

Université de Montréal

**Rôles physiopathologiques du complément dans le
syndrome coronarien aigu et implications thérapeutiques**

par

Catherine Martel

Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Doctorat (PhD)
en Sciences Biomédicales

Janvier 2009

© Catherine Martel, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôles physiopathologiques du complément dans le syndrome coronarien aigu et
implications thérapeutiques

Présentée par :
Catherine Martel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Yahye Merhi, président-rapporteur
Pierre Théroux, directeur de recherche
Arnaud Bonnefoy, co-directeur
Janos G. Filep, membre du jury
Jacques Bernier, examinateur externe
Éric Thorin, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les efforts investis pour diminuer les risques de développer un infarctus du myocarde sont nombreux. Aujourd'hui les médecins prennent connaissance des divers facteurs de risque connus prédisposant aux syndromes coronariens aigus (SCA) dans le but de prendre en charge les patients «à risque» [1]. Bien que le suivi rigoureux et le contrôle de certains facteurs de risque modifiables aient permis une meilleure gestion des cas de SCA, les cas d'infarctus persistent de manière encore trop fréquente dans le monde. Puisque d'importantes études ont démontré que les SCA pouvaient survenir sans même la présence des facteurs de risque conventionnels [2, 3], les chercheurs se sont penchés sur un autre mécanisme potentiellement responsable de l'avènement des SCA : l'inflammation.

L'inflammation joue un rôle prépondérant dans l'initiation, la progression et les complications de l'athérosclérose [4, 5] mais aussi dans les situations post-infarctus [6, 7]. Au cours des dernières années, le contrôle du processus inflammatoire est devenu une cible de choix dans la prévention et le traitement des SCA. Cependant, malgré les efforts investis, aucun de ces traitements ne s'est avéré pleinement efficace dans l'atteinte du but ultime visé par une diminution de l'inflammation : la diminution de la mortalité.

Le complément est un système complexe reconnu principalement pour son rôle primordial dans l'immunité [2]. Cependant, lorsqu'il est activé de manière inappropriée ou excessive, il peut être à l'origine de nombreux dommages cellulaires caractéristiques de plusieurs pathologies inflammatoires dont font partie les complications de l'athérosclérose et des événements post-infarctus. Le travail effectué dans le cadre de mon doctorat vise à établir les rôles physiopathologiques du complément dans les interactions de l'axe thrombose-inflammation caractéristiques des SCA dans le but ultime d'identifier des cibles thérapeutiques permettant le développement de nouvelles approches pour la prévention et le traitement de ces pathologies.

Les principaux résultats obtenus durant mon cursus suggèrent d'abord que la voie alterne du complément peut représenter une cible thérapeutique de choix dans les maladies

coronariennes aiguës puisque l'activation terminale du complément semble y être principalement causée par l'activation de cette voie. De faibles niveaux sériques de MBL (mannan-binding lectin) et une activation terminale négligeable du complément caractérisent plutôt la maladie coronarienne stable.

En comparant l'activité relative de chacune des voies du complément chez des cohortes de patients traités ou non par un anticorps spécifique à la protéine C5 du complément (pexelizumab), un second volet démontre quant à lui qu'une inhibition de l'activation du C5 n'a pas d'effet bénéfique majeur sur l'inhibition de la formation du complexe sC5b-9 ou sur les événements cliniques subséquents. Par conséquent, nous avons exploré, à l'aide d'un modèle *in vitro*, les raisons de l'inefficacité du traitement. Les résultats révèlent que le blocage du C5 avec le pexelizumab inhibe la production de l'anaphylatoxine pro-inflammatoire C5a et du complexe terminal du complément sans toutefois avoir d'effet sur l'apoptose des cellules endothéliales produites induite par le sérum des patients atteints de STEMI.

Finalement, une autre section stipule que l'atorvastatine diminue l'activation du complément induite par les plaquettes sanguines chez des patients hypercholestérolémiques, mettant en évidence l'importance du rôle de cette statine dans la réduction des effets délétères de l'activation du système du complément médié par les plaquettes.

Ensemble, l'étude du rôle spécifique des différentes voies d'activation du complément dans des contextes pathologiques variés, l'analyse des effets d'une inhibition spécifique de la protéine C5 du complément dans la progression des SCA et la mise en évidence des interactions entre l'activation du complément et les plaquettes activées ont contribué au développement d'une meilleure connaissance des rôles physiopathologiques du complément dans la progression de la maladie coronarienne.

Mots-clés : Activation du complément, syndrome coronarien aigu, inflammation, apoptose, thrombose, plaquettes.

Abstract

Many efforts have been made in lowering the risk of myocardial infarction in the general population. Most clinicians are knowledgeable of the several identified risk factors leading to the development of acute coronary syndromes (ACS), and in turn, insure a better follow-up for “at risk” patients [1]. Despite the fact that intensive efforts in controlling modifiable risk factors have led to a better management of new cases of ACS, myocardial infarction and its deleterious consequences are still a world plague. Because it has been shown that ACS can occur without the presence of traditional risk factors [3, 4], researchers have been interested in modifying new ACS biological pathways such as inflammation.

Inflammation plays a key role in the initiation, progression, and complications of atherosclerosis [5, 6], but also in post-infarction situations [7, 8]. In the past years, inflammation markers have become important targets for the prevention and treatment of ACS. Despite intensive efforts, none of the yet tested drug was found to be effective in decreasing mortality.

The complement system is mainly known for its fundamental role in innate and adaptive immunity [2]. However, excessive activation of the complement can lead to a significant number of deleterious effects such as inflammation, apoptosis, necrosis and cell lysis. Earlier findings have shown that complement is extensively activated in atherosclerotic lesions, particularly in vulnerable and ruptured plaques. The objective of my doctoral project was to establish the pathophysiological roles of complement in the axis inflammation-thrombosis of ACS with the ultimate goal of identifying new therapeutic targets leading to the development of new drugs for the prevention and treatment of these diseases.

The main results obtained first suggest that the complement alternative pathway represents a potential therapeutic target in acute coronary disease since terminal complement activation occurs mainly by this specific pathway. Low MBL levels (mannan-

binding lectin) in serum and negligible terminal complement activation rather characterize stable coronary artery disease.

By comparing the relative activity of each pathway of the complement in patients treated or not by an antibody specific to the C5 protein of the complement (pexelizumab), other results show that an inhibition of C5 activation does not have a major beneficial effect on the inhibition of the sC5b-9 complex expression or on the subsequent clinical events. Consequently, we explored, using an *in vitro* model of endothelial cells, the reasons of this inefficiency. This work reveals that C5 inhibition by pexelizumab inhibits the production of the pro-inflammatory anaphylatoxin C5a and of the terminal complement complex without, however, effecting endothelial cell apoptosis induced by the serum of patients with STEMI. Finally, another section stipulates that atorvastatin decreases platelet-induced complement activation in hypercholesterolemic patients, highlighting the importance of statins in the reduction of the deleterious effects of platelets-induced complement activation.

All together, the study of the specific role of the various pathways of complement activation in different pathological contexts, the analysis of the effects of a specific inhibition of the C5 complement protein in the progression of ACS and the highlighting of the interactions between complement and platelet activation contribute to the development of a better knowledge of the pathophysiological roles of the complement system in ACS.

Keywords : complement activation, acute coronary syndrome, inflammation, apoptosis, thrombosis, platelets.

Table des matières

<u>Résumé</u>	iii
<u>Abstract</u>	v
<u>Table des matières</u>	vii
<u>Liste des tableaux</u>	xiii
<u>Liste des figures</u>	xiv
<u>Liste des sigles et abréviations</u>	xv
<u>Remerciements</u>	xx
AVANT-PROPOS	1
<u>Objectif et structure de la thèse</u>	3
INTRODUCTION	7
<u>Les composantes inflammatoires du système immunitaire dans la maladie coronarienne</u> 8	
<u>La prévention des maladies coronariennes</u>	8
<i>Les statines</i>	9
<i>Les effets pléiotropiques des statines</i>	11
<u>Cibler l'inflammation par des traitements thérapeutiques précis</u>	16
CHAPITRE 1	18
1 <u>Les maladies coronariennes</u>	19
1.1 <u>L'athérosclérose</u>	20
1.1.1 <i>La formation de la plaque athérosclérotique</i>	20
1.1.2 <i>La rupture de la plaque</i>	23
1.1.3 <i>La formation du thrombus</i>	24
1.2 <u>Manifestations cliniques de la progression et de la rupture de la plaque</u>	24
1.2.1 <i>L'angine stable</i>	24
1.2.2 <i>Les syndromes coronariens aigus</i>	25
1.2.3 <i>Interventions médicales</i>	26
1.2.4 <i>Domages de reperfusion</i>	27

CHAPITRE 2	29
2 <u>Le système du complément</u>	30
2.1 <u>Description générale</u>	32
2.2 <u>Les terminologies</u>	33
2.3 <u>Groupes de protéines constitutives de la cascade du complément</u>	34
2.3.1 <i>Convertases</i>	34
2.3.2 <i>Anaphylatoxines</i>	36
2.3.3 <i>Opsonines</i>	38
2.3.4 <i>Complexe terminal du complément</i>	40
2.3.5 <i>Les mécanismes de régulation du complément</i>	41
2.3.5.1 <i>La dégradation naturelle</i>	41
2.3.5.2 <i>Les protéines régulatrices membranaires</i>	42
2.3.5.3 <i>Les protéines régulatrices solubles</i>	43
2.3.5.4 <i>Régulation de la lyse des CTC</i>	45
2.3.5.4.1 <i>Vésiculation des membranes cellulaires</i>	46
2.3.5.4.2 <i>Les CTC non-lytiques</i>	46
2.3.5.4.3 <i>Désensibilisation</i>	47
CHAPITRE 3	50
3 <u>Maladies coronariennes : initiation de l'activation du complément</u>	51
3.1 <u>La voie classique</u>	53
3.1.1 <i>Immunoglobulines associées aux complexes immuns</i>	56
3.1.2 <i>Les pentraxines</i>	57
3.1.2.1 <i>La protéine C-réactive</i>	57
3.1.2.2 <i>La protéine amyloïde P sérique (SAP)</i>	60
3.1.2.3 <i>La pentraxine 3 (PTX3)</i>	61
3.1.3 <i>Les lipoprotéines de faible densité (LDL)</i>	62
3.1.4 <i>Cellules apoptotiques et nécrotiques</i>	63
3.1.5 <i>Adiponectine</i>	65

3.1.6 Complexe héparine-protamine.....	66
3.1.7 Plaquettes.....	66
3.1.7.1 gC1qR/p33.....	67
3.1.7.2 Microparticules plaquettaires.....	67
3.1.7.3 Chondroïtine-sulfate.....	68
3.1.8 Système de la coagulation et de la fibrinolyse.....	68
3.1.9 Cellules endothéliales.....	69
3.1.10 Les protéines activées de la voie alterne.....	70
3.2 La voie alterne.....	71
3.2.1 Boucle d'amplification.....	72
3.2.2 Surfaces activatrices spécifiques.....	72
3.2.2.1 Inflammation.....	73
3.2.3 Properdine : activation directe.....	74
3.2.4 Immunoglobulines.....	77
3.2.4.1 IgG.....	77
3.2.4.2 IgA.....	78
3.2.5 Activation par la voie lectine.....	78
3.2.6 Plaquettes.....	78
3.2.6.1 P-sélectine.....	78
3.2.6.2 Intégrine α IIb- β III.....	79
3.2.6.3 La thrombospondine-1.....	80
3.2.6.4 Microparticules plaquettaires.....	81
3.3 La voie lectine.....	82
3.3.1 MASPs.....	86
3.3.1.1 «Lectin C2-bypass pathway».....	87
3.3.2 Immunoglobulines.....	89
3.3.2.1 IgA.....	89
3.3.2.2 IgG.....	89

3.3.2.3 IgM.....	90
3.3.3 LDL acétylés	90
3.3.4 Neutrophiles	90
3.3.5 Cellules apoptotiques tardives/Nécrotiques.....	91
3.4 Voie des protéases extrinsèques.....	93
3.4.1 Kallikréine.....	93
3.4.2 Thrombine	94
3.4.3 β -tryptase.....	94
3.4.4 Protéases bactériennes.....	95
CHAPITRE 4	97
<u>4 L'activation du complément dans l'initiation et progression de la maladie coronarienne</u>	<u>98</u>
<u>4.1 Activation du complément dans les maladies coronariennes</u>	98
4.1.1 Activation du complément dans l'athérosclérose	99
4.1.2 Activation du complément dans les dommages de reperfusion.....	101
4.1.3 Complément et facteurs de risques des maladies cardiovasculaires	103
4.1.3.1 Le tabagisme	103
4.1.3.2 Dyslipidémie et diabète de type II.....	104
4.1.4 Effet sur les fonctions plaquettaires	105
4.1.4.1 Activité pro-coagulante.....	105
4.1.4.2 Agrégats plaquettes/leucocytes	106
4.1.4.3 Formation de PMP pro-coagulantes	107
4.1.4.4 PMP : transporteurs du complément	107
4.1.5 C5b-9 : au-delà de la lyse cellulaire.....	108
4.1.6 Biomarqueurs plasmatiques.....	109
4.1.7 Les multiples interactions cellules endothéliales/complément	110
CHAPITRE 5	113
5 RÉSULTATS	114
<u>5.1 Objectif général de la thèse</u>	114

<u>5.2 Présentation de l'article #1</u>	116
<u>5.3 Présentation de l'article #2</u>	144
<u>5.4 Présentation de l'article #3</u>	168
<u>5.5 Présentation de l'article #4</u>	196
6 DISCUSSION GÉNÉRALE	229
<u>6.1 Assessment of PEXelizumab in Acute Myocardial Infarction (APEX-AMI)</u>	232
<u>6.2 Le complément a-t-il un rôle dans les phases chroniques et aiguës de la maladie coronarienne ?</u>	237
<i>6.2.1 Quelle est l'implication de chacune des voies d'activation du complément dans les maladies coronariennes chroniques et aiguës ?</i>	240
<i>6.2.1.1 Régulation du complexe lytique dans l'angine stable</i>	241
<i>6.2.1.2 Activation de la voie alterne, lyse et apoptose cellulaire dans les SCA</i>	243
<i>6.2.1.3 Les déficiences en MBL</i>	246
<i>6.2.2 Une déficience en MBL protège-t-elle contre la survenue d'événements cliniques majeurs post-infarctus ?</i>	248
<u>6.3 APEX-AMI : une meilleure compréhension des mécanismes d'activation du complément dans les infarctus du myocarde et dans les complications post-infarctus</u> .	253
<i>6.3.1 Les effets d'une inhibition de l'activation de C5</i>	255
<i>6.3.1.1 Pexelizumab : délétère ou bénéfique ?</i>	255
<i>6.3.1.2 De la clinique au fondamental</i>	258
<i>6.3.1.3 Du fondamental à la clinique</i>	261
<i>6.3.1.4 Les effets d'une inhibition de l'activation de C5 sur la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires</i>	262
<u>6.4 Interactions cholestérol-plaquettes-complément</u>	264
<i>6.4.1 Activation du complément et activation plaquettaire dans l'hypercholestérolémie</i>	264
<i>6.4.1.1 Les aspects techniques</i>	265
<i>6.4.1.2 L'activation du complément dans l'agrégation plaquettaire</i>	266

6.4.1.3 <i>Le traitement par atorvastatin</i>	269
6.4.1.4 <i>La voie des protéases extrinsèques</i>	271
<u>6.5 Sommaire des principales observations</u>	275
7 CONCLUSION	278
8 ANNEXE	XXIX

Liste des tableaux

Tableau I. Protéines régulatrices du complément.	49
Tableau II. Initiateurs des différentes voies du complément	52
Tableau III. Production des composantes du complément par l'endothélium vasculaire dans différentes conditions physiopathologiques.....	111
Tableau IV. Activation des cellules endothéliales par le complément et/ou le complément activé.	112
Tableau V. Caractéristiques cliniques des patients à l'admission selon leurs niveaux de base de MBL.	250
Tableau VI. CK, CK-MB et paramètres d'activation du complément dépendamment des niveaux de base de MBL.....	252
Tableau VII. Effets du pexelizumab sur les variations sériques de différents groupes de marqueurs inflammatoires.....	263

Liste des figures

Figure 1. Chronologie des investigations effectuées.....	5
Figure 2. Nombre de décès par maladies cardiovasculaires par année.....	7
Figure 3. Classification des maladies coronariennes.	19
Figure 4. Schématisation des différents types de patients inclus dans les différents volets de ma thèse.....	28
Figure 5. Cascade d'activation du complément.	31
Figure 6. Élimination des complexes C5b-9 par vésiculation.....	46
Figure 7. Structure du complexe C1	54
Figure 8. Activation du complément par la voie lectine	85
Figure 9. Cascade d'activation de la voie lectine.....	88
Figure 10. APEX-AMI : outil pour une meilleure compréhension des mécanismes d'activation du complément dans les SCA.	234
Figure 11. Étude APEX-AMI	236
Figure 12. Détection de l'activité relative des voies proximales du complément par le COMPL300	247
Figure 13. Activité relative (%) de la voie lectine, classique et alterne dans l'activation totale du complément.	248
Figure 15. Interactions TSP-1/C3 convertase alterne qui sont ou seront caractérisées dans notre laboratoire.	273
Figure 16. Interactions entre la TSP-1 et les différentes composantes de la C3 convertase de la voie alterne du complément.	275

Liste des sigles et abréviations

Ac	Anticorps
A23187	Calcimycine (ionophore calcique)
ACE	Angiotensin-converting enzyme ; enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Ag	Antigène
Apo	Apolipoprotéine
ARNm	Acide ribonunucléique messenger
ASP	Acylation Stimulating Protein
Ba	Produit d'activation du facteur B
Bb	Produit d'activation du facteur B
BCA	Bicinchoninic acid (test de dosage des protéines)
C1	Composante 1 du complément
C1INH	Inhibiteur du complexe C1 de la voie classique
C1qrs	Complexe C1
C2	Produit d'activation du C2
C2b	Produit d'activation du C2
C3	Composante 3 du complément
C3a	Produit d'activation du C3
C3b	Produit d'activation du C3
C3bBb	C3 convertase de la voie alterne
C3bBb3b	C5 convertase de la voie alterne
C3NF	C3 nephretic factor ; facteur néphritique C3
C4	Composant 4 du complément
C4a	Produit d'activation du C4
C4b	Produit d'activation du C4
C4b2a	C3 convertase de la voie classique
C4b2a3b	C5 convertase de la voie classique
C4bBP	C4b binding protein ; protéine de liaison du fragment C4b
C4NF	C4 nephretic factor ; facteur néphritique C4
C5	Composante 5 du complément
C5a	Produit d'activation du C5
C5b	Produit d'activation du C5
C5b-9	Complexe terminal du complément
C6	Composante 6 du complément
C7	Composante 7 du complément
C8	Composante 8 du complément
C8BP	C8 binding protein ; protéine de liaison du fragment C8
C9	Composant 9 du complément, dernière composant du complexe lytique

CABG	Coronary Artery Bypass Graft Surgery
CAM	Complexe d'attaque membranaire
CBA	Cytometric Bead Array
CD34+	Cellules endothéliales primitives
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
CH50	Complement hemolytic 50%: Test représentant 50% de l'activité hémolytique du complément
CK-MB	Créatinine-kinase MB
CML	Cellule musculaire lisse
CR1	Erythrocyte complement receptor 1
CR1	Complement receptor 1 ; Récepteur 1 du complément
CR2	Complement receptor 2 ; Récepteur 2 du complément
CR3	Complement receptor 3 ; Récepteur 3 du complément
CRP	C-reactive protein ; protéine C-réactive
CS	Cellule spumeuse
CTC	complexe terminal du complément
CVF	facteur de venin de cobra
CVF	Cobra venom factor; facteur venin de cobra
DAF	Decay acceleration factor ; facteur accélérateur de la dissociation
ECG	Électrocardiogramme
EDTA	Ethyle Diamine Tetraacetic Acid ; chélateur de calcium
EGF	Epidermal growth factor ; facteur de croissance
E-LDL	Enzymatically remodeled LDL ; LDL enzymatiquement modifiés
E-LDL	Lipoprotéine de faible densité enzymatiquement modifiée
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay ; principe de détection de protéines basé sur l'interaction anticorps/antigène
FACS	Fluorescence-activated cell sorter ; méthode de tri cellulaire par fluorescence
Facteur P	properdine
fB	Facteur B, composant du complément
fD	Facteur D, composant du complément
fH	Facteur H, composant du complément
fI	Facteur I, composant du complément
FT	Facteur tissulaire
Fut-175	Futhan, Nafamostat Mesilate ; inhibe l'activation ex vivo du complément
GlcNAc	N-Acétylglucosamine
GPIIb/IIIa	Glycoprotéine IIb/IIIa
HANE	Hereditary angioneurotic edema ; Œdème angioneurotique héréditaire
HDL	Lipoprotéine de haute densité

HMG-CoA	hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A
HRF	Facteur de restriction homologue
HSP	Heat shock protein ; protéine de choc thermique
HUS	Hemolytic uremic syndrome ; syndrome hémolytique et urémique
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
I/R	Ischémie-reperfusion
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IM	Infarctus du myocarde
LDL	Low density lipoprotein ; lipoprotéine de faible densité
LED	Lupus érythémateux dissimulé
LMWH	Low molecular weight heparin ; héparine à faible poids moléculaire
LPS	Lipopolysaccharides
MAC	Membrane attack complex ; complexe d'attaque membranaire
MAp19	Produit de clivage de MASP-2
MASP	MBL Associated Serine Protease ; protéase sérique associée au MBL
MBL	Mannose binding lectin ; lectine qui se lie aux structures mannoses
MCP	Membrane cofactor protein ; cofacteur protéique membranaire (CD46)
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 ; protéine montrant une chimiotaxie spécifique pour les monocytes
MI	Myocardial infarction
MIRL	Inhibiteur membranaire de la lyse réactive
MMP	Métalloprotéase matricielle
NSTEMI	Non ST-elevation myocardial infarction ; Infarctus du myocarde sans élévation du segment ST
oxLDL	Lipoprotéine de faible densité oxydée
PAC	Pontage aorto-coronarien
PCh	Phosphocholine
PCI	Percutaneous coronary intervention ; Intervention coronarienne percutanée
PDGF	Platelet-derived growth factor ; Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEG	Polyéthylène Glycol, tests qui permettent de détecter les complexes immuns circulants
PNH	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria ; Hémoglobinurie paroxystique nocturne
PTX3	Pentraxine longue
RCA	Regulators of complement activity ; régulateurs de l'activité du complément
RID	Radial immunodiffusion, immunodiffusion radiale
SA	Stable angina ; Angine stable
SAA	Sérum amyloïde A
SAP	Sérum amyloïde P
sC5b-9	Complexe terminal soluble du complément

SCA	Syndrome coronarien aigu
sCAD	Stable coronary artery disease ; maladie artérielle coronarienne stable
sCR1	Soluble complement receptor 1 ; Forme soluble du Récepteur 1 du complément
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein ; éléments régulateurs des stérols
STEMI	ST-elevation myocardial infarction ; Infarctus du myocarde avec élévation du segment ST
TNF- α	Tumor necrosis factor α ; Facteur de nécrose tumorale α
Tn-T	Troponine-T
TRAP	Thrombin receptor agonist peptide-6
TSP-1	Thrombospondine-1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

*À ma mère, la plus merveilleuse d'entre
toutes*

Remerciements

J'aimerais remercier tout le personnel de l'équipe du Dr Pierre Théroux :

Jacinthe Rivard, Marta Ghitescu, Said Matar, Jonathan B. Béland, Pascal Maurice, Judith Babin, Arnaud Bonnefoy et Benoit Labarthe, membres du personnel de recherche. Un merci spécial s'adresse à Mme Ghitescu, femme de cœur et d'esprit, Mme Rivard, amie et confidente, et M. Matar, homme patient et surtout tolérant; Marie-Andrée Séguin, Marie-France Bouchard, Anne-Marie Poitras, Susanne Bujold, Nathalie Gendron, secrétaires et infirmières de notre équipe. Bien sûr un merci immense au Dr Pierre Théroux, sommité mondiale dans la recherche cardiovasculaire à qui je suis reconnaissante de m'avoir laissée la chance d'évoluer sous sa direction vigilante.

