH) and DAF on complement mediated xenogeneic cell lysis. *Xenotransplantation* **10**, 132-41 (2003).
82. Sundsmo, J. S. & Fair, D. S. Relationships among the complement, kinin, coagulation, and fibrinolytic systems. *Springer Semin Immunopathol* **6**, 231-58 (1983).
83. Rodriguez de Cordoba, S., Esparza-Gordillo, J., Goicoechea de Jorge, E., Lopez-Trascasa, M. & Sanchez-Corral, P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol* **41**, 355-67 (2004).
84. Zipfel, P. F., Jokiranta, T. S., Hellwage, J., Koistinen, V. & Meri, S. The factor H protein family. *Immunopharmacology* **42**, 53-60 (1999).
85. Oksjoki, R. et al. Association between complement factor H and proteoglycans in early human coronary atherosclerotic lesions: implications for local regulation of complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 630-6 (2003).
86. Wirthmueller, U. et al. Properdin, a positive regulator of complement activation, is released from secondary granules of stimulated peripheral blood neutrophils. *J Immunol* **158**, 4444-51 (1997).
87. Fujita, T., Endo, Y. & Nonaka, M. Primitive complement system--recognition and activation. *Mol Immunol* **41**, 103-11 (2004).
88. Yamazaki, T. et al. A quantitative protein S deficiency associated with a novel nonsense mutation and markedly reduced levels of mutated mRNA. *Thromb Haemost* **74**, 590-5 (1995).
89. Morgan, C., Pollard, J. W. & Stanley, E. R. Isolation and characterization of a cloned growth factor dependent macrophage cell line, BAC1.2F5. *J Cell Physiol* **130**, 420-7 (1987).
90. Sims, P. J. & Wiedmer, T. Repolarization of the membrane potential of blood platelets after complement damage: evidence for a Ca^{++} -

- dependent exocytotic elimination of C5b-9 pores. *Blood* **68**, 556-61 (1986).
91. Klinkhardt, U. et al. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin Pharmacol Ther* **73**, 232-41 (2003).
 92. Welch, T. R. The complement system in renal diseases. *Nephron* **88**, 199-204 (2001).
 93. Cook, H. T. Complement deficiencies, lupus and apoptosis. *Adv Nephrol Necker Hosp* **31**, 29-41 (2001).
 94. Homann, C. et al. Acquired C3 deficiency in patients with alcoholic cirrhosis predisposes to infection and increased mortality. *Gut* **40**, 544-9 (1997).
 95. Petry, F. Molecular basis of hereditary C1q deficiency. *Immunobiology* **199**, 286-94 (1998).
 96. Frank, M. M. Complement deficiencies. *Pediatr Clin North Am* **47**, 1339-54 (2000).
 97. Kirschfink, M. Targeting complement in therapy. *Immunol Rev* **180**, 177-89 (2001).
 98. Rubinstein, A. National Cholesterol Education Program, second report of the Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *Circulation* **91**, 908-9 (1995).
 99. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-26 (1999).
 100. Vlaicu, R., Rus, H. G., Niculescu, F. & Cristea, A. Quantitative determinations of immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic wall. *Med Interne* **23**, 29-35 (1985).
 101. Vlaicu, R., Rus, H. G., Niculescu, F. & Cristea, A. Immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic intima. *Atherosclerosis* **55**, 35-50 (1985).

102. Valgimigli, M. et al. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* **420**, 255-61 (2003).
103. Lind, L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **169**, 203-14 (2003).
104. Stary, H. C. et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1512-31 (1995).
105. Blankenberg, S. et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* **107**, 1579-85 (2003).
106. Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W. & Libby, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **94**, 2493-503 (1994).
107. Mach, F., Schonbeck, U., Bonnefoy, J. Y., Pober, J. S. & Libby, P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* **96**, 396-9 (1997).
108. Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G. & McGeer, P. L. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* **158**, 1039-51 (2001).
109. Niculescu, F., Rus, H. G. & Vlaicu, R. Activation of the human terminal complement pathway in atherosclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* **45**, 147-55 (1987).
110. Nijmeijer, R. et al. C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am J Pathol* **163**, 269-75 (2003).