Merci à mes amis et ma famille, qui ont cru en moi tout au long de ces années, parfois difficiles :

Un merci spécial à Catherine Labbé, future PhD, d'une intelligence intellectuelle et émotionnelle inouïe ; ma «gang de filles» de Sorel ; mes amies si proches du Saguenay et de l'Abitibi, Josianne Leblanc et Annick Tremblay ; mes frères Louis-Pierre, Alexandre et Jean-Philippe, ma sœur, Véronic et mes six neveux et nièces. Évidemment, les personnes qui comptent le plus pour moi, mes parents, Claire et Maurice, qui ont eu confiance en moi et qui me poussent à aller au bout de moi-même dans ce que j'aime.

Finalement, je remercie les *Instituts de Recherche en Santé du Canada* (IRSC) pour leur soutien financier (Bourse de formation au doctorat) et l'Université de Montréal pour les bourses d'Excellence et de Rédaction.

Merci !

AVANT-PROPOS

Depuis sa fondation en 1954, l'Institut de Cardiologie de Montréal (ICM) est devenu un lieu de grande notoriété internationalement reconnu. Ce qui fait la force de l'ICM, c'est cette recherche translationnelle dans laquelle les avancées fondamentales se juxtaposent aux connaissances cliniques. Cette puissante coalition contribue à transformer les nouvelles connaissances scientifiques en bénéfices tangibles pour la clinique.

Ma formation, que j'ai acquise dans l'équipe du Dr Pierre Thérioux, s'est déroulée selon cette avenue translationnelle, dans l'optique de développer de nouvelles approches pour le diagnostic et le traitement des maladies cardiovasculaires. Au début un peu sceptique face à la charge de travail qui m'avait été attribuée dans le laboratoire du Dr Thérioux à titre de doctorante, j'apprécie maintenant avoir pu explorer diverses facettes du métier de chercheur. C'est d'ailleurs suite à des commentaires très positifs sur l'étendue de mes aptitudes que, lors d'entrevues pour un stage post-doctoral, j'ai compris l'utilité d'avoir diversifié mes activités scientifiques à ce point.

Mon stage dans le laboratoire du Dr Thérioux ne fut pas limité à mettre au point et à exécuter des expériences et à rédiger des articles scientifiques. Dans ce laboratoire, j'ai pu forger davantage mon caractère en acquérant à la fois autonomie, souplesse et sens des responsabilités. Durant mon cursus, j'ai pu gagner de nombreuses connaissances et développer des aptitudes très variées : mise au point et exécution de techniques très diversifiées (pour mes propres projets ou pour d'autres), participation à la rédaction de demandes de financements et de protocoles de recherche ou d'éthique relatifs à des sous-études cliniques, conception de données statistiques, correction d'articles à titre de réviseur pour des revues scientifiques (*Circulation*, *Clinical Biochemistry*) et évidemment, rédaction d'articles. En plus de ces activités internes, j'ai pu transmettre mes connaissances scientifiques par l'entremise de présentations orales et par affiches dans de multiples congrès locaux, nationaux et internationaux : 2 fois à l'*American Heart Association*, 1 fois au Congrès de l'*American College of Cardiology (ACC)*, 3 fois au Congrès Canadien sur la Santé Cardiovasculaire (*CCS*), et 3 fois à la Journée de la Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal et 1 fois au congrès de la Relève des IRSC. Toutes ces activités de

recherche m'ont permis de développer non seulement l'autonomie dont les chercheurs doivent faire preuve, mais aussi le sens de la gestion et du travail d'équipe.

En plus de développer la ligne directrice de mon projet qui allait me permettre d'atteindre mes objectifs de formation, j'ai pu, dès le début de ma vie de doctorante, développer des aptitudes de recherche qui m'ont aussi permis de participer à la réalisation d'études extérieures à mon projet. Puisque le laboratoire du Dr Théroux figure comme un laboratoire central d'analyse pour plusieurs études cliniques dans lesquelles il participe, j'ai eu l'occasion à maintes reprises de contribuer au développement de diverses études cliniques, que ce soit par la rédaction de protocoles relatifs à des sous-études ou à la réalisation de travaux techniques. Bien que, malheureusement, mon nom n'ait pu y figurer à toutes les fois à titre d'auteur, plusieurs de ces études, qu'elles soient locales ou internationales, ont été ou seront publiées dans un avenir proche (i.e. travaux avec les Drs Benoit Labarthe, Zihui Xiao, Merten Trendelenburg et les investigateurs de l'étude multicentrique APEX-AMI).

Dans le cadre de mon programme de doctorat, j'ai aussi eu l'occasion de coopérer à d'autres projets effectués à l'extérieur de mon laboratoire. Une première collaboration fut établie avec les Drs Michel Carrier et Bertrand Marcheix du département de chirurgie de l'ICM. Le projet consistait à observer les effets de différentes techniques de traitement du sang lors de pontages aorto-coronariens sur la réponse inflammatoire post-opératoire, caractérisée par l'activation du système du complément. Dans le cadre de cette étude, j'ai largement contribué à la sélection des paramètres plasmatiques pertinents, à la réalisation de ces tests de laboratoire, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. Les conclusions de cette étude ont été présentées dans divers congrès nationaux et internationaux (Congrès de la Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire 2007, Congrès de l'*American Heart Association* 2007 et Congrès de l'*European Society of Cardiovascular Surgery* 2007) et un article a été publié dans *The Annals of Thoracic Surgery* [9]. Cet article a été inclus en annexe de ma thèse.

En plus de ces tests effectués dans un cadre plutôt clinique, une bourse obtenue dans le cadre d'une collaboration avec l'INSERM et le consulat de France m'a permis d'aller chercher une formation un peu plus fondamentale. Réalisé dans le laboratoire du Dr Bernard Lévy (Hôpital Lariboisière, Paris, France), ce court stage de deux mois m'a familiarisée, d'un point de vue technique, avec les modèles murins et, d'un point de vue théorique, avec les effets de la thrombospondine-1 (TSP-1) dans l'adhésion des cellules progénitrices à l'endothélium vasculaire¹. Le but global de ce stage était d'initier une collaboration entre le laboratoire du Dr Théroux et celui du Dr Lévy et, par conséquent, d'introduire dans notre laboratoire de nouvelles expertises scientifiques. Bien que ma formation ait davantage servi à contribuer à l'avancement de projets extérieurs à l'élément central de ma thèse, ces nouvelles connaissances m'ont donné la chance d'explorer de nouvelles avenues dans mon propre sujet de recherche. Par contre, les interactions et les homologies déjà connues entre la TSP-1 et diverses protéines du complément m'ont amenée à réfléchir aux différents angles par lesquels explorer l'activation du complément dans les maladies coronariennes. Bref, mes acquis en terre parisienne m'ont aussi donné la chance de développer de nouvelles avenues s'intégrant à merveille comme une suite logique du tracé de ma thèse. Ces travaux, maintenant bien amorcés, deviendront le projet d'un éventuel candidat au doctorat dans le laboratoire du Dr Pierre Théroux.

Objectif et structure de la thèse

Le complément est un système complexe reconnu principalement pour son rôle primordial dans l'immunité. Cependant, lorsqu'il est activé de manière inappropriée ou excessive, il peut être à l'origine de nombreux dommages cellulaires caractéristiques de plusieurs pathologies inflammatoires dont fait partie le syndrome coronaire aigu (SCA).

¹ Malheureusement, les travaux effectués dans le laboratoire du Dr Lévy ne seront pas inclus ni discutés dans cette thèse, puisque cette dernière se concentre autour du Système du complément. Par contre, les nouvelles idées développées à partir de ce projet feront l'objet de discussion dans le chapitre 6, réservé à cette fin.

L'objectif global de mon travail de doctorat a été de caractériser les rôles physiopathologiques du complément dans les interactions inflammation-thrombose du syndrome coronarien aigu dans le but ultime de trouver des cibles thérapeutiques allant permettre le développement de nouvelles approches pour le traitement de cette pathologie. Pour ce faire, nous avons établi un parcours d'investigations interconnectées qui allait se concrétiser graduellement tout au long de mon cursus (figure 1).

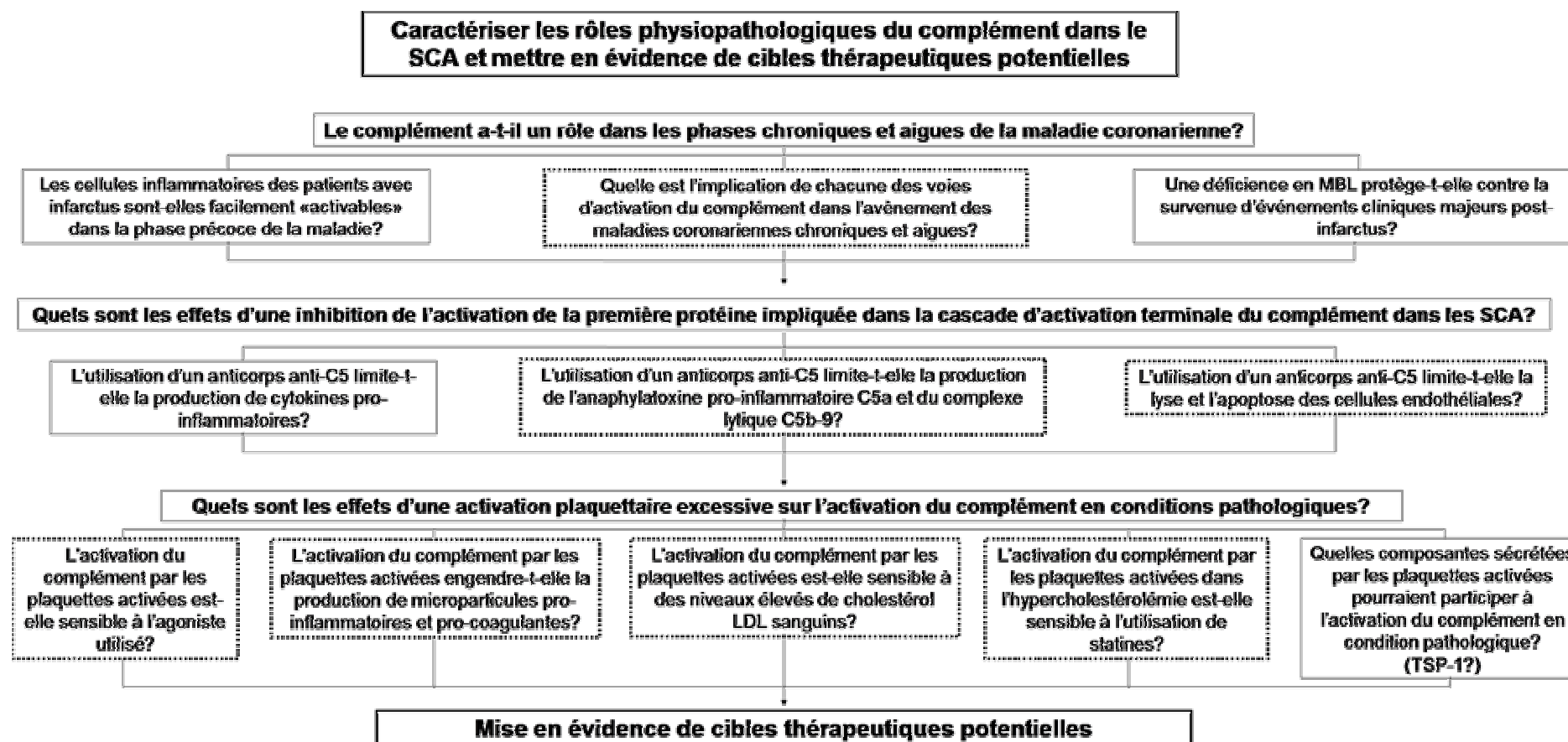


Figure 1. Chronologie des investigations effectuées. Les boîtes en pointillés sont les sujets qui ont été traités dans les articles inclus dans cette thèse. Les autres interrogations annoncées sont le sujet d'articles en préparation ou de recherches actuelles.

Voici donc comment s'élaborera ma thèse :

La section *Introduction* de ma thèse sera divisée en quatre chapitres : (1) description des différentes pathologies coronariennes qui ont été abordées dans mes travaux; (2) description générale de la cascade d'activation du système du complément et des différentes protéines ou groupes de protéines qui la composent; (3) description des différents mécanismes ou éléments impliqués dans la maladie coronarienne aiguë qui peuvent être des éléments déclencheurs de l'activation du complément; (4) et finalement, à l'inverse, description des mécanismes par lesquels le complément peut être impliqué dans le développement de la maladie coronarienne aiguë.

Dans la section *Résultats*, je présenterai les quatre différents articles soumis pour publication ou en phase de préparation finale, que j'ai écrits dans les derniers mois de mon doctorat. Une courte description précèdera chacun des articles inclus.

La section *Discussion* consistera en une synthèse des articles décrits dans la section *Résultats*. De plus, des résultats préliminaires provenant d'investigations que j'ai aussi effectuées pendant mon cursus seront intégrés à la discussion.

Finalement, ma thèse sera clôturée par une section *Annexe* dans laquelle seront introduits entre autre un article qui a été publié en 2006 dans *The Canadian Journal of Cardiology* [10] et la publication originale relative à la collaboration effectuée avec les Drs Carrier et Marcheix publiée en 2008 dans *The Annals of Thoracic Surgery* [9].

INTRODUCTION

Fléau mondial, la maladie cardiovasculaire tue près de 17 millions d'habitants par année à travers le monde (Organisation Mondiale de la Santé). Près de la moitié des décès relatifs aux maladies cardiovasculaires sont attribuables aux maladies coronariennes, dont font partie l'angine stable, l'angine instable et les infarctus du myocarde (figure 2).

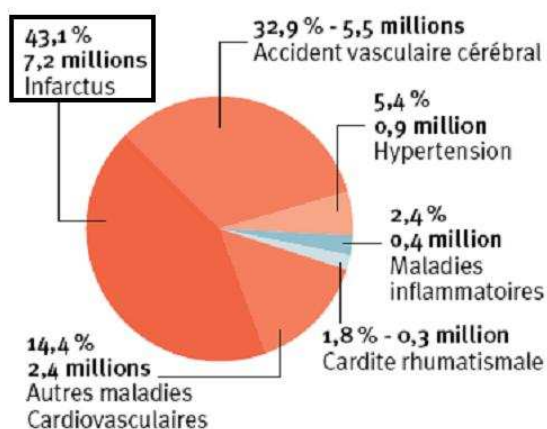


Figure 2. Nombre de décès par maladies cardiovasculaires par année. L'infarctus du myocarde est sans aucun doute le type de pathologie le plus meurtrier. (Source : Organisation Mondiale de la Santé, 2002).

Les maladies coronariennes sont le résultat du développement de l'athérosclérose à l'intérieur des artères coronaires. L'athérosclérose est caractérisée par l'accumulation de particules lipidiques et de cellules du système immunitaire dans le sous-endothélium vasculaire, entraînant ainsi l'obstruction des artères par la formation d'une plaque athérosclérotique [11]. Bien que le développement de la plaque puisse altérer le passage du sang et engendrer une sténose aortique au site de la lésion initiale, la formation de la plaque en elle-même est un processus souvent asymptomatique. Les effets délétères de l'athérosclérose surviennent principalement au moment de l'érosion ou de la rupture de la plaque, ce qui favorise l'apparition de manifestations cliniques variables tels l'angine

stable, les syndromes coronariens aigus (angine instable, infarctus aigu du myocarde) ou même la mort subite [12, 13].

Les composantes inflammatoires du système immunitaire dans la maladie coronarienne

Depuis quelques années, de nombreuses études suggèrent que le système immunitaire serait largement impliqué dans la pathogénèse de l'athérosclérose et des maladies coronariennes [14-16]. Plusieurs composantes du système immunitaire participeraient au développement des maladies coronariennes. Par exemple, à plusieurs étapes de la progression de ces maladies, on dénote l'action des lymphocytes T, des macrophages, des autoanticorps (dirigés contre les cellules de l'hôte), des autoantigènes (composantes des parois vasculaires), des particules de cholestérol, des cytokines pro- et anti-inflammatoires qui sont sécrétées par les cellules qui composent la plaque athérosclérotique (i.e. IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-10, le TNF- α , l'INF- γ et les PDGF) et du système du complément [16].

De plus, l'activité pro-inflammatoire de ces composantes immunitaires engendre une réponse inflammatoire systémique impliquant la production par le foie de diverses protéines de la phase aiguë, telles les pentraxines (protéines C-réactives (CRP), pentraxine longue (PTX3) et sérum amyloïde (SA)) et le fibrinogène [17, 18]. En clinique, les pentraxines, comme la CRP [17, 19] et plus récemment le PTX3 [20, 21], sont utilisés comme marqueurs prédictifs de complications thrombo-emboliques [6].

La prévention des maladies coronariennes

Malgré les efforts intensifs pour diminuer l'inflammation qui semble responsable de l'initiation, la progression et les conséquences de l'athérosclérose, aucun traitement ne s'est avéré pleinement efficace dans l'atteinte du but ultime visé par une diminution de l'inflammation : la diminution de la mortalité.

Les traitements pharmacologiques classiques

Aujourd'hui, en 2008, la prévention des maladies coronariennes se fait, d'une part, par le contrôle des facteurs de risque (obésité, diabète, stress, dyslipidémie, hypertension, tabagisme) et d'autre part par des thérapies pharmacologiques hypolipémiantes (inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, ou statines, fibrates) [22] et hypotensives (β -bloqueurs, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, bloqueurs de canaux calciques, nitrates) [23, 24].

De plus, depuis une vingtaine d'années, des agents anti-plaquettaires sont prescrits aux patients présentant des symptômes de la maladie coronarienne [25, 26]. L'acide acétylsalicylique, qui inhibe la cyclo-oxygénase et la synthèse de thromboxane A₂, ainsi que le clopidogrel, un dérivé de la thienopyridine qui inhibe l'activation des plaquettes par le récepteur à l'ADP (*adenosine diphosphate*) P2Y₁₂, sont utilisés dans le but de prévenir les complications cardiovasculaires majeures (infarctus, mort subite, accident vasculaire cérébral, etc). La combinaison de ces deux traitements potentialise leurs effets et contribue à diminuer les incidences de décès soudains, d'infarctus du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux ou d'ischémie réfractaire chez les patients avec angine instable [27]. Dans le but de revasculariser les sections du cœur privées d'oxygène, les techniques d'angioplasties ou de pontages aorto-coronariens sont souvent employées. Pour éliminer les risques de complications ischémiques durant ces procédures, un autre anti-plaquettaire est fréquemment utilisé : les antagonistes des GPIIb/IIIa [28]. Lors de ces interventions, des anticoagulants, tels l'héparine, l'héparine à bas poids moléculaire et les antithrombines (bivaluridine et anti-Xa (fondaparinux) sont utilisés [28].

Les statines

Les statines sont une classe de médicaments hypolipémiants qui visent à diminuer les niveaux de cholestérol sanguin. Il existe plusieurs sortes de statines, que l'on peut diviser en deux groupes : les statines dérivées de la fermentation, aussi appelées «statines semi-synthétiques» ou «statines naturelles» (lovastatin, simvastatin, pravastatin), et les statines synthétiques (atrovastatin, fluvastatin, pitavastatin, resuvastatin). Alors que les

premières sont des substances fongiques modifiées, les secondes sont entièrement synthétisées en laboratoire. Les statines exercent leur effet hypolipidémiant en bloquant l'action de l'HMG-CoA réductase, enzyme peroxyzomale qui catalyse la réaction initiale et limitante de la cascade menant à la synthèse du cholestérol endogène [29, 30]. L'inhibition de la synthèse du cholestérol endogène par les statines aura pour effet de diminuer les réserves intracellulaires de cholestérol et d'activer les facteurs de transcription reconnaissant les éléments régulateurs des stérols (*sterol regulatory element-binding protein*, SREBP). Ces derniers induisent l'expression d'un certain nombre de protéines impliquées dans la clairance des particules LDL en circulation, tels que les récepteurs des LDL au niveau des hépatocytes. En stimulant la production des récepteurs des LDL au niveau des hépatocytes, les statines auront pour effet d'éliminer le LDL de la circulation et donc de diminuer les taux de mauvais cholestérol sanguin (LDL-C) de même que le cholestérol total.

En 2008, une équipe de chercheur a divulgué les résultats tant attendus de l'étude JUPITER (*Justification for the Use of Statins in Prevention : An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin*), une étude de 17802 patients recrutées dans 1300 centres situés dans 26 pays (Congrès de l'*American Heart Association* (Nouvelle-Orléans, LA, É-U, 2008)) [31]. L'étude testait l'hypothèse qu'un traitement quotidien par 20 mg de rosuvastatin comparativement au placebo pourrait réduire les risques d'apparition des premiers signes d'événements cardiovasculaires chez des individus avec un cholestérol normal (130 mg/dL) mais des niveaux de CRP de plus de 2 mg/L. Les résultats ont démontré que l'utilisation quotidienne de 20 mg de rosuvastatin chez des sujets avec un taux de cholestérol considéré normal (130 mg/dL) mais avec un taux élevé de CRP (2 mg/L) réduit significativement de 44 %, par rapport au groupe placebo, l'incidence d'événements cardiovasculaires majeurs (association d'infarctus du myocarde non fatal, AVC non fatal, hospitalisation pour angine instable, revascularisation et mort confirmée due à une cause cardiovasculaire) [32].

Malgré des résultats à première vue très positifs, les chiffres de l'essai montrent que la diminution relative du risque est importante mais que la diminution absolue est faible : dans le groupe traité par placebo, 1.36 patients sur 100 patients du groupe contrôle ont eu un des éléments du critère principal de l'essai contre 0.77 patient dans le groupe traité par rosuvastatin. La significativité statistique est non contestable mais est-ce que cela a une pertinence clinique ? On peut en douter. De plus, il n'a pas été exclu dans l'étude que les effets bénéfiques de la rosuvastatin ne seraient pas engendrés par sa capacité à diminuer le cholestérol. En effet, les résultats de l'étude démontrent une diminution moyenne de 50% des taux de cholestérol chez ses patients traités par la rosuvastatin. Or, ceci suggère que, en général, les seuils utilisés pour décrire un niveau de cholestérol élevé sont peut-être trop bas. Ainsi, l'efficacité, bien que contestée, des statines à diminuer l'incidence d'événements cardiovasculaires majeurs peut simplement résider dans le fait qu'elle diminue efficacement le LDL sanguin.

Les effets pléiotropiques des statines

Bien que plusieurs études aient démontré l'efficacité des agents inhibiteurs de la HMG-CoA réductase à diminuer le cholestérol sanguin, d'autres recherches tendent à démontrer l'efficacité des fonctions pléiotropes (c'est-à-dire indépendante de leur capacité à diminuer le cholestérol sanguin) des statines à plusieurs niveaux de la progression de l'athérosclérose et des complications athérotrombotiques [33, 34]. En modifiant l'activité des plaquettes et en inhibant directement le processus inflammatoire par la diminution de l'activation des cellules immunes impliquées dans la progression de l'inflammation et par un effet sur les protéines régulatrices du système du complément, les statines auraient la capacité de moduler la fonction endothéliale, la stabilité de la plaque et la prévention de la formation de thrombus.

En inhibant la HMG-CoA réductase, les statines inhibent la production de d'autres éléments en amont du mevalonate. Ainsi, deux intermédiaires isoprénoides importants, le farnesylpyrophosphate (FPP) et le geranylgeranylpyrophosphate (GGPP), sont inhibés par l'action des statines (Figure 3). Ces deux composants sont des éléments importants dans

l'isoprenylation (ou prenylation). L'isoprenylation consiste en une modification post-translacionnelle d'une protéine suite à l'addition d'un lipide isoprenoïde, tels le FPP ou le GGPP. L'isoprenylation joue un rôle essentiel dans l'activité biologique des protéines contenant un groupement carboxy-terminal CaaX. Parmi ces protéines, on compte les protéines signalisatrices couplées à la protéine G, soit les protéines de la famille des petites GTPases tel que Ras, Rac et Rho, l'homologue de Ras). Ces petites protéines sont responsables du cycle GDP inactif en GTP actif et, surtout, elles tiennent un rôle crucial dans le contrôle de multiples voies de signalisation. L'inhibition de l'isoprenylation par les statines engendrera l'accumulation cytoplasmique des protéines farnesylées et geranylées (particulièrement Rho et Ras) [35]. Cette inhibition aura pour conséquence finale d'altérer la signalisation cellulaire responsable de la division cellulaire, de la présentation des antigènes, de la formation du cytosquelette, de la motilité cellulaire, du transport membranaire, de l'activation de facteurs de transcription et la stabilité membranaire. Le degré de responsabilité respectif des deux types d'isoprenoïdes dans l'isoprenylation des protéines dépend du type de cellule. Dans les cellules endothéliales par exemple, c'est la GGPP qui est responsable de la translocation du Rho, contrairement à la translocation du Ras qui est dépendante de la FPP [36]. Bref, jusqu'à présent, les études convergent pour s'entendre que l'inhibition de ces composantes isoprenoïdes essentielles à la signalisation cellulaire permet aux statines d'exercer leurs effets pléiotropes [37, 38].

Les effets pléiotropes bénéfiques des statines relatifs à la protection vasculaire semblent inclure des effets bénéfiques sur l'endothélium vasculaire (augmentation de l'expression de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS)), l'angiogenèse et la stabilité de la plaque athéromateuse, tout en procurant des effets anti-thrombotiques (augmentation de l'activité fibrinolytique), anti-oxydants, anti-inflammatoires et immunomodulateurs, dont une augmentation de la résistance au complément. Ainsi, parce que les réactions autoimmunes semblent maintenant être de plus en plus reliées avec les maladies cardiaques, des études tendent à démontrer l'utilité des statines dans le traitement des maladies autoimmunes. Elles agiraient principalement sur les différentes fonctions des cellules

majoritairement impliquées dans l'immunité, soit les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T. Les principales fonctions atteintes seraient le recrutement de ces cellules au niveau de l'intima, de même que la différenciation, la prolifération et les activités de sécrétion de ces cellules. Des études récentes ont démontré que les statines pourraient aussi moduler l'activation excessive du système du complément et ce, à différents niveaux de la cascade.

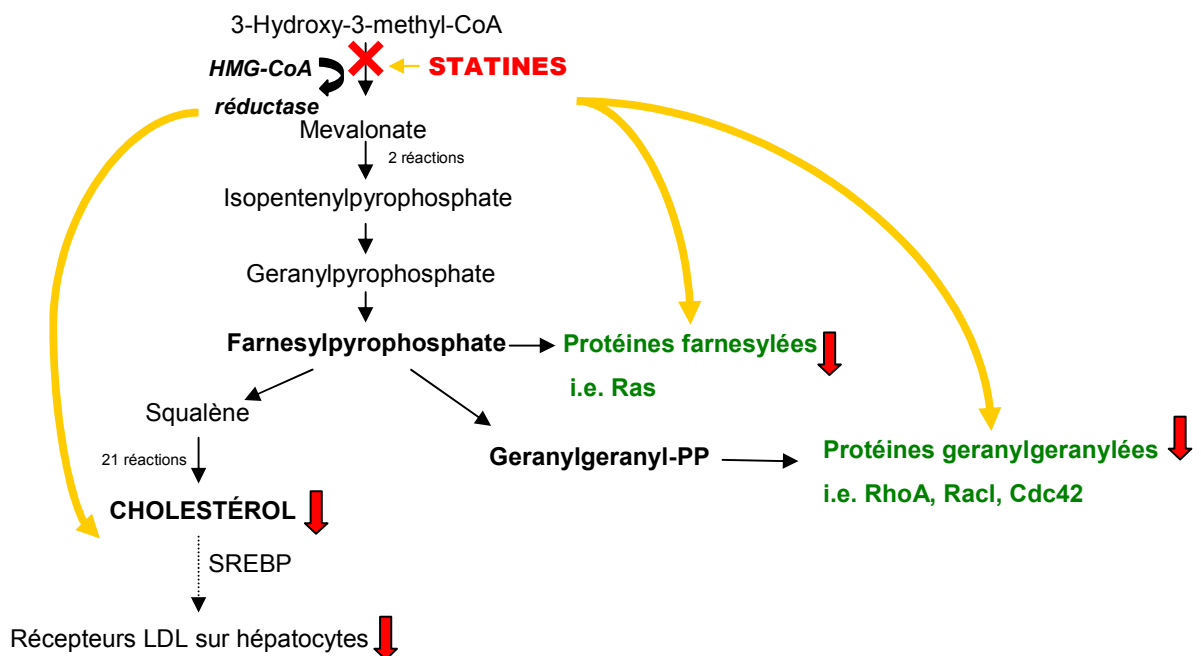


Figure 3. La voie de l'HGM-CoA réductase. Les composants en vert sont les effecteurs responsables de certains effets pléiotropiques (non reliés à la réduction du cholestérol) des statines.

Kwak a été le premier à démontrer la capacité des statines à inhiber l'expression du CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité) induite par l'interféron- γ (INF- γ) [39]. Cette inhibition s'est avérée observable dans plusieurs types de cellules, dont les cellules endothéliales et les macrophages. Le mécanisme intracellulaire précis par lequel les statines

inhibent l'expression du CMH II induite par l'INF- γ consiste en l'inhibition du promoteur IV inductible du transactivateur de classe II (CIITA), qui régule la transcription génique du CMH II. Le CMH II est nécessaire dans la présentation de l'antigène et dans l'activation des lymphocytes T par le récepteur de ces mêmes lymphocytes. D'une part, en inhibant l'expression du CMH II induite par l'INF- γ , les statines empêchent la liaison entre les CMH II et les cellules T, puis empêchent la formation de complexes immuns susceptibles d'activer le système du complément et de favoriser la lyse des cellules avoisinantes. D'autres parts, les statines inhibent l'activation des cellules T engendrée par les CMH II et empêche la prolifération des autres cellules T, leur différenciation en cellules effectrices (Th1 ou Th2, *h* pour *helper*) et leur sécrétion de cytokines. Des études, tant *in vitro* que *in vivo*, tendent à démontrer que les statines auraient tendance à favoriser une réponse de type Th2 au détriment du type Th1. Les cellules de type Th1 sécrètent des cytokines dites pro-inflammatoires (INF- γ et TNF- α) alors que les cellules de type Th2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13, TNF- β). La production de cytokines induites lors d'une réponse dirigée par les lymphocytes Th1 aurait tendance à être grandement diminuée par la présence de statines.

Les statines peuvent aussi moduler l'activation des lymphocytes T par des propriétés allostériques. L'utilisation du lovastatin et du simvastatin a démontré que les statines étaient aptes à bloquer les interactions cellule-cellule et ce, directement. En effet, ces deux types d'inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase bloquent sélectivement la co-stimulation et l'adhésion des lymphocytes impliquant la LFA-1 (leukocyte function antigen-1) en liant un site régulateur spécifique de la β 2 intégrine du LFA-1, soit le site L [40]. Ainsi, les statines bloqueraient directement l'interaction entre les lymphocytes et les cellules endothéliales, liées entre elles par des ligands qui leur sont propres, soit le LFA-1 et le ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*), respectivement [41]. Les répercussions de cet effet pléiotrope des statines sur l'athérosclérose seraient grandement bénéfiques ; l'adhésion, l'activation et le recrutement des cellules T seraient inhibés au niveau de la plaque athérosclérotique. Finalement, la production de cytokines pro-inflammatoires

induite lors de l'activation des cellules T serait elle-même limitée, ce qui diminuerait grandement l'amplification de la cascade inflammatoire observable dans la progression de l'athérosclérose. De plus, il a été démontré qu'une déficience en cellules T chez les souris qui développent spontanément une maladie autoimmune (lupus) inhibe la production d'auto-anticorps et de pathologies sévères découlant d'un trouble autoimmun (i.e. glomérulonéphrite) [42].

Dans un autre ordre d'idées, Meroni a démontré que l'activation thrombogénique de l'endothélium vasculaire initiée par l'anticorps anti- β IIGPI était inhibée par les statines [43]. Ces dernières inhibent l'expression de la E-sélectine et de l'ICAM-1 induite par ces mêmes anticorps. Or, les statines inhibent l'expression des molécules d'adhésion de l'endothélium vasculaire. De plus, les mêmes auteurs ont démontré que, chez des modèles animaux *in vivo*, la fluvastatin diminuait la thrombose et l'activation des cellules endothéliales, toutes deux orchestrées par les anticorps anti-phospholipides [44].

Il ne faut pas oublier que la capacité des statines à interférer avec l'activation des cellules T peut résider simplement dans leur capacité à diminuer le cholestérol membranaire. Le cholestérol est un élément clé de la structure et de la fonction des membranes cellulaires. Or, les réactions qui suivent la liaison entre un lymphocyte T et son antigène sont orchestrées par une série de molécules présentes dans une section de la membrane cellulaire qui s'avère riche en cholestérol. Ces régions sont appelées *lipid rafts* (domaines lipidiques) ont pour fonction de rassembler toutes les molécules nécessaires à l'activation des cellules immunitaires, mais aussi d'assurer la dispersion entre ces molécules lorsque les conditions présentes ne sont pas favorables à l'activation de ces cellules. Or, la réduction du cholestérol membranaire par les statines perturbe la membrane lipidique et altère l'expression et la distribution des domaines lipidiques. Par conséquent, les fonctions des lymphocytes en seront affectées : le déclenchement de la cascade de production de cytokine et la réponse inflammatoire qui s'en suivent en seront diminuées et la progression de l'athérosclérose en sera ralentie [45].

L'effet des statines sur l'activation du complément a d'abord été controversé : une première étude publiée en 2004 démontrait que les statines (et les métabolites de statines) n'avaient aucun effet sur l'activation du complément *in vitro* [46].

Par ailleurs, une étude plus récente menée dans la pathogénèse de l'arthrite rhumatoïde a démontré que l'atorvastatine contribue à augmenter la production de certaines protéines régulatrices du complément (CD59 et DAF) par les cellules endothéliales en condition d'hypoxie [47]. Cette augmentation des protéines régulatrices parvenait à inhiber la production de C3 et C9, de même que la lyse cellulaire suivant la mise en contact des cellules endothéliales avec le sérum. Cette découverte importante démontre que les statines ont le potentiel de réguler la production des protéines régulatrices du complément dans des situations où les tissus sont privés d'oxygène, inhibant ainsi l'activation à la fois proximale et terminale du complément. Cette caractéristique confère aux statines une raison de plus d'être considérées comme des anti-inflammatoires potentiels. Bien qu'il a été démontré que les statines n'ont pas d'effets sur l'activation du complément *in vitro*, tout porte à croire que les statines auraient un effet sur l'activation du complément en condition pathologique, comme par exemple lors des dommages de reperfusion (infarctus du myocarde, PCI, PAC).

Des études effectuées dans des modèles animaux et *in vitro* ont démontré que les statines diminuent l'activité plaquettaire [48, 49]. L'atorvastatin est une des statines qui inhibe particulièrement efficacement l'expression du récepteur à la thrombine PAR-1 [50]. De plus, il a été soulevé que les statines pouvaient influencer directement le contenu lipidique des plaquettes, résultant ainsi à une diminution des fonctions plaquettaires [51]. Finalement, en inhibant l'expression de COX-2 plaquettes-dépendantes par les cellules endothéliales, les statines réduisent aussi l'interaction CD40-CD40L entre les plaquettes et les cellules endothéliales [52].

Cibler l'inflammation par des traitements thérapeutiques précis

À la lumière des informations disponibles, nous pouvons conclure qu'aucun agent anti-inflammatoire direct n'a démontré une efficacité incontestée dans la prévention de la mortalité, de l'infarctus ou l'AVC. Certains médicaments, tels les statines et les inhibiteurs

de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, ne peuvent qu'agir en partie par des bénéfices indirects et secondaires sur l'inflammation. L'aspirine, quant à elle, n'apporte un effet anti-inflammatoire qu'à hautes doses : cet effet n'est que peu présent à de faibles doses employées en général dans la maladie cardiovasculaire. L'apport d'un traitement apte à maîtriser l'inflammation qui est en grande partie responsable de la maladie coronarienne, s'avère essentiel. Bloquer les effets délétères des composantes inflammatoires tout en conservant leurs propriétés essentielles à l'intégrité de l'organisme nécessite une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués.

Le présent travail contribuera donc à mieux connaître les mécanismes qui nous permettraient de maîtriser davantage l'inflammation spécifique dans les maladies coronariennes. L'élément central de cette thèse sera par conséquent un groupe de protéines qui sont à la jonction entre l'immunité innée et adaptative, aptes à modifier l'état inflammatoire et accroître les effets délétères des maladies coronariennes : le système du complément.

CHAPITRE 1

1 Les maladies coronariennes

Lorsqu'elle est présente dans les artères coronaires, l'athérosclérose engendre le développement de maladies coronariennes qui sont caractérisées par une diminution de l'apport sanguin dans certaines portions du cœur. La présente section consiste à décrire les différentes maladies coronariennes dans lesquelles j'ai pu étudier l'activation du complément : l'angine stable et les syndromes coronariens aigus. La figure 4 met en relation les diverses maladies coronariennes qui découlent de l'athérosclérose.

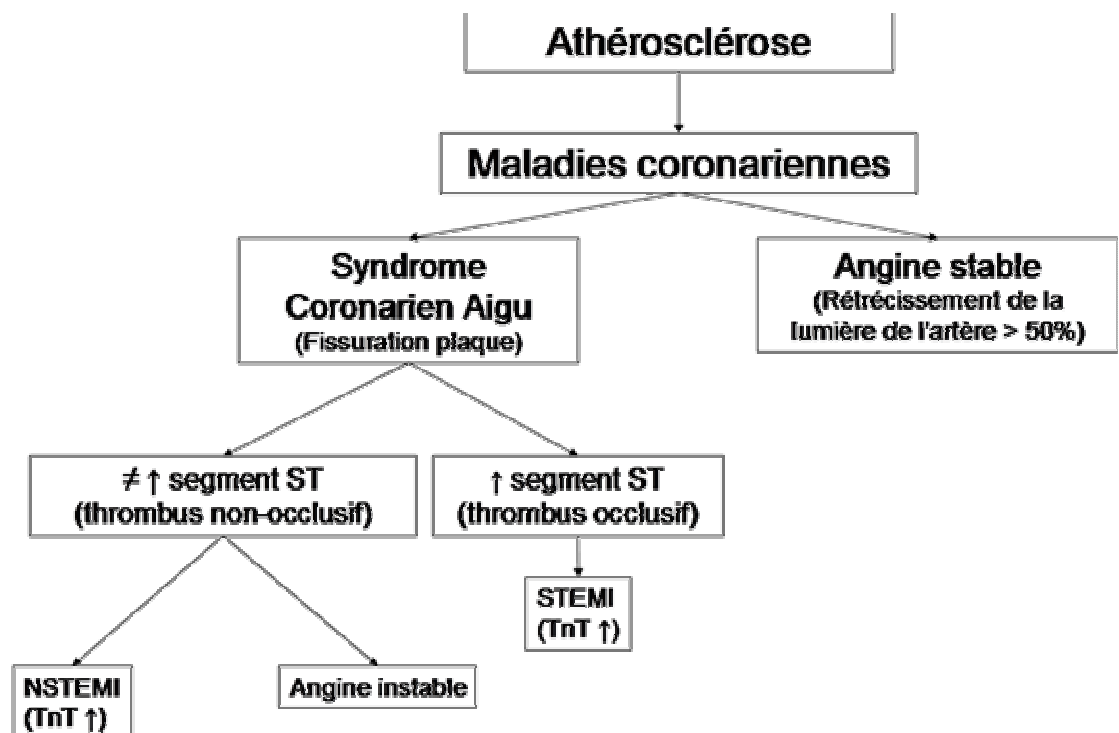


Figure 4. Classification des maladies coronariennes.

1.1 L'athérosclérose

Nous avons décrit précédemment les évidences physiopathologiques qui offrent la certitude que le développement et les résultantes de l'athérosclérose sont orchestrés par l'inflammation. Puisque, généralement, les maladies coronariennes sont caractérisées par la présence d'athérosclérose dans les artères coronaires [5, 53, 54], il s'avère primordial dans un premier temps de définir les étapes qui conduisent à la formation de la plaque athérosclérotique².

1.1.1 La formation de la plaque athérosclérotique

Aujourd'hui, l'athérosclérose est reconnue comme une maladie inflammatoire chronique, progressive et multifactorielle qui se développerait dès l'adolescence [55]. Plusieurs facteurs de risques, tels l'obésité, le diabète, le stress, la dyslipidémie, l'hypertension, le tabagisme, l'âge, le sexe et la prédisposition génétique seraient à l'origine de l'accélération ou de la modification de la progression de l'athérosclérose à travers les années. Malgré la diversité des facteurs de risque initiateurs de la maladie, un consensus (quasi) uniforme décrit la formation de la plaque athérosclérotique, de l'initiation de sa formation jusqu'à l'avènement de ses effets délétères.

La première étape clé de l'athérosclérose est le dysfonctionnement endothélial. Dans la phase précoce de l'athérosclérose, les médiateurs de l'inflammation (i.e. les cytokines, les chimiokines et les lymphocytes T) et l'accumulation de lipide provoquent une dysfonction endothéliale caractérisée par l'expression accrue des molécules d'adhésion (P- et E- sélectine, ICAM-1 et VCAM-1) et une diminution de la production d'oxyde nitrique (NO) entraînant le recrutement des plaquettes et des monocytes puis la migration

² La cause principale des maladies coronariennes, tels l'angine stable ou instable et les infarctus du myocarde est l'athérosclérose coronaire. D'autres pathologies des artères coronaires (emboli, spasmes, vasculites, Maladie de Kawasaki, anomalies congénitales), d'autres maladies cardiaques (cardiomyopathie hypertrophique, hypertension sévère, maladies aortiques valvulaires sévères) et l'anémie sévère peuvent parfois, mais rarement, être à l'origine des crises d'angine et des infarctus aigus du myocarde.

subséquente de ces derniers vers l'intima pour se différencier en macrophages [14]. Les grandes fonctions endothéliales, et en particulier la capacité de contrôler la vasodilatation artérielle, vont être d'abord atteintes. Un autre événement susceptible d'être responsable du dysfonctionnement endothélial est la perte du flux laminaire responsable d'une diminution locale des forces de cisaillement. La présence de zones caractérisées par de basses forces de cisaillement ou parfois d'un flux turbulent aura pour effet d'induire la variation d'expression d'une série de gènes «shear-dépendant». L'athérosclérose survient préférentiellement au niveau des bifurcations et des courbures artérielles où les turbulences et les forces de cisaillement négatives peuvent induire une activation endothéliale [56]. L'induction de l'expression d'un certain nombre de gènes, protéines d'adhésion, cytokines, kinases dépendantes du cycle cellulaire, ou l'inhibition de l'expression de gènes protecteurs, vont induire une stimulation de la prolifération des cellules endothéliales. Cette conséquence sera à l'origine d'une augmentation de perméabilité vasculaire aux protéines mais aussi aux lipoprotéines, une expression des protéines d'adhérence endothéliale et de facteurs de croissance. Ainsi, les facteurs hémodynamiques (pression, forces de cisaillement, turbulences, stagnation) modifient le transfert des lipoprotéines athérogènes à travers l'endothélium, ainsi que leur durée de résidence dans le sous-endothélium [57].

L'accumulation de lipides dans les macrophages entraîne la différenciation de ces derniers en cellules spumeuses. Ces événements contribuent à l'expansion de la plaque et au développement éventuel d'un noyau lipidique [58].

Le rôle des LDL dans l'athérogénèse est fortement lié aux transformations biochimiques qu'elles subissent au sein de l'intima, notamment leur liaison aux composants du sous-endothélium et leur oxydation. Les lipoprotéines acétylés de faible densité (A-LDL) sont une forme chimiquement modifiée de lipoprotéines de faible densité qui promeuvent l'accumulation de cholestérol dans les macrophages en culture. En 1997, Goldstein a été le premier à effectuer des travaux sur la capture des A-LDL par les macrophages. Il a décrit que, en plus d'être plus rapidement capturés par les macrophages que les LDL natifs, ces A-LDL pouvaient transformer les macrophages en cellules

spumeuses [59]. Ces A-LDL ne possèderaient pas de mécanisme de rétrocontrôle et internaliseraient des LDL jusqu'à engorgement de la cellule par les esters de cholestérol.

Simultanément, les cellules musculaires lisses (CML) prolifèrent et migrent de la média vers l'intima. Ces CML sécrètent du collagène, des fibres élastiques et des protéoglycannes dans la matrice extracellulaire, parallèlement à l'accumulation et la prolifération cellulaire. Ces événements contribuent à l'expansion de la plaque et au développement éventuel d'un noyau lipidique. Par conséquent, la lumière du vaisseau demeure quasi intacte et c'est pourquoi la plaque d'athérosclérose connaît une évolution souvent longtemps asymptomatique [60].

La progression de l'inflammation est responsable de la formation du noyau lipidique [61]. Le noyau lipidique est en fait la résultante de la maturation de la plaque et est formé de lipides, de cellules spumeuses, de CML et d'une matrice extracellulaire riche en collagène qui conditionne la résistance de la plaque. La vulnérabilité et l'instabilité de la plaque dépendent principalement de l'inflammation active qui gère le contenu cellulaire et la qualité de la matrice extracellulaire de la chape fibreuse. Or, la progression de l'inflammation finira tôt au tard par entraîner l'apoptose des macrophages, des lymphocytes T et des cellules endothéliales situées en aval de la sténose et exposées à des faibles taux de cisaillement, et la dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases matricielles (MMP) [62]. La réaction inflammatoire détermine, en grande partie, le taux de cellules apoptotiques. En plus de favoriser l'activation des macrophages, les interférons-gamma (INF- γ) produits par les lymphocytes Th1 contribuent aussi à la déstabilisation de la plaque en inhibant la prolifération des cellules musculaires lisses et en diminuant leur synthèse [63]. Cette transition engendrera l'accumulation de matériel nécrotique à l'intérieur même de la plaque d'athérome et causera l'amincissement de la chape fibreuse protectrice. L'inflammation stimulera aussi l'expression de facteurs tissulaires (FT) à la surface des cellules de la plaque par plusieurs types cellulaires dont les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales, mais aussi par les microparticules issues de l'activation ou de l'apoptose de ces cellules [64]. L'atteinte à la chape fibreuse augmente

évidemment les risques de rupture de la plaque. C'est justement à cette étape que la plaque passera d'un état stable à un état instable.