111. Torzewski, J. et al. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1386-92 (1998).
112. Schafer, H., Mathey, D., Hugo, F. & Bhakdi, S. Deposition of the terminal C5b-9 complement complex in infarcted areas of human myocardium. *J Immunol* **137**, 1945-9 (1986).
113. Niculescu, F., Niculescu, T. & Rus, H. C5b-9 terminal complement complex assembly on apoptotic cells in human arterial wall with atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* **76**, 17-23 (2004).
114. Gerszten, R. E. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* **398**, 718-23 (1999).
115. Seifert, P. S., Hugo, F., Hansson, G. K. & Bhakdi, S. Prelesional complement activation in experimental atherosclerosis. Terminal C5b-9 complement deposition coincides with cholesterol accumulation in the aortic intima of hypercholesterolemic rabbits. *Lab Invest* **60**, 747-54 (1989).
116. Paoletti, R., Gotto, A. M., Jr. & Hajjar, D. P. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation* **109**, III20-6 (2004).
117. Braunwald, E. Unstable angina. A classification. *Circulation* **80**, 410-4 (1989).
118. Scirica, B. M. & Morrow, D. A. Troponins in acute coronary syndromes. *Prog Cardiovasc Dis* **47**, 177-88 (2004).
119. Casey, P. E. Markers of myocardial injury and dysfunction. *AACN Clin Issues* **15**, 547-57 (2004).
120. Berger, A. et al. ECG interpretation during the acute phase of coronary syndromes: in need of improvement? *Swiss Med Wkly* **134**, 695-9 (2004).

121. Braunwald, E. Unstable angina: an etiologic approach to management. *Circulation* **98**, 2219-22 (1998).
122. Gyongyosi, M. et al. Association between plasmin activation system and intravascular ultrasound signs of plaque instability in patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Am Heart J* **147**, 158-64 (2004).
123. Apetrei, E., Ciobanu-Jurcut, R., Rugina, M., Gavrila, A. & Uscatescu, V. C-reactive protein, prothrombotic imbalance and endothelial dysfunction in acute coronary syndromes without ST elevation. *Rom J Intern Med* **42**, 95-102 (2004).
124. Robbie, L. & Libby, P. Inflammation and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci* **947**, 167-79; discussion 179-80 (2001).
125. Braunwald, E. Application of current guidelines to the management of unstable angina and non-ST-elevation myocardial infarction. *Circulation* **108**, III28-37 (2003).
126. Laine, P. et al. Evidence for complement activation in ruptured coronary plaques in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **90**, 404-8 (2002).
127. Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G. & McGeer, P. L. Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction. *Circ Res* **83**, 860-9 (1998).
128. Yasuda, M. et al. The complement system in ischemic heart disease. *Circulation* **81**, 156-63 (1990).
129. Hoffmeister, H. M. et al. Comparison of C-reactive protein and terminal complement complex in patients with unstable angina pectoris versus stable angina pectoris. *Am J Cardiol* **89**, 909-12 (2002).
130. Gluckman, T. J., Sachdev, M., Schulman, S. P. & Blumenthal, R. S. A simplified approach to the management of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Jama* **293**, 349-57 (2005).

131. Steg, P. G. et al. Evidence for priming and activation of neutrophils early after coronary angioplasty. *Eur J Med* **2**, 6-10 (1993).
132. Bruins, P. et al. Heparin-protamine complexes and C-reactive protein induce activation of the classical complement pathway: studies in patients undergoing cardiac surgery and in vitro. *Thromb Haemost* **84**, 237-43 (2000).
133. Lappégard, K. T., Hvassing, T. & Mollnes, T. E. Statin drugs do not affect serum complement activation in vitro. *Scand J Immunol* **60**, 178-83 (2004).
134. Chakraborti, T., Mandal, A., Mandal, M., Das, S. & Chakraborti, S. Complement activation in heart diseases. Role of oxidants. *Cell Signal* **12**, 607-17 (2000).
135. Tedesco, F. et al. Complement-endothelial cell interactions: pathophysiological implications. *Mol Immunol* **36**, 261-8 (1999).
136. Yasojima, K., Kilgore, K. S., Washington, R. A., Lucchesi, B. R. & McGeer, P. L. Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion. *Circ Res* **82**, 1224-30 (1998).
137. Van Beek, J. et al. Expression of receptors for complement anaphylatoxins C3a and C5a following permanent focal cerebral ischemia in the mouse. *Exp Neurol* **161**, 373-82 (2000).
138. Schwertz, H. et al. Two-dimensional analysis of myocardial protein expression following myocardial ischemia and reperfusion in rabbits. *Proteomics* **2**, 988-95 (2002).
139. Kobayashi, E., Kitano, E., Kondo, H. & Kitamura, H. [Complement activation in heparin--plasma inhibitory effect of anticoagulants on serum complement activation, 2nd report]. *Rinsho Byori* **48**, 60-6 (2000).
140. Pfeifer, P. H., Kawahara, M. S. & Hugli, T. E. Possible mechanism for in vitro complement activation in blood and plasma samples:

- futhan/EDTA controls in vitro complement activation. *Clin Chem* **45**, 1190-9 (1999).
141. Mollnes, T. E., Andreassen, I. H., Hogasen, K., Hack, C. E. & Harboe, M. Effect of whole and fractionated intravenous immunoglobulin on complement in vitro. *Mol Immunol* **34**, 719-29 (1997).
 142. Rieben, R. et al. Immunoglobulin M-enriched human intravenous immunoglobulin prevents complement activation in vitro and in vivo in a rat model of acute inflammation. *Blood* **93**, 942-51 (1999).
 143. Cicardi, M., Zingale, L. C., Pappalardo, E., Folcioni, A. & Agostoni, A. Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1-inhibitor deficiencies. *Medicine (Baltimore)* **82**, 274-81 (2003).
 144. Undar, A. et al. Novel anti-factor D monoclonal antibody inhibits complement and leukocyte activation in a baboon model of cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* **74**, 355-62; discussion 362 (2002).
 145. Pratt, J. R., Hibbs, M. J., Laver, A. J., Smith, R. A. & Sacks, S. H. Effects of complement inhibition with soluble complement receptor-1 on vascular injury and inflammation during renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol* **149**, 2055-66 (1996).
 146. von Dobschuetz, E. et al. Soluble complement receptor 1 preserves endothelial barrier function and microcirculation in postischemic pancreatitis in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G791-6 (2004).
 147. Gralinski, M. R., Wiater, B. C., Assenmacher, A. N. & Lucchesi, B. R. Selective inhibition of the alternative complement pathway by sCR1[desLHR-A] protects the rabbit isolated heart from human complement-mediated damage. *Immunopharmacology* **34**, 79-88 (1996).

148. Sahu, A., Morikis, D. & Lambris, J. D. Compstatin, a peptide inhibitor of complement, exhibits species-specific binding to complement component C3. *Mol Immunol* **39**, 557-66 (2003).
149. Soulika, A. M. et al. Studies of structure-activity relations of complement inhibitor compstatin. *J Immunol* **171**, 1881-90 (2003).
150. Soulika, A. M. et al. Inhibition of heparin/protamine complex-induced complement activation by Compstatin in baboons. *Clin Immunol* **96**, 212-21 (2000).
151. Asghar, S. S. & Pasch, M. C. Therapeutic inhibition of the complement system. Y2K update. *Front Biosci* **5**, E63-81 (2000).
152. Christiansen, D. et al. Engineering of recombinant soluble CD46: an inhibitor of complement activation. *Immunology* **87**, 348-54 (1996).
153. Mahaffey, K. W. et al. Effect of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction: the COMPLEMENT inhibition in myocardial infarction treated with thromboLYtics (COMPLY) trial. *Circulation* **108**, 1176-83 (2003).
154. De Vries, B. et al. Inhibition of complement factor C5 protects against renal ischemia-reperfusion injury: inhibition of late apoptosis and inflammation. *Transplantation* **75**, 375-82 (2003).
155. Vakeva, A. P. et al. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* **97**, 2259-67 (1998).
156. Xiao, Z., Theroux, P. & Frojmovic, M. Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GPIIb/IIIa receptor. *Thromb Haemost* **81**, 281-5 (1999).
157. Xiao, Z. & Theroux, P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* **43**, 1982-8 (2004).