1.1.2 La rupture de la plaque

Bien que l'élargissement de la plaque puisse éventuellement altérer le passage du sang et engendrer une ischémie myocardique progressive, la formation de la plaque en elle-même est un processus souvent asymptomatique. C'est la rupture ou l'érosion de la chape fibreuse de la plaque qui conduit à la survenue d'événements thrombotiques [65]. Suite à la rupture de la plaque, la mise à nu des constituants du noyau lipidique de la plaque et particulièrement la libération du FT est à l'origine du processus qui aboutira à la formation d'un thrombus.

La rupture de la plaque dépend de la vulnérabilité de la plaque. Un synonyme à «vulnérabilité» serait «instabilité» puisque que la plaque est susceptible de rompre subitement. L'évolution vers la vulnérabilité de la plaque athérosclérotique ne dépend pas nécessairement du volume de la plaque mais plutôt de trois facteurs principaux : la taille du noyau lipidique de la plaque, le degré d'inflammation locale et les modifications de la matrice extracellulaire [57].

Une plaque stable est peu inflammatoire, et son contenu en cholestérol est moindre que celui de la plaque instable. Cette plaque stable est munie d'une enveloppe fibreuse épaisse, formée de cellules musculaires et de collagène. Cette structure stabilisante protégera généralement bien la plaque contre une rupture soudaine [66, 67].

Une plaque instable est caractérisée par une importante inflammation locale qui influence la progression et les complications de la plaque par des effets sur la matrice extracellulaire et par la mort programmée des cellules qui la composent. Cette plaque instable possède un amas lipidique important en son centre (>50% du volume total de la plaque) et une concentration importante de macrophages, de cellules musculaires lisses et de collagène. Ces caractéristiques engendrent une diminution de la résistance physique de la plaque; cette dernière se fissurera donc plus facilement lorsqu'elle sera exposée à des forces hémodynamiques (i.e. hypertension, tachycardie) [68, 69] ou à une augmentation des

forces de cisaillement causées par une vasoconstriction découlant de la dysfonction endothéliale (diminution de la production d'oxyde nitrique et augmentation de la production d'endothéline-1) [70].

1.1.3 La formation du thrombus

La rupture de la plaque engendre la mise à nu de matériel hautement prothrombotique, maintenant accessible aux plaquettes sanguines du sang circulant [66, 67]. Le contact entre le sang circulant avec le FT libéré lors de la lésion vasculaire de la plaque mature engendre le déclenchement de la cascade de la coagulation par la voie extrinsèque.

L'interaction entre le FT et le facteur VIIa de la coagulation présent en circulation, conduit à la formation du facteur Xa qui converti la prothrombine en thrombine. En plus de catalyser la formation de fibrine à partir du fibrinogène (thrombus rouge), la thrombine est un puissant agoniste qui amplifie l'activation des plaquettes (thrombus blanc). Finalement, de cette exposition de matériel thrombogène au sang résultera la formation d'un thrombus riche en plaquettes qui obstruera partiellement ou complètement l'artère. Le thrombus occlusif est associé le plus souvent aux STEMI alors qu'un thrombus moins occlusif est associé à des microembolisations distales donc davantage associé aux NSTEMI, impliquant ainsi de petites zones d'infarctus. Dans la section qui suit, nous verrons plus en détails ces différentes pathologies qui découlent majoritairement de la progression de l'athérosclérose et de l'érosion ou rupture de la plaque [71].

1.2 Manifestations cliniques de la progression et de la rupture de la plaque

1.2.1 L'angine stable

L'angine stable se définit par des douleurs thoraciques dont la cause est une ischémie myocardique causée par une sténose coronarienne. Elle survient généralement à l'effort lorsque les besoins en oxygène du myocarde augmentent mais que le flux sanguin coronarien ne peut augmenter à cause d'une sténose coronarienne. Il s'agit en fait d'un

déséquilibre entre l'apport de sang au tissu et ses besoins en oxygène. Les sténoses produisant une telle restriction sont celles réduisant le diamètre de l'artère de 50% [72]. L'angine stable n'est pas associée à une nécrose (troponines normales, $<0.03 \mu\text{g/L}$) [73] et on observe parfois un changement du segment ST-T à l'électrocardiogramme (ECG) 12 dérivations. Les angines stables ne sont pas à risque de conduire à un infarctus puisqu'il s'agit d'une lésion fixe non-thrombotique et non-rapidement progressive.

1.2.2 Les syndromes coronariens aigus

Les SCA se définissent par une diminution primaire des apports en oxygène par un caillot occlusif qui se forme rapidement ou qui s'embolise distalement [11]. Ils incluent l'angine instable et les infarctus du myocarde, avec (STEMI) et sans (NSTEMI) élévation du segment ST [74]. La figure 4 illustre bien la distinction entre les trois types de pathologies. L'angine instable s'apparente beaucoup au NSTEMI. Les deux sont caractérisés par une obstruction partielle de l'artère par la présence d'un caillot sur la plaque rompue et une embolisation distale. On les distingue généralement par des changements persistants à l'ECG et l'augmentation d'enzymes ou marqueurs cardiaques, comme les troponines-T et -I. Contrairement à l'angine instable, les NSTEMI sont associés à une élévation de troponine T et des enzymes myocardiques et à un sous-décalage du segment ST à l'ECG. De plus, on associe habituellement des douleurs thoraciques répétitives de moins de 20 minutes à l'angine instable alors que ces douleurs répétitives sont de 20 à 30 minutes dans les NSTEMI. Par conséquent, on ne détecte pas de nécrose myocardique dans les angines instables [75].

Les STEMI sont très différents de l'angine stable et des NSTEMI. Ils sont associés avec une douleur prolongée et une occlusion thrombotique complète, qui se caractérise par un sus-décalage du segment ST à l'ECG et une augmentation accrue des troponines et des enzymes cardiaques. L'obstruction complète de l'artère se reflète d'abord par des dommages sous-endocardiques qui peuvent ensuite gagner progressivement toute l'épaisseur du myocarde (transmurale) pour devenir sous-épicaux (détection de l'onde Q).

Suite à la mise en place de ces diagnostics, les médecins devront agir vite dans le but de revasculariser le muscle cardiaque et de le préserver intacte, avec le moins de nécrose possible. Le degré des dommages causés se reflèteront par une insuffisance cardiaque de sévérité variable³ qui, comme un débit cardiaque très bas, pourra conduire à un choc en phase aiguë.

1.2.3 Interventions médicales

Généralement, trois types d'interventions sont utilisées pour traiter les SCA : les traitements pharmacologiques, les angioplasties coronariennes percutanées (interventions coronariennes percutanées avec (alors appelé PCI, *Percutaneous Coronary Intervention*) ou sans tuteurs (médicamentés ou non) et les pontages aorto-coronariens (PAC).

Les traitements utilisés pour traiter les angines instables ou les NSTEMI sont différents de ceux utilisés pour traiter les STEMI. Par opposition aux angines satbles et aux NSTEMI qui sont contrôlés majoritairement par des traitements pharmacologiques [76], les STEMI sont généralement immédiatement traités par angioplastie primaire. L'angioplastie primaire s'applique uniquement au traitement en première intention dans l'infarctus avec sus décalage de ST, dans un délai avoisinant les 12 heures suivant l'apparition de la douleur thoracique sans qu'ait été préalablement administré de fibrinolytique ou autre traitement visant à dissoudre le caillot [77]. Chez les patients qui ont des blocages multiples, par exemple, les PAC sont utilisés dans le but de débloquent les artères lésées. Par contre, il est important de noter qu'une revascularisation des artères par l'angioplastie ou les PAC n'est pas sans faille. De plus, la maladie reste active, pouvant ainsi créer de nouvelles lésions. Un contrôle strict des facteurs de risque et une thérapie médicale intensive s'imposent donc en plus de la revascularisation par PAC ou dilatation percutanée.

³ La sévérité de l'insuffisance cardiaque évalue habituellement la fonction ventriculaire qui se calcule par la fraction d'éjection. Une diminution de la fraction d'éjection (< 55%) témoigne d'une insuffisance cardiaque. Plus la fraction d'éjection est basse, plus l'insuffisance cardiaque est sévère.

1.2.4 Dommages de reperfusion

Par «dommages de reperfusion», on cible des situations dans lesquelles il y a eu des dommages tissulaires causés par un soudain apport de sang à un tissu spécifique qui avait cessé d'être irrigué par la circulation sanguine. On peut retrouver des dommages causés par une reperfusion dans les interventions cardiovasculaires, comme les pontages aorto-coronariens et les angioplasties. Ces dommages existent dans le cœur, mais aussi dans d'autres organes, comme les reins. Paradoxalement, c'est principalement lors de la reperfusion, et non lors de l'ischémie elle-même, que les dommages relatifs à l'inflammation sont causés [78]. Bien que la reperfusion du tissu ischémique soit nécessaire pour empêcher les cellules de mourir par manque d'oxygène, c'est en effet ce retour du flux sanguin qui accélère le processus délétère amorcé par l'ischémie en induisant davantage d'inflammation et de dommage tissulaire, entraînant aussi lui-même la mort cellulaire. Ainsi, le retour du sang au site préalablement privé d'une irrigation sanguine est à l'origine de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, de l'augmentation de l'activation et de la migration des neutrophiles et des macrophages au site de l'ischémie et de l'agrégation plaquettaire. Il s'en suivra une production de médiateurs inflammatoires tels les diverses cytokines, une formation massive de radicaux libres [78]. Cette inflammation excessive entraînera une privation d'oxygène à une portion du muscle cardiaque et donc conséquemment la mort du patient [7, 8].

C'est donc principalement à partir de ces différents états pathologiques que ma thèse de doctorat contribuera à élucider les mécanismes impliqués dans l'activation du complément dans les maladies coronariennes aiguës. La figure 5 illustre les différents groupes de sujets qui ont été étudiés dans ma thèse et qui serviront de base à la compréhension des mécanismes d'implication du complément dans les SCA.

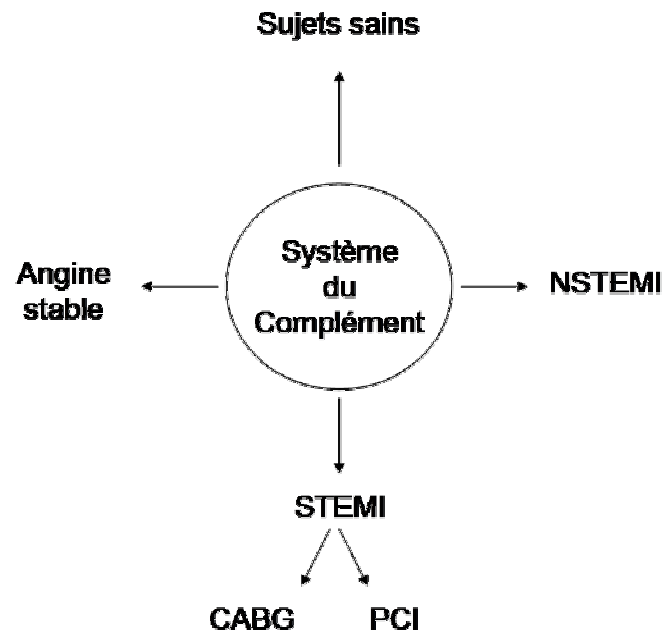


Figure 5. Schématisation des différents types de patients inclus dans les différents volets de ma thèse.

CHAPITRE 2

2 Le système du complément

À l'origine reconnu comme un «complément» à l'immunité humorale, le système du complément est un des systèmes les plus puissants impliqués dans la défense de l'organisme [2]. Le système du complément se compose d'une trentaine de protéines plasmatiques solubles et membranaires majoritairement synthétisées par les hépatocytes mais aussi par beaucoup d'autres types cellulaires dont les adipocytes, les fibroblastes de la peau, les monocytes du sang, les macrophages tissulaires, les neutrophiles et l'endothélium vasculaire. Généralement, ces protéines sont présentes dans le sang sous formes inactives et interagissent avec plusieurs cellules et médiateurs du système immunitaire [79]. Certaines substances, comme les lipopolysaccharides (LPS), viennent augmenter grandement les niveaux des ARNm des différentes composantes du complément produits par les hépatocytes. En masse, les proenzymes du complément constituent 15% des globulines sériques totales. Les protéines du complément interagissent entre elles 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 [80]. 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 composantes qui ne réagissent pas avec la protéine suivante de la séquence deviennent conséquemment rapidement inactives. 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 [81]. La figure 6 illustre le système du complément tel qu'il est connu aujourd'hui.

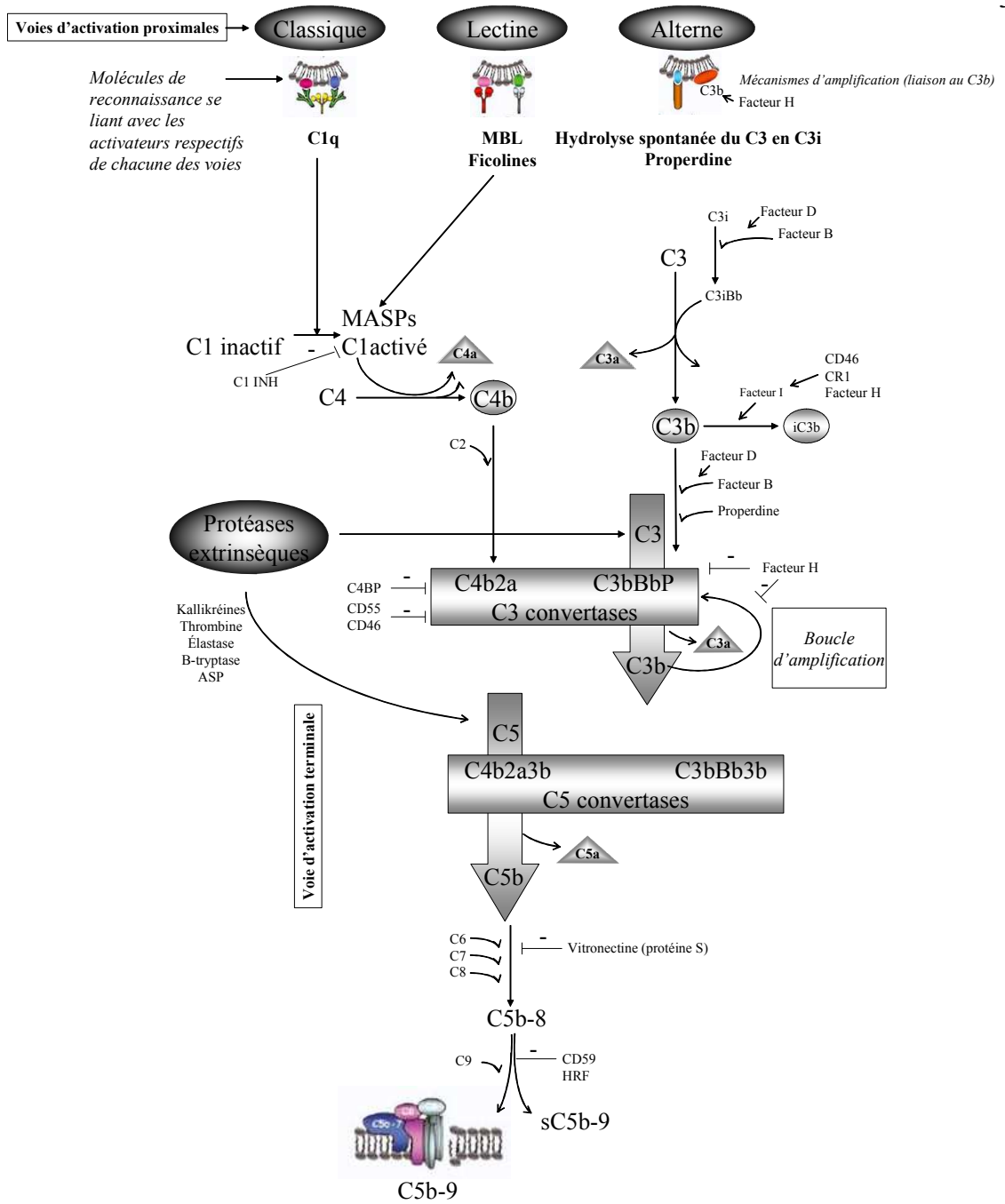


Figure 6. Cascade d'activation du complément.

2.1 Description générale

De manière générale, l'activation du système du complément est reconnue pour se faire par trois voies proximales distinctes : les voies classique, lectine et alterne.

Fait jusqu'à maintenant accepté, toutes ces voies convergent en un même point : le clivage de la protéine C3. Cette protéine est clivée en fragments C3a et C3b par l'action d'une C3 convertase. Le C3b issue de ce clivage participe ensuite à la formation d'une C5 convertase. La C5 convertase clive elle aussi une protéine en deux fragments, soit le C5 en C5a et C5b. Le C5b initie la formation du complexe terminal du complément (CTC ou C5b-9) formé des protéines C5b, C6, C7, C8 et C9. Ce complexe C5b-9 deviendra un des principaux médiateurs responsable de la lyse des cellules si une régulation étroite et finement contrôlée n'a pas lieu.

En plus des trois voies d'activation proximales traditionnellement décrites, de plus en plus d'évidences démontrent que l'activation du complément peut être initiée par l'entremise de composantes qui ne sont pas des composantes de la cascade du complément. Ces composantes peuvent cliver directement les protéines C3 et/ou C5 pour conduire à la formation du complexe terminal. Ces composantes participent donc à ce que nous appellerons la voie des protéases extrinsèques.

Indubitablement, l'impact d'une activation du complément surpasse de loin le simple fait d'engendrer une lyse cellulaire ou bactérienne. Les effets biologiques du complément se produisent tant par l'intermédiaire de ses divers récepteurs que par les signaux induits par le complexe terminal du complément (CTC) [2]. Parmi les activités engendrées par l'activation du complément, on note principalement, certes, la lyse des cellules étrangères, mais aussi l'opsonisation et la phagocytose d'antigènes particuliers, l'élimination des complexes immuns circulants et des produits de réactions inflammatoires (i.e. cellules apoptotiques et nécrotiques) par la rate ou le foie et, finalement, l'activation des réponses immunitaires déclenchées par la sécrétion de molécules immunorégulatrices. Cette sécrétion est déclenchée par la liaison entre les protéines du complément et leurs récepteurs spécifiques localisés à la surface des cellules immunitaires.

Le complément agit à titre d'élément central à diverses étapes du processus inflammatoire, dépendamment de l'état physiopathologique de l'organisme hôte. L'interaction entre les cellules du système immunitaire et les protéines du système du complément fait de ce dernier le coordinateur des événements qui sont à l'origine de l'immunité innée et ceux qui sont engendrés ultérieurement lors des processus d'immunité acquise. L'implication du complément dans la régulation et la synchronisation du processus inflammatoire demeure bénéfique pour l'hôte puisqu'elle vise à éliminer les organismes pathogènes et les cellules de l'hôte qui sont endommagées.

Paradoxalement, les multiples associations entre le complément et les autres médiateurs qui contribuent au bon maintien de l'organisme peuvent rapidement devenir responsables de l'avènement de diverses pathologies si une mauvaise régulation a lieu. Une déficience en un ou plusieurs des facteurs du complément ou, à l'inverse, une activation excessive du complément, peut contribuer au développement de diverses maladies auto-immunes ou inflammatoires, tel la glomérulonéphrite, le syndrome hémolytique urémique, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la septicémie, la pancréatite aiguë et diverses maladies cardiovasculaires.

2.2 Les terminologies

Dans le but de bien cerner les mécanismes responsables des effets délétères de l'activation du complément dans les maladies coronariennes, il s'avère important de connaître les éléments et événements responsables de la mise en branle de la cascade. Mais avant toute chose, voyons un peu la terminologie des différentes composantes de ce système complexe.

Les composantes du complément sont désignés en 3 groupes : les numéros (C1 à C9, signifiant protéine 1 à 9 du Complément), les symboles littéraux (par exemple, le facteur B), les noms courants (par exemple, facteur de restriction homologue). Certaines protéines portent même plusieurs terminologies (par exemple, Facteur P = properdine). Les protéines qui découlent d'une activation de la cascade et qui sont donc des fragments peptidiques sont dénommées par des lettres minuscules (par exemple, le fragment C3 se

clive en fragment C3a et C3b). En règle générale, le plus gros des deux fragments en termes de taille est désigné «b» alors que le plus petit est désigné «a». Bien sûr, à toute règle il y a une exception : parmi les deux fragments peptidiques engendrés par le clivage de la protéine C2, le fragment C2a est le plus important des deux en terme de taille. Mis à part leurs tailles, les deux fragments résultant du clivage des protéines diffèrent par leurs fonctions. Par exemple, les fragments les plus petits se propagent loin du site d'activation du complément, peuvent se lier à des récepteurs spécifiques et ainsi contribuer à l'initiation des réponses inflammatoires localisées. Les plus gros fragments, quant à eux, se lient à leur cible près du site d'activation et participent à la progression de la cascade en interagissant avec le fragment suivant dans le but de former des complexes fonctionnels. Ces complexes fonctionnels que l'on appelle «convertases» possèdent une activité enzymatique.

2.3 Groupes de protéines constitutives de la cascade du complément

Dans le but de comprendre ce qui entraîne les effets délétères d'une activation excessive du complément lors d'événements coronariens, il s'avère important de connaître les groupes de protéines clés impliquées dans la formation de la cascade [79]. Les protéines du complément seront ici divisées en 5 groupes : les convertases, les anaphylatoxines, les opsonines, le complexe terminal du complément et les protéines régulatrices. Bien sûr, seront intégrés à ces différents groupes les divers récepteurs qui rendent possible une grande proportion de leurs effets biologiques.

2.3.1 Convertases

Nous avons décrit l'activation du complément comme étant une cascade d'activation de protéines, où une proenzyme devient active et catalyse la prochaine étape de la cascade. Une des étapes clés de la cascade d'activation du complément est la formation des convertases, ces groupements de protéines aux propriétés enzymatiques. Les convertases sont des sérines protéases qui ont pour rôle de convertir une protéine fonctionnellement inactive en une protéine active. Elles ont pour fonction spécifique de cliver les protéines C3 et C5 du complément. Leur action est nécessaire pour la production

de fragments et groupes de protéines actifs qui sont responsables de la majorité des activités biologiques engendrées par le complément. Les convertases sont des complexes bimoléculaires ou trimoléculaires qui s'assemblent suivant des étapes séquentielles impliquant des interactions protéines-protéines et des clivages protéolytiques par des sérines protéases très spécifiques. Bien qu'une seule des protéines du complexe soit le centre catalytique de la convertase, l'effet catalytique est engendré seulement si le complexe est entier. Cette caractéristique permet aux convertases de pouvoir subir une étroite régulation puisque la dissociation du complexe inhibe instantanément les fonctions des convertases.

Tel qu'illustré dans la figure 6, il existe deux types de convertases avec des propriétés distinctes, mais un fonctionnement similaire : la C3 convertase et la C5 convertase. Ces convertases peuvent être formées soit à partir de la voie classique/lectine, soit à partir de la voie alterne. On distingue donc deux types de C3 convertases et deux types de C5 convertase : les C3 et C5 convertases classiques/lectines et les C3 et C5 convertases alternes.

La C3 convertase formée à partir de l'activation de la voie classique ou de la voie lectine est composée d'un complexe contenant les plus gros produits d'activation des molécules C4 et C2, respectivement, formant ainsi un complexe C4b-C2a, communément appelé C4b2a. Le deuxième complexe est formé à partir de l'activation de la cascade de la voie alterne du complément, étant donc composé d'une molécule C3b et de l'un des produits de clivage du facteur B, lui-même préalablement activé par le facteur D. Le complexe ainsi formé est le C3bBb. Il est aussi important de noter que, tel que nous le verrons plus loin, l'initiation de la voie alterne se fait à partir de l'hydrolyse spontanée d'une protéine C3 ($\text{eau} + \text{C3} = \text{C3}(\text{H}_2\text{O})$ ou iC3). La protéine active issue de cette hydrolyse, appelée iC3b (ou $\text{C3b}(\text{H}_2\text{O})$), peut elle aussi interagir avec le facteur B. Cette convertase portera le nom de iC3bBb , et aura les mêmes fonctions que la convertase C3bBb, soit de cliver davantage de protéines C3 en C3b pour perpétuer la cascade d'activation du

complément. Comme nous le verrons dans la section à cette fin, il existe des protéines dont le rôle est de stabiliser ou, à l'inverse, de dissocier les C3 convertases de chacune des voies.

Finalement, une fois formées, les C3 convertases des deux voies ont les mêmes fonctions : catalyser le clivage protéolytique de la molécule C3 en C3a et C3b. Le C3b ainsi engendré peut agir en tant qu'opsonine (voir section «opsonines») ou se lier à un complexe bimoléculaire pour former une C5 convertase.

Les C5 convertases sont aussi au nombre de deux, l'une formée suite à la formation de la C3 convertase issue de l'initiation de la voie classique ou lectine, l'autre formée suite à la formation de la C3 convertase issue de l'initiation de la voie alterne [82, 83]. Dans un des cas, le C3b formé précédemment interagit avec le complexe C4b2a et dans l'autre, avec le complexe C3bBb. Les convertases C4b2a3b et C3bBb3b ont toutes deux pour fonction d'assurer le clivage protéolytique de la molécule C5 en C5a et C5b. Alors que le C5a est une anaphylatoxine majeure qui induit l'inflammation, le C5b est la première molécule qui forme le complexe terminal du complément. Le C5b est par conséquent le point culminant de l'activation de la voie terminale. De plus, bien que la voie lectine et classique possèdent une C5 convertase analogue, il est intéressant de noter qu'une étude récente a démontré des différences quant à l'efficacité des convertases découlant de l'activation de ces deux voies [84]. Rawal et ses collègues ont démontré que moins de C4b produits à partir de l'activation de la voie lectine étaient nécessaires pour engendrer les C5 convertases par rapport à la voie classique.

Tel qu'il sera mentionné un peu plus loin, le C3 et le C5 peuvent être clivés directement par des protéases extrinsèques, ce qui a permis aux investigateurs d'établir une nouvelle forme d'activation du complément, soit la voie des protéases extrinsèques (figure 6).

2.3.2 Anaphylatoxines

Parmi les éléments intermédiaires de grande importance siégeant dans la cascade du complément, on retrouve les fragments C3a, C4a et C5a, que l'on nomme anaphylatoxines. Ces produits de coupure du complément agissent à titre d'importants médiateurs de

l'inflammation. Le C4a possède un potentiel pro-inflammatoire moins important que ces deux autres homologues. Les produits d'activation C3a et C5a sont reconnus depuis plus d'une vingtaine d'années pour être impliqués dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la vasoconstriction, la chimiotaxie et l'activation des cellules inflammatoires [85]. Ces anaphylatoxines agissent principalement en liant et en activant des récepteurs spécifiques dont l'expression augmente lors d'un état inflammatoire et qui font partie de la famille des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés à la protéine G. Ces récepteurs portent le nom de C3aR et C5aR (CD88).

L'activité des anaphylatoxines est régulée par les carboxypeptidases. Les carboxypeptidases sont des enzymes circulant dans le plasma, ou présentes dans les tissus. Elles hydrolysent les polypeptides en enlevant un acide aminé à la fois, en commençant par l'extrémité du polypeptide qui possède un groupement carboxyle libre (COOH). La carboxypeptidase N, aussi appelée «carboxypeptidase arginine», est la carboxypeptidase spécifique à l'hydrolyse des peptides avec extrémités COOH des anaphylatoxines. Cette hydrolyse permet l'exposition du groupement terminal arginine [62] et par le fait même, la diminution de certaines activités biologiques de ces médiateurs inflammatoires de l'ordre de 100 à 1000 fois [86]. Dans le cadre de mes travaux, il s'avère utile de savoir que ce sont en fait ces dérivés des anaphylatoxines, (C3a-desArg, C4a-desArg, C5a-desArg) qui sont détectés dans les tests de dosage des anaphylatoxines puisqu'ils sont plus stables que les anaphylatoxines elles-mêmes.

Le produit d'activation Ba aurait des fonctions similaires aux anaphylatoxines décrites ci-dessus. Lorsqu'elle devient hydrolysée, la molécule de iC3b est apte à se lier à la sous-unité catalytique de la voie alterne, le facteur B. Des études effectuées à la fin des années 80 ont démontrées que le C3b pourrait se lier à la portion Ba du facteur B [87, 88]. 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) [89]. 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).

2.3.3 Opsonines

Les deux fragments les plus volumineux provenant du clivage du C3 et du C4 sont des opsonines, c'est-à-dire qu'elles favorisent la phagocytose des antigènes en se liant à ces derniers[2]. Ces protéines, C3b et C4b, permettent de capturer les antigènes, les complexes immuns et organismes pathogènes 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. Globalement, les opsonines agissent en recouvrant les complexes immuns et antigènes particuliers. Par la suite, les cellules phagocytaires et certaines autres cellules exprimant des récepteurs du complément se lient aux opsonines et favorisent l'élimination de ces agents pathogènes.

L'élimination de ces agents ou complexes immuns se fait par la liaison des opsonines avec le CR1, aussi appelé *Erythrocyte complement receptor 1*, CD35, récepteur du C3b/C4b et récepteur d'adhérence immune. Ce récepteur est présent sur plusieurs types cellulaires dont les leucocytes, les podocytes glomérulaires, les cellules dendritiques folliculaires du foie et, principalement les globules rouges du sang. Ces derniers sont les transporteurs par excellence de ces complexes ; avec leur petite masse et leur présence accrue en circulation, 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. 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 phagocytose [66]. Cependant, certains organismes pathogènes résistent à l'opsonisation des protéines C3b et C4b. Par exemple, la capsule bactérienne des bactéries gram-positives 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.

En plus du CR1, les récepteurs CR3 (aussi appelé CD11b/CD18, MAC-1, Mo-1, $\alpha_M\text{-}\beta_2$) et CR4 (aussi appelé CD11c/CD18, p150) favorisent aussi l'opsonisation et la phagocytose en liant des cellules recouvertes de fragments C3b inactifs et très stables (iC3b) [66, 67]. À la différence du récepteur précédemment décrit, le CR3 et le CR4 sont des intégrines de la famille des intégrines- β_2 située sur les leucocytes. Alors que le CR3 est abondant sur les monocytes, lymphocytes NK et neutrophiles circulants, le CR4 est le récepteur de fragment C3 le plus abondant sur les macrophages tissulaires.

Le C3b permet aussi la neutralisation virale [90]. 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 neutralisation [91].

Un rôle majeur joué par les opsonines, particulièrement le C3b, est la solubilisation et l'élimination des complexes immuns [77-79]. Ce rôle est d'autant plus important puisqu'il permet d'éliminer l'une des sources par lesquelles l'activation du complément est initiée. Chez les personnes souffrant de maladies auto-immunes, tel le lupus érythémateux disséminé (LED) ou l'arthrite rhumatoïde, de grandes quantités de complexes immuns sont produites. Les études démontrant l'importance des opsonines dans l'élimination des complexes immuns ne datent pas d'hier. D'illustres personnages du domaine de l'immunologie, tels les Drs Heidelberger [92], Nelson [93], Schifferli [69-76], Nilsson [77-79] et Walport [71, 72] ont identifié les mécanismes responsables de l'élimination des complexes immuns. La solubilisation et l'élimination efficace des complexes immuns peuvent parfois être lentement estompées ou même drastiquement inhibées par certains facteurs. Par exemple, la quantité de CR1 présente à la surface des érythrocytes décroît proportionnellement au vieillissement de ces derniers. Dans des conditions pathologiques impliquant les complexes immuns, comme c'est le cas dans le LED, le VIH et l'anémie

hémolytique, les quantités de CR1 diminuent, souvent par cause d'un déficit en complément.

2.3.4 Complexe terminal du complément

Le C5b issue du clivage protéolytique de la protéine C5 est la première composante du complexe terminal du complément [94]. Alors que le peptide C5a s'éloigne par diffusion ou se lie à ces récepteurs, le C5b se lie à la surface des cellules cibles et fournit un site de liaison pour les composantes ultérieures du complément. Si la protéine suivante, le C6, ne se lie pas en moins de deux minutes au C5b, ce dernier sera inactivé car il est extrêmement labile. Globalement, le fragment activé C5b se lie successivement au C6, puis au C7. À partir de cette étape, les complexes subissent une transition structurale hydrophile-amphiphile, exposant ainsi des surfaces hydrophobes aptes à lier les phospholipides membranaires. La protéine C8 se lie au complexe C5b67 fixé sur la membrane plasmique et induit un changement conformationnel du C8. Le fragment C8 expose à son tour une région hydrophobe qui interagit avec la membrane plasmique puisqu'il subit lui aussi une transition structurale hydrophile-amphiphile. Le complexe C5b678 est apte à créer un pore de 10 Å de diamètre, inapte à engendrer la lyse des cellules nucléées. Le complexe ainsi formé catalyse la polymérisation des composantes C9 qui elles aussi subissent une transition hydrophile-amphiphile au complexe lui permettant au complexe de s'insérer dans la membrane. Le phénomène de polymérisations consécutives des produits entrant dans la composition du complexe C5b-9 (C5b6789) 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 [95]. Plus le nombre de pores formés est grand, plus la lyse est efficace. De 10 à 18 molécules de C9 peuvent être fixées et polymérisées par un seul complexe C5b678. 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 événement est plus efficace si le système du complément mis en jeu vient d'une espèce autre que les cellules cibles à lyser [96]. Le CTC possède la capacité de provoquer la lyse bactérienne, mais aussi

la lyse cellulaire. Les cellules nucléées sont plus résistantes face à cette action que les érythrocytes. Alors qu'un seul CTC peut lyser un globule rouge du sang, de multiples CTC sont nécessaires pour percer la membrane des cellules nucléées.

2.3.5 Les mécanismes de 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 présents (tableau I) [97-104].

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 complément [105]. De plus, en se liant aux autres composants biologiquement actifs du complément, les récepteurs du complément jouent un rôle important dans la régulation.

2.3.5.1 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 suivant. 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 classiques et lectines. 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.

2.3.5.2 *Les protéines régulatrices membranaires*

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 CTC. Ce contrôle actif prévient une activation excessive du complément, protège les cellules contre ses effets souvent inappropriés du complément et participe à l'élimination de complexes immuns.

En absence de molécules stabilisatrices, la protéine C3b a une très courte demi-vie [106, 107]. Dans ces conditions, le C3b se liera au récepteur CR1 qui agira comme cofacteur dans l'inactivation des fragments C3b et C4b. Le CR1 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.

Tout comme le CR1, le cofacteur protéique membranaire (MCP ou CD46) et la DAF limitent également l'activation du complément en agissant au niveau des convertases [108]. 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. Le MCP et la DAF sont exprimées par 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 transmembrane.

Finalement, le CTC 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 CTC 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 [2]. 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 CTC et donc d'éviter une inflammation excessive dirigée par le complément. Ces propriétés confèrent à ces protéines la fonction commune de restriction homologue.

Ces protéines régulatrices membranaires, agissent pour la plupart en étroite collaboration avec des protéines régulatrices solubles.

2.3.5.3 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). Cet inhibiteur de protéases sériques provoque la dissociation du complexe C1 (C1r2s2) 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 coagulation.

Les C3 convertases C4b2a et C3bBb sont aussi soumises aux effets des protéines régulatrices solubles qui ont pour rôle de stabiliser ou, à l'inverse, de bloquer ou destabiliser leur formation, dépendamment de l'opsonine ciblée. Ainsi, la properdine aura pour fonction de stabiliser le complexe C3bBb et retarder sa dégradation (voir plus bas). A l'inverse, le facteur H viendra limiter la formation d'un tel complexe en se liant au C3b [109, 110]. 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 la concentration en acide sialique est élevée, plus l'activité du facteur H est élevée et moins le facteur B a d'affinité pour le C3b. Sans

facteurs H et I, l'activité du complexe C3bBb serait amplifiée, entraînant la formation accrue C3bBb3b puis de complexes C5b-9.

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. 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, *C4b-binding protein* ou C4BP, *C4-binding protein*) est une protéine homologue au facteur H tant par sa structure et ses fonctions, à la différence qu'elle agit par la voie classique ou lectine et non par la voie alterne. La C4bBP diminue la formation du complexe C4b2a, soit la C3 convertase de la voie classique/lectine, 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.

La properdine, quant à elle, est la seule protéine sérique connue ayant pour fonction d'amplifier l'activité de la convertase [111]. 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. Un article très récent (2008) se concentre à caractériser l'activité de la properdine dans l'activation du complément [112]. Le groupe utilise un modèle de souris déficientes en properdine pour constater l'utilité de la properdine lors de l'activation de la voie alterne par différents initiateurs ou amplificateurs connus. Les résultats prouvent que la properdine est essentielle lors d'une activation induite par certains activateurs, dont les lipopolysaccharides et les lipooligosaccharides bactériens. Par contre, une activation de la voie alterne par le

zymosan, le facteur de venin de cobra (*cobra venom factor*, CVF), deux activateurs connus de la voie alterne, ou une activation de la voie classique (qui engendre une production de C3b, apte à initier la formation de la C3 convertase alterne) n'était que très peu affectée par l'absence de properdine. Comme nous le verrons plus loin, la properdine peut initier elle-même la voie alterne, soit en interagissant directement avec une des protéines activatrices, soit par une liaison indirecte par le C3b [113]. Or, les résultats peuvent nous permettre d'avancer la conclusion que lorsque la properdine est impliquée dans l'initiation de l'activation de la voie alterne, elle devient essentielle à la mise en branle de la cascade. Inversement, lorsque la properdine n'a qu'un rôle de stabilisateur de convertase, l'activation peut quand même avoir lieu en absence de properdine. Dans ce sens, les auteurs apportent les conclusions suivantes : (1) l'utilité de la properdine est plus grande lorsque la voie alterne est activée de manière indépendante des autres voies d'activations (lectine et classique); (2) l'utilité de la properdine varie selon les mécanismes activateurs de la voie alterne et dépend de la nature de ces surfaces activatrices; (3) peu importe qu'ils soient endogènes ou exogènes, les activateurs de la voie alterne peuvent être totalement dépendants de la properdine pour être fonctionnels.

Tout comme les autres étapes de la cascade, la formation du complexe terminal du complément (CTC) est aussi régulée 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 cellulaire. Par cette action, le complexe moléculaire ne pourra pas attaquer les cellules voisines ni la cellule cible car son ancrage membranaire sera empêché.

2.3.5.4 Régulation de la lyse des CTC

Puisqu'une activation excessive du complément est néfaste pour notre organisme, plusieurs mécanismes biologiques ont été mis en place dans le but de diminuer la lyse cellulaire provoquée par le CTC.

2.3.5.4.1 Vésiculation des membranes cellulaires

Dans un premier temps, les cellules peuvent se débarrasser des CTC par endocytose ou vésiculation (figure 76) [92, 93]. Ce processus se produit dans une grande variété de cellules, incluant les neutrophiles, les oligodendrocytes, les lignées de cellules tumorales (U937 et K562) et les plaquettes sanguines [114-118]. Préalablement aux processus de vésiculation, un remaniement de la membrane a probablement lieu puisque la composition des vésicules ainsi formées sont apparemment très riches cholestérol, diacylglycérol et en C5b-9.

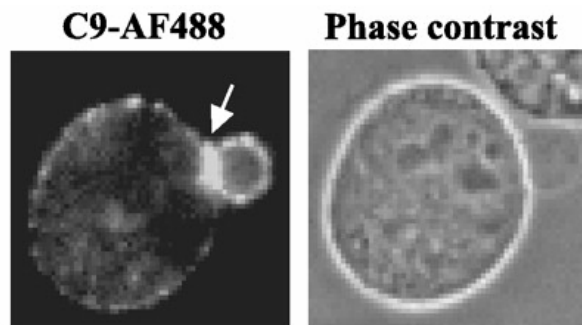


Figure 7. Élimination des complexes C5b-9 par vésiculation. Visualisation en microscopie confocale et en contraste de phase d'une vésiculation de la membrane cellulaire d'une cellule K562 par un marquage anti-néoépitope C9 couplé à un anticorps secondaire Alexa-488 (C9-AF488) [118].

2.3.5.4.2 Les CTC non-lytiques

La phase terminale du complément peut aussi aboutir à la formation de CTC qui inaptes à induire la lyse des cellules cibles. Ces complexes peuvent être présents sous deux formes : les sC5b-9 et les iCTC.

Le complexe sC5b-9 consiste en fait au CTC auquel est rattaché une protéine régulatrice du complément, la protéine S (aussi appelé vitronectine) [119]. Ce complexe est incapable de s'insérer dans la membrane des cellules pour y engendrer la lyse mais est à l'origine de plusieurs autres activités biologiques, dont l'augmentation de la réponse inflammatoire.

Lorsque l'on effectue un test d'activité hémolytique du complément et que 95% des cellules sont lysées, on dit que les concentrations de C5b-9 sont suffisantes pour engendrer la lyse des cellules (concentrations lytiques). Dans le cas contraire, on dit que le C5b-9 membranaire est présent en concentrations non-lytiques et qu'il peut, par conséquent, induire une grande variété de mécanismes biologiques conduisant à une augmentation de la réponse inflammatoire. On retrouve ce complexe non-lytique sous le nom de iCTC, où le «i» signifie «inactif» (ou *iTCC* en anglais), puisque le CTC est inactif dans l'avènement de la lyse cellulaire. Les concentrations «non-lytiques» de C5b-9 favorisent l'augmentation de la réponse inflammatoire en activant la cascade d'activation intracellulaire. Ainsi, l'insertion des iCTC dans la membrane cellulaire produit une mobilisation et un influx de calcium à l'intérieur de la cellule cible. Les phospholipases et les protéines kinases C (PKC) sont par conséquent activées, la production de diacylglycérol (DAG) et de céramide augmentée et la cascade des MAPK ERK (*mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase*) activée [120-122].

2.3.5.4.3 Désensibilisation

L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium par les pores formés par le complexe C5b-9 est un des premiers événements détectable suite à l'insertion de concentrations non-lytique de C5b-9 aux membranes des cellules. Les cellules ainsi exposées deviennent par conséquent désensibilisées et résistantes aux concentrations lytiques du complexe terminal [123]. Il a même été démontré que les cellules traitées par des concentrations non-lytiques de CTC présentaient des signaux anti-apoptotiques ou anti-nécrotiques [123, 124].

Plusieurs études ont démontré que ce phénomène de désensibilisation pouvait se faire par d'autres substances aptes à former des pores dans les membranes cellulaires par l'augmentation du calcium intracellulaire [125]. Il a été démontré que le traitement des cellules par des ionophores calciques (A23187) ou par du PMA (*phorbol myristate acetate*) produisait une protection rapide contre une attaque du C5b-9 [126].

Protéines régulatrices	Membranaire ou plasmatique?	Fonction
C1 INH	Plasmatique	Dissocie complexe C1 activé
C4BP (<i>C4 Binding Protein</i>)	Plasmatique	Dissocie la C3 convertase de la voie classique Co-facteur du facteur I
Properdine (Facteur P)	Plasmatique	Stabilise les convertases de la voie alterne
Facteur H	Plasmatique	Dissocie la C3 convertase de la voie alterne Co-facteur du facteur I
Facteur I	Plasmatique	Dégrade les opsonines C4b et C3b
Protéases sériques	Plasmatique	Inactivent les anphylatoxines
Vitronectine (protéine S)	Plasmatique	Empêche le complexe terminal de se lier aux membranes
CR1	Membranaire	Dissocie la C3 convertase Co-facteur du facteur I
DAF (<i>Decay Accelerating Factor</i> , CD55)	Membranaire	Dissocie les convertases Co-facteur du facteur I
MCP (<i>Membrane Cofactor Protein</i> , CD46)	Membranaire	Co-facteur du facteur I
HRF (<i>Homologous Restriction Factor</i> , C8BP)	Membranaire	Inhibe la formation du complexe terminal
CD59 (protectine)	Membranaire	Inhibe la formation du complexe terminal

Tableau I. Protéines régulatrices du complément.

CHAPITRE 3

3 Maladies coronariennes : initiation de l'activation du complément

Plusieurs études récentes démontrent une association entre les pathologies cardiovasculaires et l'activation du complément. En particulier, des recherches ont été conduites afin d'identifier les agents et structures aptes à activer le complément au niveau des lésions athérosclérotiques, en partant du constat qu'une intima intacte, sans maladie vasculaire apparente, montre peu ou pas de signe d'activation du complément [127].

Certains éléments impliqués dans la progression des maladies cardiovasculaires figurent parmi les initiateurs potentiels de l'activation du complément. Bien que la majorité de ces agents active le complément par l'une des voies proximales, certaines composantes impliquées dans la réponse inflammatoire ou la cascade de la coagulation peuvent déclencher une activation du complément sans toutefois nécessiter la présence des protéines proximales habituellement impliquées dans le processus. La présente section aura pour objectif de décrire les mécanismes par lesquels le complément peut être activé lors des maladies coronariennes.

La table II illustre les différents mécanismes d'activation, directs ou indirects, qui seront abordés en détail. La première rangée, sous les noms des voies, représente les protéines de reconnaissance de chaque voie.

Classique (C1q)	Alterne («iC3b»)	Lectine (MBL/Ficolines)	Extrinsèque (C3/C5)
<ul style="list-style-type: none"> - Immunoglobulines/ Complexes immuns - CRP - SAP - PTX3 - LDL - Cellules apoptotiques - Cellules nécrotiques - Adiponectine - Complexe héparine/protamine - Plaquettes - Microparticules plaquettaires - Chondroïtine-sulfate - Cellules endothéliales - Voie alterne 	<ul style="list-style-type: none"> - Auto-activation - Surfaces de contact exogènes (biomatériaux) - Cellules inflammatoires - Properdine (activation directe) - Immunoglobulines/ Complexes immuns - Voie lectine - Plaquettes - Microparticules plaquettaires 	<ul style="list-style-type: none"> - MASPs - <i>Lectin C2-bypass pathway</i> - Immunoglobulines - LDL - Neutrophiles - Cellules apoptotiques - Cellules nécrotiques - Voie alterne 	<ul style="list-style-type: none"> - Kallikréine - β-tryptase - ASP - Thrombine

Tableau II. Initiateurs des différentes voies du complément

3.1 La voie classique

La voie classique est la première voie à avoir été découverte [128, 129]. Son activité est généralement enclenchée par un mécanisme impliquant la liaison entre la première composante de cette voie, le C1q, et des complexes immuns (anticorps-antigènes) [130] mais peut aussi être initiée par d'autres agents. Le C1q est une protéine oligomérique qui, contrairement à la majorité des composantes du complément, est majoritairement synthétisée par les macrophages, et non par les hépatocytes du foie [9, 10]. Les cellules dendritiques dérivées des monocytes sont un autre type de cellules capables de produire des molécules de C1q [9]. Le C1q reconnaît une grande variété de ligands lui conférant une large gamme d'effets biologiques distincts. Les deux principales fonctions biologiques du C1q sont l'élimination des complexes immuns et des corps apoptotiques de l'organisme hôte [9, 10]. Une déficience en C1q engendra par conséquent la susceptibilité à développer des maladies auto-immunes, dont le LED [131]. Parmi les ligands du C1q, certains lui procurent la capacité d'initier l'activation du complément par la voie classique. Les immunoglobulines issus des complexes immuns, les pentraxines longs (PTX3) et courts (protéine C-réactive (CRP) et le sérum amyloïde P (SAP)), les cellules apoptotiques et nécrotiques, les lipoprotéines, l'adiponectine, les plaquettes sanguines, les complexes héparine-protamine, les cellules endothéliales et les protéines activées de la voie alterne seront les agents décrits dans cette section de la thèse. Mais d'abord, commençons par une brève description du fonctionnement du C1q comme agent initiateur de la cascade classique du complément.

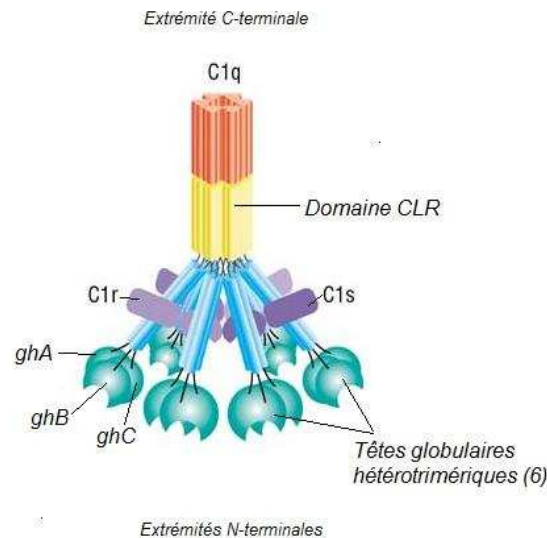


Figure 8. Structure du complexe C1 (750 kDa). Le C1q est une protéine de 460 kD composée des chaînes polypeptidiques A, B et C qui s'associent C-terminal pour former les six têtes globulaires (*globular head*, gh) hétérotrimériques (ghA, ghB et ghC). Ces têtes globulaires sont reliées entre elles par six tiges de type «collagène» en N-terminal qui s'assemblent pour former le domaine CLR. Adapté de *Immunity: the immune response in infectious and inflammatory disease*. DeFranco, Locksley, Robertson. New Science Press.

Dans le sang, le C1q est intégré à un complexe tri-moléculaire [132]: le complexe C1, aussi appelé C1q_r₂s₂ [133]. Ce complexe C1 se compose d'une molécule C1q, deux molécules C1r et deux molécules C1s, ce qui en fait un complexe composé de sous-unités équimolaires [134, 135]. Les molécules C1r et C1s sont des protéases qui se lient avec les molécules de C1q 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. Le C1q est primordiale dans l'initiation de la voie classique car elle interagit avec de nombreux ligands aptes à amorcer cette cascade d'activation du complément.

La capacité du C1q de lier autant de ligands est due à sa structure particulière (figure 8). Le C1q est une glycoprotéine de 460 kD très cationique dont la structure, en microscopie électronique, ressemble à un « bouquet de tulipes » : en C-terminal, six « têtes

» globulaires hétérotrimériques (domaine gC1q) sont reliées entre elles par six tiges de type « *collagen-like* » en N-terminal (région *CUB1-EGF*) qui s'assemblent en un tronc commun (domaine CLR) (figure 8). Ces tiges de type collagène sont le point d'encrage des unités catalytiques C1r et C1s. Si le gC1q est apte à se lier à tant de ligands, c'est certainement grâce à l'organisation modulaire de chacune des ces têtes globulaires. Chaque domaine gC1q est constitué de 18 chaînes polypeptidiques: six chaînes A de 223 résidus d'acides aminés (C1qA ou ghA), six chaînes B de 226 résidus d'acides aminés (C1qB ou ghB) et six chaînes C de 217 résidus d'acides aminés (C1qC ou ghC ou γ) [16-19]. Ces chaînes diffèrent par leur potentiel électrostatique de surface, c'est-à-dire par leur prédominance en charges positives ou négatives [20]. En plus des différences observées quant au potentiel électrostatique de surface, ces sous-unités de têtes globulaires diffèrent aussi quant à la position qu'elles occupent au sein de la tête globulaire. Par exemple, la sous-unité ghB a une position équatoriale, ce qui lui permet une meilleure accessibilité au ligand, surtout lorsqu'il est chargé négativement puisque que cette sous-unité tend à être chargée positivement en surface [21]. Ces donc le potentiel électrostatique de surface et le caractère unique de l'organisation modulaire des domaines globulaires A, B et C qui confèrent au C1q la capacité de se lier à une grande variété de ligands [136]. Cependant, ces interactions sont très sensibles aux variations de potentiel électrostatique et peuvent donc être abolies par une augmentation de la concentration en NaCl.

La liaison de C1q à un de ses ligands active la protéase C1r, laquelle permet l'activation de la C1s. Celle-ci clive le fragment C4 en C4a et C4b et la cascade d'activation par la voie classique se met en branle.

Les paragraphes qui suivent porteront sur quelques uns des activateurs spécifiques de la voie classique qui sont également des acteurs de l'athérombose. Ces ligands sont aptes à lier le C1q dans le but d'enclencher une activation du complément par la voie classique : les immunoglobulines issus des complexes immuns, les pentraxines longs (PTX3) et courts (protéine C-réactive (CRP) et le sérum amyloïde P (SAP)), les cellules apoptotiques et nécrotiques, les lipoprotéines, l'adiponectine, les complexes héparine-

protamine, les plaquettes sanguines, certains facteurs issus du système de la coagulation et de la fibrinolyse, les cellules endothéliales et les protéines activées de la voie alterne seront les activateurs de la voie classique qui attireront notre attention dans le cadre de ma thèse.

3.1.1 Immunoglobulines associées aux complexes immuns

Vers le milieu des années 1970, des études ont démontré que des produits d'activation de la voie classique étaient fréquemment retrouvés dans le sérum de patients en concordance avec des complexes immuns [28, 29]. Le premier mécanisme responsable de l'activation de la voie classique à avoir été découvert est la liaison, à la surface cellulaire, du complexe C1 à des immunoglobulines associées à un complexe immun [29, 30]. 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. Les IgG et les IgM sont les deux types d'immunoglobulines aptes à participer à l'activation du complément. Alors que les IgM sont les immunoglobulines les plus importantes en poids (900 kDa), les IgG sont les plus importantes en volume chez l'humain, avec une concentration sérique de 1000 mg/dl. 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 du complexe C1 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 [137]. L'efficacité des IgG à activer le complément apparaît dans l'ordre $IgG_3 > IgG_1 > IgG_2$. La molécule IgG_4 quant à elle ne fixe pas le complément. 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 C1q [138]. Alors que plusieurs recherches démontrent que le site de liaison de l'IgG sur la protéine C1q serait localisé sur la surface exposée du ghB [23, 24], aucune étude ne précise pour l'instant les modalités d'interactions entre les IgM et la protéine C1q. Les hypothèses disponibles pour l'instant suggèrent que les trois

types de chaînes du gC1q (ghA, ghB et ghC) seraient impliqués dans la liaison aux IgM [20, 21].

3.1.2 Les pentraxines

Des mécanismes indépendants des anticorps peuvent aussi initier la voie classique. En plus d'être activable par la liaison du C1q avec des complexes immuns, la voie classique du complément peut s'activer par la liaison avec des protéines de la famille des pentraxines. La famille des pentraxines est une famille de protéines très ancienne et conservée à travers les espèces. Les pentraxines, telles la CRP, la protéine amyloïde P sérique (SAP) et la PTX3 apparaissent dans l'évolution phylogénique bien avant les immunoglobulines [27, 28]. Elles sont caractérisées par une structure homopentamérique : dans laquelle les sous-unités sont associées de manière non-covalente. Il existe deux formes de pentraxines : les pentraxines courtes et les pentraxines longues. La CRP et la SAP sont des exemples de pentraxines courtes produites par le foie alors que la PTX3 est une pentraxine longue. Ces trois pentraxines sont aptes à lier la protéine C1q du complément dans le but d'en produire l'activation [139]. Certaines pentraxines peuvent également se lier avec le C4bBP (*C4b-binding protein*) et le facteur H qui régulent la cascade d'activation du complément. Les détails de ces interactions seront discutés dans une section ultérieure. Pour l'instant, voyons comment agissent chacune de ces pentraxines sur l'initiation de l'activation du complément par la voie classique.

3.1.2.1 La protéine C-réactive

Depuis quelques années, la recherche sur la biologie de l'inflammation dans l'athérosclérose se fraie un chemin important dans la pratique et les applications cliniques [41, 42]. Parmi les multiples médiateurs inflammatoires qui corrélerent avec le risque de développer un trouble coronarien, la protéine C-réactive a retenu l'attention de plusieurs groupes de recherche. En plus d'être facilement mesurable dans diverses conditions de

conservation du plasma sanguin par des tests de néphélobimétrie ou d'immunoturbidimétrie⁴ [140], la CRP plasmatique possède une longue demi-vie (environ 19 heures), demeure stable chez les individus et n'a que de négligeables variations circadiennes. La CRP est maintenant reconnue comme étant une protéine non-spécifique de la phase aiguë et est le marqueur inflammatoire systémique le plus largement étudié. L'élévation des niveaux de cette protéine reflète une condition inflammatoire chronique de niveau modérée et est aussi un élément prédictif d'événements cardiovasculaires, d'infarctus du myocarde (MI) et d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) [141]. Les niveaux de cette protéine peuvent être augmentés jusqu'à 1000 fois dans les 24 à 48 heures suivant l'événement déclencheur. Plusieurs études indiquent aussi que certaines composantes activées du complément colocalisent avec la CRP dans les lésions athérosclérotiques [142, 143].

Bien que cette protéine soit associée aux événements cardiovasculaires, son rôle n'est pas clairement défini : la CRP est-elle stimulatrice ou inhibitrice dans le processus inflammatoire ?

La CRP est une protéine de phase aiguë qui est régulée au niveau transcriptionnel par l'interleukine-6 et essentiellement produite par les hépatocytes du foie, bien qu'elle puisse être synthétisée par des sites extrahépatiques (cellules vasculaires musculaires lisses, monocytes et cellules endothéliales) [144]. Elle est composée de cinq sous-unités identiques mais non liées de manière covalente. On dit donc de la CRP native qu'elle est pentamérique. Jusqu'à présent, deux formes conformationnelles de la CRP sont connues : la forme native (CRP pentamérique) et la forme monomérique ou modifiée (mCRP). Une des principales fonctions physiologique connues de la CRP est d'initier la voie classique du complément [145] en se liant au C1q et ce, en absence d'anticorps [145, 146]. Dans la plupart des études, c'est un anticorps monoclonal reconnaissant préférentiellement la mCRP (clone CRP-8) qui est utilisée pour illustrer la colocalisation de la CRP avec les protéines du complément activé [32-34].

⁴ Dans les articles présentés dans cette thèse, nous référerons à la CRP mesurée par un test de haute sensibilité par néphélobimétrie (hsCRP).

De quelle manière la CRP peut-elle se lier à la protéine C1q ? La CRP possède une grande spécificité de liaison dépendante du calcium aux résidus de phosphocholine (PCh) des polysaccharides bactériens à la phosphocholine (PCh) mais aussi aux PCh présents dans les bicouches membranaires des cellules endommagées de l'hôte [147]. De plus, la CRP interagit avec une grande variété de ligands autologues ou extrinsèques, ce qui permet à d'autres agents de participer à l'activation de la voie classique du complément par l'entremise de la CRP. Parmi les ligands autologues connus, on dénote entre autre la présence des lipoprotéines plasmatiques modifiées ou natives [148], des membranes cellulaires endommagées et des cellules apoptotiques [147]. La liaison de la CRP à la PCh, à d'autres CRP ou à ses autres ligands lui procure un changement conformationnel lui permettant d'avoir un large site disponible pour la fixation du gC1q. Le complexe multivalent formé par le ligand et la CRP est donc 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 aux gC1q qui seront fonctionnels par molécule de CRP est déterminé par la taille relative des C1q [149].

En 2006, un groupe de chercheurs a découvert que la mCRP pouvait à la fois inhiber et activer la voie classique du complément selon qu'elle se trouve à l'état soluble ou immobilisée sur une surface [150]. Ainsi, lorsque la mCRP n'est pas rattachée à un ligand spécifique, elle se lie au C1q, certes, mais engendre l'inhibition de l'activation de la cascade du complément. Le mécanisme spécifique par lequel la mCRP non-liée engendre une inhibition de l'activation de la cascade demeure incertain. La seule hypothèse émise stipule que la mCRP non-liée pourrait n'interagir qu'avec une seule sous-unité du gC1q, ce qui serait insuffisant pour initier l'activation du complexe C1. Par contre, la liaison par la mCRP et viendrait restreindre la capacité des autres activateurs de la voie classique du complément à lier le gC1q. La mCRP soluble aurait alors une fonction anti-inflammatoire diminuant la production de molécules pro-inflammatoires, telles les anaphylatoxines et les complexes terminaux, résultant de la progression de la cascade du complément.

D'un autre côté, lorsque la mCRP est immobilisée à une surface quelconque, elle favorise l'activation de la voie classique du complément, sans toutefois mettre en branle l'activation de la voie terminale. La mCRP favorise en effet la dissociation de la C3 convertase alterne en se liant au facteur H (elle jouerait donc également un rôle dans la voie alterne), ainsi que la production de protéines régulatrices inhibitrices de la phase terminale de la cascade d'activation, dont la protéine CD59, le DAF (*Decay-accelerating factor*) et le MCP (*Membrane co-factor protein*), à la surface des cellules cibles [145, 151, 152]. Ces fonctions bien spécifiques à la CRP permettent une opsonisation et une phagocytose adéquate tout en minimisant l'inflammation et les dommages tissulaires engendrés par le complexe terminal et les anaphylatoxines.

3.1.2.2 La protéine amyloïde P sérique (SAP)

La protéine amyloïde P sérique est constitutivement présente en faibles concentrations dans le plasma humain (40 µg/ml). Membre de la famille de pentraxines, la SAP est, tout comme la CRP, une pentraxine courte produite majoritairement par le foie en réponse à l'élévation des niveaux circulants de l'interleukine-6. Par contre, contrairement à la CRP, la SAP n'est pas une protéine de phase aiguë chez l'homme, alors qu'elle l'est chez la souris [153]. Chez l'humain, cette protéine est un homopolymère de 10 sous-unités, lesquelles sont composées de 204 résidus d'acides aminés d'une masse moléculaire de 23 à 25 kDa. Les 10 sous-unités de la SAP s'associent de manière non-covalente pour former une structure pentamérique semblable à celle de la CRP [154]. Puisque, comme la CRP, les multimères de la SAP ne sont pas liés de manière covalente, des conditions dénaturantes causent la désagrégation de la protéine et la formation de monomères. La SAP possède globalement les mêmes ligands que la CRP, incluant la PCh, tel que décrit dans la sous-section précédente.

En 1975, le groupe de Assimeh démontrait pour la première fois une association entre la SAP et le C1q [155]. La liaison entre la SAP et le C1q nécessiterait la présence de multimères, comme c'est le cas pour la CRP. En liant le C1q par ses têtes globulaires, la SAP peut elle aussi initier l'activation de la voie classique du complément [156]. Il a aussi

été démontré que la SAP pouvait lier la C4bBP (*C4b-binding protein*) [157]. Ainsi, en étant liée à la SAP, la C4bBP ne peut plus produire ses effets régulateurs négatifs sur la formation du complexe terminal [158]. Par conséquent, ces études convergent pour démontrer la capacité de la SAP à engendrer une activation de la voie classique qui aboutira à la production du complexe terminal du complément. Contrairement à la régulation du complément par la CRP, aucune étude n'a démontré la capacité de la SAP à lier le facteur H et par conséquent à inhiber l'activation du complément par la voie alterne.

3.1.2.3 La pentraxine 3 (PTX3)

La PTX3 est une pentraxine longue qui s'apparente structurellement aux deux pentraxines courtes décrites dans les paragraphes précédents, mais sans toutefois être identique [159]. La portion C-terminale de la PTX3 correspond à la longueur totale des séquences représentant la CRP et la SAP, mais sa portion N-terminale n'a aucune homologie avec les autres protéines. Alors que la CRP et la SAP sont des protéines produites par les hépatocytes du foie en réponse à une stimulation par l'IL-6, la PTX3 peut aussi être produite par d'autres organes, tel le cœur et les poumons [66, 67] et exprimée par une plus grande variété cellulaire. Cette pentraxine longue peut être produite par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les monocytes, en réponse à la production de cytokines inflammatoire ou à une stimulation par les lipopolysaccharides bactériens [42, 43]. D'un point de vue fonctionnel, une différence importante existe entre les pentraxines longues et courtes. En effet, les résidus impliqués dans la formation de multimères au niveau de la CRP comme de la SAP, ne sont pas conservés dans la PTX3 [61]. Par conséquent, une telle différence met en évidence le fait que la PTX3 ne lie pas nécessairement tous les mêmes ligands liés par les autres pentraxines, ce qui lui fournira des propriétés physiologiques distinctes. Par contre, le lien existant la PTX3 et les maladies inflammatoires semble similaire entre les deux types de pentraxines (reference).

Depuis le début des années 2000, de plus en plus de travaux tendent à démontrer qu'il y aurait aussi une augmentation de l'expression de la PTX3 dans les maladies inflammatoires [40-42]. Par exemple, la production de PTX3 semble induite dans les

cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins par des LDL-modifiés, et des niveaux élevés de cette protéine sont aussi retrouvés aux sites des lésions athérosclérotiques humaines [160, 161]. Le groupe de Peri a également démontré que les niveaux de PTX3 augmentaient rapidement lors d'infarctus aigus du myocarde, atteignant leur apogée environ sept heures après le début des symptômes [162]. Cependant, très peu d'informations sont disponibles dans la littérature concernant les effets d'une telle augmentation.

Pour répondre à cette interrogation, des études démontrant le rôle d'une augmentation des niveaux de la PTX3 sur l'activation du complément ont été faites. Malgré les différences observées entre les pentraxines longues et courtes au niveau de leur structure et de leurs fonctions, la PTX3 peut, tout comme les deux autres pentraxines, se lier au C1q. Tout comme pour les autres pentraxines, la reconnaissance de la protéine par le C1q se fait par le domaine pentraxine de la PTX3 et requiert la présence de multimères [156]. Tout comme pour les deux autres pentraxines, les têtes globulaires du C1q sont les régions impliquées dans ce type d'interaction [75]. Il a été suggéré que des niveaux élevés de PTX3 auraient pour effet d'augmenter l'activation du complément par la voie classique. La PTX3 contribuerait donc à augmenter les dommages tissulaires engendrés par une activation excessive du complément lors de maladies inflammatoires. D'un point de vue fonctionnel, une étroite ressemblance relie la PTX3 à la CRP : la dualité de la protéine à activer et à inhiber l'activation du complément en fonction de son état soluble ou immobilisé [75]. De plus, dans un article récent, Deban et Meri décrivent pour la première fois qu'il existe une interaction entre la PTX3 et le facteur H. Or, tout comme la CRP, la PTX3 limiterait l'activation du complément par la voie alterne en stabilisant le complexe C3bBb. Ainsi, la PTX3 favoriserait la prévention d'une inflammation excessive engendrée par l'activation terminale du complément.

3.1.3 Les lipoprotéines de faible densité (LDL)

La littérature sur les interactions entre les lipoprotéines et l'activation du complément a beaucoup évolué au cours des dernières années. Aujourd'hui reconnue

comme étant une maladie inflammatoire [11], l'athérosclérose n'en demeure pas moins étroitement reliée à la présence d'un taux élevé de cholestérol sanguin. Il est maintenant bien accepté que l'accumulation de lipoprotéines de faibles densités (LDL) dans le sous-endothélium vasculaire est le point culminant du développement de l'athérosclérose. Par contre, plusieurs observations au cours de la dernière décennie ont conduit à l'hypothèse que le caractère athérogénique de cette lipoprotéine ne provenait pas du LDL natif lui-même, mais survenait plutôt lorsque ce dernier subissait des modifications, telle une altération enzymatique (E-LDL) ou une oxydation (oxLDL) [77-81]. Cette constatation a poussé les chercheurs à étudier les effets des LDL modifiés plutôt que des LDL natifs sur l'activation du système du complément [46-48].

En 2004, Bhakdi et son équipe ont découvert que les E-LDL pouvaient activer directement la voie classique selon deux mécanismes différents [45]. Lorsqu'ils sont présents à des faibles concentrations, les E-LDL peuvent se lier indirectement au C1q via la CRP, dans le but d'en provoquer l'activation. Il est intéressant de souligner que ce mécanisme d'activation de la voie classique semble limiter au niveau proximal, puisque le complexe terminal n'est pas activé. Lorsqu'ils sont présents à des concentrations plasmatiques élevées (i.e. 100–200 µg/mL), les différentes formes de LDL sont aptes à se lier directement au C1q. Cependant, la capacité des oxLDL à activer le complexe C1 seuls ou en présence de CRP est trop faible pour pouvoir la qualifier de pertinente d'un point de vue biologique [163].

3.1.4 Cellules apoptotiques et nécrotiques

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée essentiel pour le développement, le maintien de l'intégrité des tissus et le contrôle de l'inflammation [164]. Contrairement à la nécrose cellulaire, l'apoptose permet à l'organisme de se débarrasser rapidement des cellules mortes, prévenant ainsi la relâche du contenu potentiellement pro-inflammatoire de ces cellules [165]. Ce processus est si bien régulé dans un organisme sain que, bien que des milliards de cellules meurent par apoptose chaque jour, seulement quelques cellules apoptotiques sont détectables à un moment donné. Par contre, une

apoptose excessive ou une défaillance dans les mécanismes d'élimination des cellules apoptotiques peut engendrer une accumulation de ces cellules et être à l'origine de maladies autoimmunes [166] ou de maladies inflammatoires, tel l'athérosclérose et les événements aigus qui en découlent [167].

Les maladies cardiovasculaires dont fait partie l'athérosclérose comportent une dimension apoptotique et immuno-inflammatoire importante [11]. Depuis quelques années, l'hypothèse voulant que les cellules apoptotiques activent la voie classique du complément par une liaison directe avec le C1q grandit en popularité [168]. Les études de Collard et coll. [169] puis de Mold et coll. [145] ont montré que les cellules endothéliales endommagées par des agents oxydants activent directement le système du complément. Auparavant, une étude effectuée dans un contexte de LED, avait démontré que le C1q pouvait interagir directement et spécifiquement avec la surface des fragments apoptotiques issus de l'apoptose des kératinocytes humains. L'apoptose est caractérisée par la translocation de phospholipides, dont la phosphatidylsérine (PS), du feuillet interne de la membrane vers le feuillet externe. Une récente étude démontre que la PS serait l'un des ligands du C1q sur les cellules apoptotiques, et que cette interaction se ferait très tôt dans le processus d'apoptose [170]. Cette constatation met donc en évidence le fait que le C1q favoriserait l'élimination des cellules et débris apoptotiques très tôt après leur apparition.

Dans les paragraphes précédents, nous avons vu que des concentrations importantes de CRP sont présentes localement lors de dommages tissulaires et que la CRP active le complément. En liant la CRP de façon calcium-dépendante, les cellules apoptotiques peuvent lier le C1q et déclencher l'activation du complément par la voie classique. Gershov [152] décrit cependant que cette interaction limiterait l'activation terminale du complément et par conséquent protégerait les cellules apoptotiques contre l'effet du C5b-9. L'auteur démontre que la CRP empêcherait la production d'anaphylatoxines et l'activation des voies alternes et terminales notamment par sa liaison au facteur H qui promeut la dissociation du complexe C3bBb, et la production de protéines régulatrices à la surface cellulaire. Une liaison indirecte entre le C1q et les cellules apoptotiques tardives via la SAP [171], la

pentraxine 3 [150] ou un IgM [172] pourrait réguler la voie classique de manière semblable. 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. En 2004, il a été démontré que les cellules nécrotiques et les cellules apoptotiques tardives employaient des mécanismes similaires dans l'activation du complément [173]. Le complexe formé d'IgM et de produits de dommages myocardiques est reconnu par la molécule C1q et initie la cascade.

Étonnamment, bien que l'apoptose s'accompagne d'une diminution de l'expression de protéines régulatrices membranaires [174-176], cela ne se traduit pas par l'activation du complexe terminal C5b-9, le relargage du contenu intracellulaire et la lyse cellulaires. En 2007, le groupe de Trouw a déterminé que certaines protéines régulatrices solubles du complément interagissaient avec les cellules apoptotiques tardives et empêchaient ainsi ces dernières de subir une activation excessive du complément et, surtout, une lyse cellulaire par le complexe C5b-9. Ce sont les protéines C4bBP (C4b-binding protein) et le facteur H (qui se lie aux cellules apoptotiques tardives) qui compenseraient l'absence de protéines régulatrices membranaires [177].

3.1.5 Adiponectine

L'adiponectine est une adipokine de 247 acides aminés, sécrétée par les adipocytes et présente dans le plasma. Cette protéine facilite la captation de glucose par les tissus, diminue la production de glucose par le foie, augmente l'oxydation des acides gras et diminue la résistance à l'insuline et la libération de cytokines pro-inflammatoires, tel le TNF- α . Les concentrations plasmatiques d'adiponectine chez les patients avec maladie coronarienne, les obèses ou les diabétiques, sont beaucoup moins élevées que chez les donneurs sains.

Récemment, le groupe de Peake s'est intéressé à évaluer les effets de l'adiponectine sur l'activation du complément [178]. Ils ont démontré qu'en condition physiologique, lorsqu'elle est en présence d'une surface ou d'un ligand approprié, l'adiponectine change de conformation, se lie au C1q et engendre l'activation de la voie classique. L'adiponectine

se lie sur le domaine globulaire de la chaîne A du C1q en présence de Ca^{2+} et de Mg^{2+} . Cette liaison ne peut se faire que si l'adiponectine est enzymatiquement modifiée, étant alors dépourvue de ses sucres glocosylgalactosyl. . Puisque l'adiponectine peut également se lier au facteur H et que l'interaction adiponectine-modifiée/C1q engendrait l'activation du fragment C3 et C4, les auteurs supposent que la liaison directe de l'adiponectine modifiée au C1q permettrait de défendre l'organisme contre les agents pathogènes, sans toutefois engendrer la lyse cellulaire ou l'activation de la voie alterne du complément.

3.1.6 Complexe héparine-protamine

L'héparine et les héparines de bas poids moléculaires (HBPM) inhibent la thrombine et le facteur Xa par leur activité co-facteur de l'antithrombine. L'utilisation de l'héparine est nécessaire dans les pontages aorto-coronariens dans le but d'éviter une coagulation exagérée durant l'intervention. La protamine, un polypeptide polycationique (charges +) comportant environ 67% d'arginine, est employé lorsqu'il est nécessaire d'inhiber rapidement l'effet anticoagulant de l'héparine. Cependant, à des concentrations équimolaires, la protamine forme avec l'héparine, mucopolysaccharide polyanionique, un précipité apte à activer la voie classique du complément par un mécanisme semblable à celui déclenché par le complexe antigène-anticorps (complexes immuns) [179].

3.1.7 Plaquettes

Les plaquettes jouent un rôle important dans l'hémostase, la thrombose et l'athérosclérose [180]. Depuis plusieurs années, de multiples évidences s'assemblent pour démontrer une étroite collaboration entre les plaquettes et le système du complément. Ainsi, même en absence de pathogènes, le complément est activé à la surface cellulaire en réponse à une situation d'ischémie-reperfusion [181]. De plus, des protéines activées du complément ont été retrouvées dans les lésions athérosclérotiques et thrombotiques [182]. La présence de complexes C5b-9 à la surface des plaquettes a ainsi été associée à l'induction de l'activation plaquettaire, de leur sécrétion et de leur activité procoagulante [183]. En 2005, Del Conde et son équipe ont enfin découvert que les plaquettes sont

capable d'activer le complément par la voie alterne [184]. Cette découverte sera discutée plus en détails dans la section 3.2.

3.1.7.1 *gC1qR/p33*

Dans une série d'articles, Sims, un des pionniers dans le domaine, a décrit que la formation du CTC activait les plaquettes et favorisait la génération de microparticules plaquettaires [185]. En 1987, Peerschke et son équipe ont découvert que la C1q se liait de façon spécifiques et saturables au domaine cC1qR des plaquettes et que cette liaison induisait l'activation de GPIIb-IIIa, l'agrégation plaquettaire, l'expression de la P-sélectine et la génération de l'activité procoagulante des plaquettes [186]. En 2005, Del Conde et son équipe découvrent que les plaquettes sont capable d'activer le complément par la voie alterne [184]. En 2006, l'équipe de Peerschke revient à la charge en publiant pour la première fois que les plaquettes pouvaient activer le complément par la voie classique par l'entremise du récepteur gC1qR/p33 des plaquettes. Les constatations qu'ils avaient soulevées quelques années auparavant, comme l'expression de sites de liaison du C1q à la surface des plaquettes [166, 167] et la capacité du site spécifique gC1qR à interagir avec les têtes globulaires du C1q [187] leur avait procuré les évidences nécessaires pour investiguer sur un tel phénomène.

3.1.7.2 *Microparticules plaquettaires*

Depuis quelques années, beaucoup d'équipes tentent de caractériser les structures et fonctions des microparticules, ces petites vésicules formées à partir de l'activation de différents types cellulaires. Les microparticules plaquettaires (PMP, pour *platelets microparticles*) sont produites suite à l'activation des plaquettes et semblent être impliquées dans plusieurs pathophysiologies cardiovasculaires, dont la thrombose artérielle, les maladies vasculaires périphériques, les AVC, l'hypertention, le diabète et l'athérosclérose [188-190]. En plus d'être soupçonnées de constituer des réservoirs d'effecteurs pro-inflammatoires et de phospholipides pro-coagulants [191], les PMP agissent en contribuant elles-mêmes à l'activation plaquettaire et en augmentant la formation de thrombus [192-

194]. Ces vésicules possèderaient une activité pro-coagulante de l'ordre de 50 à 100 fois plus élevée que celle des plaquettes activées [188]. Les PMP expriment logiquement à leur surface plusieurs constituants des membranes plaquettaires. Ainsi, les glycoprotéines Ib, IIb/IIIa, et la P-selectin [176, 177], qui contribuent à l'inflammation vasculaire par leurs interactions avec les leucocytes et les cellules endothéliales vasculaires, ont été identifiées à la surface des PMP. L'équipe de Yin et Peerschke a récemment démontré la présence de C3b et du C5b-9 à la surface des PMP suite à l'activation des plaquettes par le ionophore calcique A23187 [195]. Ce groupe suggère que le dépôt de ces composantes se soit fait à partir de l'activation du complément par la voie classique puisque le phénomène semblait avoir lieu en présence du complexe C1 actif.

3.1.7.3 *Chondroïtine-sulfate*

Un autre mécanisme par lequel les plaquettes pourraient activer la voie classique du complément est par la liaison du chondroïtine-sulfate (CS) au C1q. Le CS est un glycosaminoglycan (GAG) relargué des plaquettes en réponse à plusieurs agonistes, dont l'ADP, le collagène et la thrombine, en moins de trois minutes suivant l'activation [196]. C'est en 2008 que Hamad, Nilsson et leurs collègues ont fait la découverte que le CS produit par les plaquettes activées au TRAP (*thrombin receptor-activated platelets*) pouvait induire une activation du complément par la voie classique et ce, jusqu'à l'activation de la voie terminale [197]. Nous allons voir dans les sections suivantes que les plaquettes peuvent activer le complément par d'autres voies d'activation.

3.1.8 *Système de la coagulation et de la fibrinolyse*

Depuis près de 30 ans, les constatations d'homologies entre le système de la coagulation et le système du complément abondent. Également activé sous forme de cascade enzymatique, le système de la coagulation est déclenché par une lésion des vaisseaux sanguins et l'activation du facteur de Hageman, aussi appelé facteur XII (FXII). Il y a plus de 25 ans, un article publié dans *The Journal of Experimental Medicine* faisait état de la capacité du FXII à activer le complément par la voie classique [198]. Il s'agirait

en fait d'une des formes clivées du facteur XII, le β -FXIIa, qui se lierait aux têtes globulaires du C1q issue du complexe C1 dans le but d'enclencher l'activation enzymatique des protéines C1r et C1s, un peu à la même manière que les complexes immuns.

L'élimination du caillot de fibrine formé lors de la cascade de la coagulation se fait grâce au système fibrinolytique. Le produit final de cette voie est la plasmine formée par conversion du plasminogène. En plus de dissocier les caillots de fibrine en produits de dégradation chimiotactiques pour les neutrophiles, la plasmine est capable d'activer la voie classique du complément en se liant, elle aussi, aux têtes globulaires du C1q [198].

3.1.9 Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales vasculaires jouent un rôle important dans la régulation de la thrombose et de l'hémostase [199]. Elles possèdent à leur membrane des récepteurs leur permettant d'interagir avec plusieurs systèmes, dont le système de la coagulation, le système des kinines et le système du complément [200]. Les cellules endothéliales vasculaires expriment à leur surface plusieurs sites de liaison au C1q, dont le cC1qR/calreticulin et le gC1qR/p33 (gC1qR) [184, 185]. Le groupe de Ghebrehiwet a constaté dernièrement la capacité du gC1qR purifié à activer directement la voie classique du complément [201]. C'est en fait par l'intermédiaire du gC1qR que les cellules endothéliales interagiraient avec tous ces systèmes, lui attribuant un rôle primordial dans les réactions inflammatoires locales et les complications thrombotiques découlant de l'athérosclérose.

Dans une étude récente, le même groupe a constaté que la présence de forces de cisaillement augmentait l'expression du gC1qR à la surface des cellules endothéliales, parallèlement à l'expression de cytokines inflammatoires [183]. Cette augmentation du ligand engendre une augmentation de l'activation de la protéine C4 du complément, suggérant donc une activation de la voie classique du complément. Les résultats démontrent aussi que cette activation peut se faire directement par le gC1qR, sans même la présence d'immunoglobulines. Cela n'exclut pas l'implication d'autres mécanismes d'activation de

la voie classique comme la liaison de la C1q, à la phosphatidylsérine exprimée à la surface des cellules endothéliales activées dans un contexte de pathologie athérosclérotique [202].

3.1.10 Les protéines activées de la voie alterne

En étant constamment activée par hydrolyse spontanée de la protéine C3, la voie alterne génère beaucoup de produits d'activation, dont le C3b. Or, la composante C3b fait parti de la C5 convertase produite par la voie classique et lectine [203]. Par conséquent, il est faux de stipuler que la voie alterne peut initier l'activation de la voie classique, mais il est tout à fait juste de dire que la voie alterne favorise l'activation de la voie terminale engendrée par une activation de la voie classique.

3.2 La voie alterne

La voie alterne est présente chez tous les vertébrés. C'est en fait parce que ses protéines caractéristiques, tel le C3 et le facteur B, se retrouvent aussi chez les invertébrés que l'on croit qu'elle est le mode d'activation du complément le plus ancien [204]. La voie alterne est la principale responsable du déclenchement de la réponse immunitaire en absence d'anticorps. Contrairement à l'activation des deux autres voies, la voie alterne ne requiert pas la présence des fragments C1, C4 et C2 pour engendrer le clivage du fragment C3 [205]. De plus, cette voie ne s'initie pas par la reconnaissance d'une molécule spécifique ou de l'interaction protéine-protéine ou protéine-hydrates de carbone mais repose sur un processus d'auto-activation du fragment C3, élément central du complément et protéine la plus abondante de ce système (3,1 mg/mL). Cette auto-activation, lente mais constante, se fait par hydrolyse spontanée dans environ 1% de protéines C3 totales par heure (voir section 2.3.1) [111]. Grâce à son activation constitutive, la cascade de la voie alterne permet à l'organisme de réagir instantanément aux agents pathogènes en cas de besoin. En fait, dans certaines situations, plus de 80% de l'activation du complément se ferait par la voie alterne.

Évidemment, une telle activation constante requiert d'être hautement régulée. Le C3b est habituellement très vite inactivé au contact des surfaces cellulaires, en se liant à des protéines inhibitrices solubles et membranaires et à l'acide sialique, qui sert entre autres de protection des protéines contre leur dégradation par les protéases. Cependant, ces mécanismes de régulation peuvent être contrecarrés par une concentration anormalement élevée des protéines de la voie alterne, par un mauvais fonctionnement des protéines régulatrices ou par certains activateurs spécifiques de la voie alterne [191-193]. La section qui suit portera sur les différents activateurs spécifiques de la voie alterne, aptes à déclencher la cascade d'activation du complément et susceptibles d'être impliquées dans l'avènement de troubles cardiovasculaires : les surfaces activatrices spécifiques (biomatériaux, cellules apoptotiques/nécrotiques), l'activation directe par la properdine, certaines immunoglobulines, les plaquettes et l'amplification par la voie lectine.

3.2.1 Boucle d'amplification

La voie alterne peut aussi être activée par un processus d'amplification, appelé «boucle de rétroaction positive» (*feedback loop*) ou «boucle d'amplification» (*amplification loop*). Les molécules de C3b formées lors de l'activation des autres voies proximales du complément peuvent elles aussi interagir avec le facteur B par une liaison covalente Mg^{2+} -dépendante, engendrer son changement de conformation et permettre ainsi au facteur D de cliver le facteur B et de produire des C3 convertases propres à la voie alterne (C3bBb).

3.2.2 Surfaces activatrices spécifiques

Une surface activatrice spécifique peut être une surface qui ne contient pas ou peu de protéines régulatrices spécifiques à la voie alterne, empêchant ainsi la formation des convertases d'être régulée [206, 207]. Ainsi, en absence de protéines régulatrices, il y a production d'un nombre croissant de C3b et par conséquent activation de la voie alterne par le principe de «boucle d'amplification» décrit précédemment. Ces étapes d'amplification conduisent à une augmentation des liaisons covalente Mg^{2+} -dépendantes par des ponts esters ou amides entre l'opsonine C3b et les différentes surfaces activatrices.

Au cours d'interventions médicales, et particulièrement dans le domaine de la cardiologie, une grande variété de biomatériaux et de surfaces de contacts exogènes sont utilisés dans le but de contrôler ou d'enrayer la maladie. Des exemples de ces surfaces activatrices pourraient être des biomatériaux utilisés lors d'angioplasties ou de pontages aorto-coronariens (i.e. tuteurs, circulation extracorporelle, etc.). Puisque cette activation du complément se fait sans la présence d'anticorps, la voie alterne sera la plus propice à être activée lorsque le plasma entrera en contact avec les biomatériaux. En particulier, le iC3b plasmatique va se lier aux biomatériaux et initier rapidement la cascade d'activation de la voie alterne. L'activation du complément sera conditionnée par la nature des biomatériaux utilisés. Ainsi, si le facteur H peut se lier à la surface étrangère, celle-ci apparaîtra comme

«compatible» avec l'organisme. Par contre, si le complexe est plus susceptible d'interagir avec le facteur B que le facteur H, la voie alterne sera initiée. Par conséquent, les convertases formées par le contact du sang avec des surfaces exogènes subissent très peu de régulation par les protéines régulatrices, tel le facteur H et le facteur I [208]. Ce principe illustre bien le concept de reconnaissance du soi et du non-soi par lequel l'organisme reconnaît et protège ses propres cellules contre leur propre destruction [209].

Dans les interventions comme dans les pontages aorto-coronarien, l'héparine vient augmenter la biocompatibilité du biomatériaux. Ainsi, la présence d'héparine diminue l'activation du complément en diminuant l'amplification de la cascade par le retour du bon fonctionnement des protéines régulatrices, le facteur H et le facteur I [210] à les effets de l'activation du complément dans les pathologies et interventions cardiovasculaires seront abordés plus en détail au chapitre 4.

3.2.2.1 Inflammation

Les pontages aorto-coronariens engendrent une réaction inflammatoire délétère impliquant une activation des neutrophiles, des plaquettes, des cellules endothéliales et du système du complément. Une étude menée récemment a démontré que, *in vitro*, l'ajout de neutrophiles activés et fragmentés par sonication ou cavitation à du plasma anticoagulé par la lépirudine pouvait engendrer une activation du complément par la voie alterne puisque les composantes spécifiques de cette voie étaient significativement augmentées par rapport aux contrôles (neutrophiles non-activés) [211]. Cette étude suggère également que les fragments membranaires ou les organelles des neutrophiles sont les composantes clés dans l'activation du complément par les neutrophiles, les protéases libérées au cours de l'activation cellulaire, ayant une implication limitée. Malgré ces constatations intéressantes, les auteurs concluent qu'une activation du complément par les neutrophiles serait peu probable dans le cadre de pontages aorto-coronariens puisque la destruction cellulaire ne serait pas aussi suffisante que celle appliquée *in vitro* pour induire une activation du complément. En plus de l'implication possible de l'activation de la voie alterne dans l'inflammation engendrée lors des pontages coronariens, plusieurs évidences cliniques

soulignent le rôle prépondérant de la voie alterne du complément dans la pathogénèse de nombreuses maladies inflammatoires [212]. Parmi ces pathologies, on compte les maladies auto-immunes, tel le LED et l'arthrite rhumatoïde, les troubles relatifs aux dommages de reperfusion locaux (infarctus) ou systémiques (syndrome inflammatoire post-ischémique, réponse inflammatoire systémique, syndrome de détresse respiratoire aiguë), les maladies rénales, les maladies inflammatoires et dégénératives du système nerveux, les rejets de greffe et les complications inflammatoires survenant après hémodialyse. Bref, en principe, lorsque l'inflammation est impliquée dans une maladie, le complément est généralement l'un des joueurs impliqué dans le processus, et par conséquent, une cible potentielle pour les interventions thérapeutiques [213].

En plus de son implication possible dans l'inflammation engendrée lors des pontages coronariens, plusieurs évidences cliniques soulignent le rôle prépondérant de la voie alterne dans la pathogénèse de nombreuses maladies inflammatoires [214, 215]. Parmi ces pathologies, on compte les maladies auto-immunes, tel le LED et l'arthrite rhumatoïde, les troubles relatifs aux ischémies et reperfusion local (infarctus) ou systémique (syndrome inflammatoire post-ischémique, réponse inflammatoire systémique, syndrome de détresse respiratoire aiguë), les maladies rénales, les maladies inflammatoires et dégénératives du système nerveux, les rejets de greffe et les complications inflammatoires survenant après hémodialyse. La large implication du complément dans le processus inflammatoire en fait, à priori, une cible potentielle pour les interventions thérapeutiques [174, 175].

3.2.3 Properdine : activation directe

La properdine, aussi appelée facteur P, est une protéine composée de six domaines TSR (*thrombospondin type I repeat*: TSR-1 to TSR-6) et d'un domaine N-terminal. La properdine existe sous forme de dimère, trimère et tétramère. Contrairement à la majorité des autres protéines régulatrices du complément qui sont produites par le foie, la properdine est majoritairement synthétisée par les monocytes/ macrophages, les lymphocytes T et les neutrophiles [216-218]. Avant tout, la properdine est reconnue pour son rôle dans la protection du fragment C3b contre un éventuel clivage par les protéines régulatrices

(facteur H et le facteur I) de même que pour sa capacité à stabiliser et à promouvoir la formation du complexe C3bBb.

Il y a une cinquantaine d'années, Louis Pillemer proposait un modèle d'activation du complément par lequel le complément serait activé par la properdine [219]. Il nomma ce mécanisme le «système de la properdine». Aujourd'hui, les nouvelles études soulignant le rôle potentiel de la properdine comme activateur du complément abondent. L'équipe de John Atkinson aux États-Unis est l'une de celles qui se sont le plus intéressées à l'activation du complément par la voie alterne. En 2006, un des collaborateurs du Dr Atkinson, le Dr Dennis Hourcade, suggère pour la première fois que la properdine interagirait d'abord avec un ligand spécifique via l'une de ses sous-unités et favoriserait ensuite la formation de la C3 convertase de la voie alterne (C3bBb) au site de liaison de la properdine [113]. Ces chercheurs stipulent même qu'il s'agit ici d'une autre voie d'activation du complément, qu'ils qualifient d'homologue, mais indépendante à la voie alterne.

Depuis lors, des recherches ont été effectuées dans le but d'identifier les ligands potentiels à la properdine. Ces études indiquent que la properdine agit à titre d'initiateur de la voie alterne en présence de cibles potentiellement dommageables pour notre organisme.

Un article récent démontre que la properdine peut se lier aux lymphocytes T qui sont en apoptose précoce, mais pas aux lymphocytes T activés ou non-activés, et ce sans l'implication des voies classique et lectine [220]. La présence de la properdine aux membranes de ces cellules apoptotiques engendrerait la liaison du fragment C3b sur les lymphocytes T apoptotiques. L'équipe de Kemper a aussi démontré que cette interaction properdine-lymphocytes promeut la phagocytose de ces cellules apoptotiques précoces par les macrophages et les cellules dendritiques. Cette fonction biologique est d'autant plus présente qu'une activation de la cascade de la voie alterne jusqu'à la voie terminale a lieu.. Cette fonction de la properdine fait échos à l'activation du complément par les «surfaces activatrices», tel que décrit plus haut et favorisée par l'expression réduite de protéines régulatrices du complément à la surface des cellules apoptotiques [174, 175].

La properdine exerce un effet similaire sur d'autres phases de la mort cellulaire. Ainsi, le «*Journal of Immunology*» publiait récemment que la properdine, pouvait lier cette fois les cellules apoptotiques tardives et nécrotiques dans le but de réguler l'activation de la voie alterne [221]. Contrairement à l'équipe de Kemper, l'équipe de Xu n'a pas observé d'interactions significatives entre la properdine et les cellules apoptotiques précoces, mais bien avec les cellules apoptotiques tardives et nécrotiques. Xu décrit même que l'ADN fragmenté des cellules apoptotiques tardives et nécrotiques serait l'un des ligands auquel la properdine se lierait indépendamment du C3b et ce, dans plusieurs types cellulaires (HUVEC, U937, HK-2, and EBV-LCL). Un peu de la même manière que le mécanisme décrit précédemment, la liaison de la properdine à la surface des cellules nécrotiques favoriserait la liaison de C3b à la surface des membranes et ainsi une activation du complément par la voie alterne par le principe d'amplification.

Les protéoglycane seraient des médiateurs privilégiés dans la liaison de la properdine aux cellules apoptotiques. Un protéoglycane est une glycoprotéine hautement glycosylée (sa portion glucide peut atteindre 95%) composé d'un complexe protéine-glycosaminoglycane (GAG). Les GAG sont des polysaccharides linéaires composés de plusieurs unités de disaccharides qui varient selon leurs groupements sulfates [222]. Les protéoglycane peuvent être soit transportées à l'extérieur de la cellule par exocytose, soit entrer dans la constitution de la membrane plasmique. Parmi les protéoglycane solubles, on compte la chondroïtine-sulfate, le kératan-sulfate, l'héparan-sulfate et le dermatan-sulfate. Les protéoglycane qui entrent dans la composition de la membrane plasmique quant à eux, sont des joueurs essentiels dans les relations cellule-matrice. C'est par la portion GAG des protéoglycane que la properdine semble interagir avec les cellules. En 2005, Yu et coll. ont démontré que la properdine interagissait avec l'héparine, une protéoglycane bien connue [223]. Près de un an plus tard, Zhang et coll. ont aussi démontré que la properdine se liait aux protéoglycane, mais cette fois, à la surface des cellules et ce grâce la portion GAG des protéoglycane [224]. Dans son article de 2008, Kemper détermine que la portion GAG sulfaté à la surface des cellules T apoptotiques était

la portion qui interagissait avec la properdine [220]. Il a aussi noté que les protéoglycanes solubles, comme la chondroïtine-sulfate, inhibait la reconnaissance des cellules apoptotiques par la properdine.

3.2.4 Immunoglobulines

3.2.4.1 IgG

De manière générale, on sait que l'initiation de l'activation du complément par la voie alterne dans le sang se fait en phase aqueuse (hydrolyse spontanée) alors que l'amplification se fait non seulement sur des surfaces activatrices, mais aussi dans le plasma, en phase aqueuse. Deux sorts différents peuvent donc attendre la molécule C3b provenant de l'hydrolyse spontanée du C3. Tel que mentionné précédemment, le C3b formé peut se lier à une molécule d'eau pour former la iC3b et ensuite lier le facteur B puis le facteur D pour former la C3 convertase (iC3bBb). Par ailleurs, la molécule C3b formée à partir de l'hydrolyse spontanée peut se jumeler à une autre molécule C3b et se lier à un IgG. Cette amplification de l'activation de la voie alterne dirigée, dans le plasma, par la formation de complexes formés de deux molécules C3b et d'une IgG (C3b₂-IgG), ne se lie pas directement au facteur B. Le complexe C3b₂-IgG lie directement la properdine de manière bivalente avant même de lier le facteur B. Par conséquent, le complexe formé par le C3b₂-IgG et la properdine s'avère très efficace pour permettre la formation de la C3 convertase de la voie alterne. Le facteur D active ensuite le facteur B, lesquels s'ajoutent au complexe de manière usuelle et l'assemblage de la convertase est ainsi complété.

La convertase formée à partir du complexe C3b₂-IgG possède un temps de demi-vie supérieur au C3b lui-même et permet donc au processus d'amplification de persister plus longtemps. En effet, l'interaction entre les deux molécules de C3b empêcherait, en partie, l'inactivation des molécules C3b par le facteur H et le facteur I.

3.2.4.2 *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) [225]. Cette immunoglobuline représente 15 à 20 pour cent des immunoglobulines sériques totales et est hautement glycosylée. Contrairement aux IgG et à l'IgM, l'IgA ne possède pas de site de liaison pour le C1q. Cependant, en formant un complexe immun avec une bactérie. L'IgA est capable d'interagir avec C3b par ses hydrates de carbone et déclencher la cascade de la voie alterne [226, 227].

3.2.5 *Activation par la voie lectine*

En 2006, l'équipe de Selander a démontré qu'il existait un mécanisme fonctionnel par lequel le MBL fixé à sa cible activerait la voie alterne du complément [228] en favorisant l'activation de la protéine C3 en absence de C2, d'où l'appellation «Lectin C2-bypass pathway», et indépendamment de C4. Ce mécanisme aurait pour particularité d'être peu sensible à l'inactivation par le facteur H et le facteur I. Les auteurs précisent aussi qu'un tel mécanisme pourrait exister pour les complexes ficoline-ligands (MASP), à cause des similitudes tant fonctionnelles que structurelles entre les ficolines et le MBL. Comme nous le verrons un peu plus en détails dans la section «voie lectine», une telle voie ne serait que très peu utilisée dans un contexte normal mais pourrait être largement activée en cas de déficiences en C2.

3.2.6 *Plaquettes*

3.2.6.1 *P-sélectine*

La P-selectine est une protéine adhésive jouant un rôle majeur dans le recrutement et la diapédèse leucocytaire et l'athérosclérose. Elle est également sécrétée des granules alpha des plaquettes activées et exprimée à leur surface. La P-sélectine joue ainsi un rôle

également majeur dans la thrombose, en potentialisant leurs propriétés pro-coagulantes et leur liaison aux monocytes [216, 217]. Del Conde et collaborateurs proposent un modèle dans lequel le fragment C3b généré par l'hydrolyse spontanée dans le plasma se lierait aux plaquettes activées par l'intermédiaire de la P-selectine. Le C3b interagirait alors avec le facteur B pour former la C3 convertase alterne [184].

Dans son article, Del Conde propose donc un modèle dans lequel le fragment C3b généré par l'hydrolyse spontanée dans le plasma se lierait aux plaquettes activées par l'intermédiaire de la P-selectine. Le C3b ainsi attaché à la surface des plaquettes interagirait avec le facteur B pour former la C3 convertase alterne. De l'activité de cette convertase seraient produits les fragments C3a et C3b. Le fragment C3a favoriserait le recrutement des leucocytes et l'induction de l'inflammation, alors que le fragment C3b se déposerait à la surface des plaquettes pour ainsi engendrer une activation complète du complément, entraînant la formation de la voie terminale. La conséquence immédiate d'un tel processus d'activation du complément par les plaquettes est certes l'induction d'une réponse inflammatoire localisée au site de la thrombose.

3.2.6.2 Intégrine $\alpha\text{IIb}-\beta\text{III}$

Il y a quelques semaines, un article suggérait qu'un tel mécanisme devait faire l'objet d'une régulation quelconque. Une équipe de Houston a émis l'hypothèse que le facteur H pouvait se lier aux plaquettes et ainsi réguler les effets délétères engendrés par une activation excessive du complément [229]. Ils se sont entre autres basés sur une étude de Vaziri-Sani publié en 2005 qui démontrait que, en absence de complément, le facteur H pouvait lier le récepteur GPIIb-IIIa à la surface des plaquettes lavées et activées à la thrombine par sa portion C-terminale (*heparin-binding sites*) [219]. L'équipe de Mnjoyan a tenté de savoir si le facteur H pouvait interagir par d'autres récepteurs à la surface des plaquettes dans le but de réguler l'activation du complément [229]. Elle a donc entrepris de caractériser l'interaction entre le facteur H et l'intégrine $\alpha\text{IIb}-\beta\text{III}$, l'intégrine la plus abondante des plaquettes. Leur résultat furent concluant : le facteur H interagissait avec les plaquettes non-activées par les intégrines $\alpha\text{IIb}-\beta\text{III}$ à la surface de ces dernières. Par

contre, puisque la présence de facteur H à surface de plaquettes augmentait en condition d'activation, les auteurs suggèrent que d'autres intégrines pourraient être capables de lier le facteur H lors d'activations plaquettaires. Par conséquent, cette présence accrue de facteur H à la surface des plaquettes pourrait être due à l'interaction entre le facteur H et d'autres ligands localisés sur les plaquettes.

3.2.6.3 La thrombospondine-1

La thrombospondine-1 (TSP-1) est une glycoprotéine relâchée par les granules α des plaquettes qui participe à l'agrégation des plaquettes en leur adhérent via le fibrinogène et le CD47 (*integrin-associated protein*, ou IAP) [230]. Dans son étude, Mnjayan a souligné que le facteur H pouvait aussi lier la TSP-1 à la surface des plaquettes lavées et activées, à la thrombine par sa portion C-terminale [231]. Il a démontré que l'ajout de TSP-1 augmentait la présence de facteur H à la surface des plaquettes. Il suggère que la présence accrue de facteur H à la surface des plaquettes pourrait être attribuable à l'interaction entre le facteur H et la TSP-1. Les conséquences de cette interaction sur l'activation du complément restent cependant peu étudiées. On pourrait suggérer que la TSP-1, tout comme le fait la CRP (section 3.1), potentialise l'effet du facteur H, favorisant ainsi la dissociation des C3 convertases.

Dans un autre ordre d'idée, ces conclusions peuvent varier si l'on observe mieux la structure de la TSP-1. Chaque monomère de TSP-1 (180 kDa) possède plusieurs domaines, dont le «*properdin-like type1 repeats*». Or, cette structure s'apparente beaucoup avec celle de la properdine, la protéine qui favorise une régulation positive du complément par la voie alterne (les type I repeats) [232]. Dans ce sens, pourrions-nous croire que la TSP-1 puisse reproduire les effets de la properdine, et ainsi favoriser la stabilisation de la C3 convertase et ainsi favoriser l'activation de la voie terminale du complément ? Nous avons décrit (section 3.2.3) que la properdine peut activer le complément indépendamment de l'activation de la cascade proximale d'activation, c'est-à-dire en se liant à des surfaces sans nécessiter la présence du C3b [113]. Dans un autre d'idée, ceci laisse supposer que la TSP-

Il pourrait jouer un rôle dans l'activation du complément en par la voie de la «properdine» ou même, en liant elle-même les surfaces activatrices et en favorisant elle-même la formation de la C3 convertase. Bien sûr, à cette étape-ci, tout ceci ne reste que spéculation. Ces avenues méritent d'être explorées plus en profondeur. Tel que nous le verrons au chapitre 6, une section de mes travaux porte sur l'implication de la TSP-1 dans l'activation et la régulation du système du complément. Ces résultats ne sont toutefois qu'en phase préliminaire.

3.2.6.4 Microparticules plaquettaires

Dans la section portant sur l'activation du complément par la voie classique, nous avons vu que les PMP pouvaient activer le complément par la voie classique [195]. Une des lacunes de l'étude réside dans le fait qu'un seul activateur a été utilisé dans le but de produire les PMP. Or, l'utilisation d'agonistes complémentaires aurait pu engendrer l'apparition de composantes de surface différentes et, par conséquent, engendrer des mécanismes d'activation du complément mettant en scène la voie alterne. Cette voie reste définitivement à explorer.

3.3 La voie lectine

La voie lectine est la dernière voie à avoir été décrite. Certains auteurs stipulent cependant qu'elle était probablement la première à exister, même avant l'existence de la voie alterne [204]. C'est en 1987 qu'une équipe du Japon a démontré pour la première fois que le MBP sérique (mannan binding protein, maintenant appelée MBL, pour mannan-binding lectin) active le complément de manière similaire au C1q de la voie classique grâce à sa structure similaire à ce dernier [233]. Il fallu encore quelques années pour que l'on attribue au MBL sa propre voie d'activation du complément, indépendamment de la voie classique à laquelle il était toujours associé. Les recherches subséquentes ont conduit à connaître les mécanismes par lesquels le MBL pouvait engendrer l'activation du complément.

Le MBL est, tout comme le C1q, un oligomère assemblé à partir de chaînes polypeptidiques identiques [234]. Cette protéine de la famille des collectines est synthétisée par le foie en réponse aux cytokines produites par les macrophages activés par la liaison avec des pathogènes [235]. 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 immunoglobulines [236]. Le MBL est composée de trois à six sous-unités homotrimériques identiques. Chaque trimère est composé d'une tige «collagen-like» et d'une tête globulaire contenant les régions de reconnaissance des hydrates de carbone (carbohydrate recognition domain ou CRD). Le MBL interagit avec les groupements hydroxyles sur les carbones-3 et -4 qui sont orientés sur le plan équatorial de la structure en anneau de six unités de glucose (pyranose) [237]. Le MBL possède donc une affinité de liaison pour diverses surfaces activatrices comme le D-mannose, le L-fucose et la N-acétylglucosamine (GlcNAc) [238]. Ainsi, cette caractéristique de liaison permet au MBL de lier les groupements «sucre» à la surface des microorganismes [239], mais aussi à la surface de certaines protéines ou cellules humaines. Le MBL sérique aurait, en plus d'une structure semblable au C1q, des similitudes au point de vue fonctionnel puisqu'il

favoriserait l'activité enzymatique du C1s. La liaison du MBL à ces divers ligands lui procure sa fonction «lectine» et favorise l'activation de sérines protéases spécifiques et la liaison de ces dernières à la portion N-terminale (collagen-like CUB1–EGF) des MBL.

Suite au changement de conformation engendré par la liaison à des surfaces activatives, le complexe MBL-ligand engendre le clivage des protéines C4 et C2. Cette activation engendre la formation de la C3 convertase C4b2a, laquelle clive le fragment C3, générant les produits de formation C3a et C3b. L'activation du complément par la voie lectine conduit donc aussi à la formation de la voie terminale du complément.

Bien que la formation des convertases de la voie classique et lectine semble en tout point similaire, des études rapportent qu'il y aurait des différences quant à l'efficacité des convertases de ces voies respectives. Une étude publiée en 2008 démontre que l'activation du complément via la voie lectine serait davantage contributive à l'avènement des pathologies impliquant des réactions inflammatoires que pourrait l'être la voie classique [84]. Pour arriver à une telle conclusion, l'équipe de Rawal a étudié, à partir de composantes purifiées, les cinétiques de formation des C3 et C5 convertases de chacune des deux voies à la surface d'érythrocytes de mouton. Malgré des propriétés de cinétique homologues, la voie lectine serait au moins quatre fois plus efficace dans la formation des convertases par rapport à la voie classique, puisque tous les C4b formé à la surface des érythrocytes étaient aptes à former les convertases alors que seul un C4b sur quatre remplissait la même fonction.

Récemment, des recherches ont permis de découvrir qu'un autre groupe de protéines étaient aptes à activer le complément par les mêmes mécanismes que le MBL. Ces autres types de collectines sont appelés ficolines. Chez l'humain, la L-ficoline et la H-ficoline sont structurellement très semblables au MBL et lient aussi les hydrates de carbone tel la GlcNAc [130, 131] et autre groupement acétyles spécifiques [240]. Par contre, ces ficolines ne possèdent pas une tige *collagen-like*, mais bien des domaines *fibrinogen-like*. L'activation de la voie lectine par les ficolines se fait donc, comme pour les MBL, par une interaction avec la majorité des agents décrits dans les paragraphes suivants.

Le complexe C1 de la voie classique et les complexes MBL-MASPs ou Ficolines-MASPs de la voie lectine ont beaucoup de similitudes entre eux. Les deux types de complexes sont formés de deux sous-unités : une protéine de reconnaissance oligomérique (C1q, MBL, L-ficoline, H-ficoline), et une protéase, qui est soit un tétramère (C1s-C1r-C1r-C1s) ou un dimère (MASP-2). Parce qu'il existe une si grande proximité entre les deux complexes initiateurs des voies classiques et lectines, il est logique de penser que l'un pourrait favoriser l'activation de l'un au détriment de l'autre. Est-ce que ces deux protéines agissent en synergie sur un même récepteur sur les cellules cibles ? Le groupe de Roos s'est posé la question en 2007 en utilisant un modèle de cellules endothéliales (HUVEC) *in vitro* [241]. Ils ont découvert que les interactions HUVEC-MBL et HUVEC-C1q impliquaient le même site de liaison, soit leur domaine collagène, puisqu'ils se lient de manière dose-dépendante aux HUVEC en absence de calcium. Leurs découvertes soulignent aussi le fait que le MBL et le C1q interagissent avec le même site sur les HUVEC puisqu'une pré-incubation avec l'une des collectines empêchait la liaison de l'autre. Par conséquent, le MBL et le C1q auraient un récepteur commun sur les cellules endothéliales humaines.

La présente section nous montre les différents ligands qui sont reliés aux pathologies cardiovasculaires mais qui cette fois, sont aptes à initier l'activation du complément par la voie lectine. La figure 9 résume la cascade d'activation de la voie lectine.

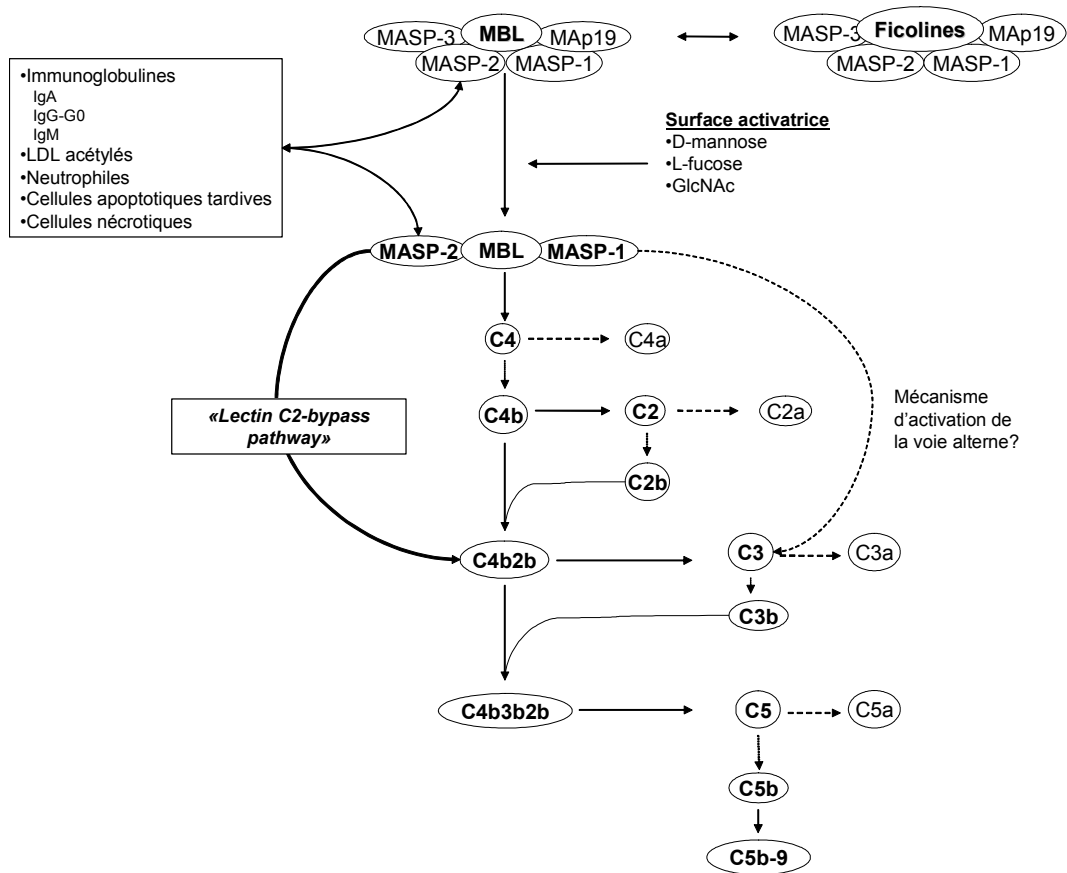


Figure 9. Activation du complément par la voie lectine. Le mécanisme le plus fréquent d'activation du complément par la voie lectine est l'interaction entre le MBL et les protéines MASPs. Le MBL peut aussi interagir avec d'autres ligands dans le but d'activer cette voie (encadré). Le complexe ficolines/MASPs peut activer la voie lectine selon les mêmes mécanismes que par le complexe MBL/MASPs (flèche double-sens). Il existe aussi une voie qui viendrait outre-passer l'activation de la protéine C2 (Lectin C2-bypass pathway). Les flèches « en pointillé » pointent vers le produit d'activation qui ne participe pas au reste de l'élaboration de la cascade. Les flèches « pleines » illustrent la cascade d'activation, à partir de la liaison du MBL (ficoline) avec son ligand, jusqu'à la formation de la voie terminale.

3.3.1 MASPs

Après s'être liées directement à une surface activatrice, des protéases spécifiques appelées MASPs (*MBL-Associated Serine Protease*) peuvent lier le MBL dans le but d'activer le complément [124, 133-135]. On dénombre pour l'instant trois MASPs fonctionnels (MASPs-1 à -3) et une molécule plus petite appelée, non-enzymatique, MAp19 qui peuvent lier le MBL. Le MAp19 est une forme tronquée de la protéine MASP-2. Cette petite MASP serait elle aussi associée aux complexes MBL/ficoline-MASP [242]. Plusieurs études démontrent que seul le MASP-2 possède un rôle fonctionnel défini et direct dans l'évolution de la cascade d'activation du complément.

Il existe une grande homologie de structures et d'activités entre les MASPs et les protéines C1r et C1s de la voie classique [128]. Ainsi, chez les MASPs comme chez les protéines C1r et C1s, on retrouve deux domaines identiques, le domaine Uegf et le domaine CUB (*bone morphogenic protein 1*), séparés par un domaine EGF-like (Ca^{2+} -binding epidermal growth factor), deux modules CCP (*complement control protein*) (CCP) et un domaine C-terminal. La portion N-terminal, quant à elle, diffère d'une MASP à l'autre. La liaison entre le MBL et le MASP se fait justement par cette portion de la protéine du MASP alors que c'est le domaine collagène qui est ciblé chez le MBL.

Tel que décrite précédemment, l'activation par la voie lectine s'apparente beaucoup à celle par la voie classique : le MASP-2 clive d'abord la protéine C4 en C4a et C4b, lequel se lie à la surface activatrice du pathogène ou de la cellule cible. Il a été démontré que le MASP-2 est environ 20 fois plus actif que la protéine C1s dans le clivage de la protéine C4, ce qui en fait une enzyme extrêmement puissante [89]. C'est à partir du clivage du fragment C4 que la voie lectine converge avec la voie classique.

Par ailleurs, il est reconnu que le MASP-1 participe au clivage de la protéine C2, mais demeure inapte à engendrer directement la fragmentation du C2. En ce sens, et suivant les constatations énumérées précédemment, il est possible que les liaisons MBL/MASP-1 [243] et MBL/MASP-3 potentialisent l'activation du complément par la voie lectine, mais ne pourraient cependant pas être suffisantes à initier la cascade d'activation. De plus, il

serait même possible que le MASP-1 ait une fonction essentielle dans l'activation de la voie lectine en activant lui-même le MASP-2 [243].

3.3.1.1 «*Lectin C2-bypass pathway*»

Jusqu'à maintenant, nous avons vu que l'initiation de la voie lectine engendrait le clivage des protéines C2 et C4 puis activerait la protéine C3, générant ainsi une C3 convertase qui est structurellement et fonctionnellement la même que celle générée lors de l'activation du complément par la voie classique. Dernièrement, l'étude de Selander et ses collègues a démontré qu'il existait un mécanisme fonctionnel par lequel le C3 était activé et ce, en absence de C2 [123]. La convertase ainsi formée serait celle dite de la voie alterne. Les auteurs ont baptisé cette nouvelle avenue d'activation la «*Lectin C2-bypass pathway*». Bien que cette découverte soit des plus intéressantes, il faut être conscient que cette voie n'a été explorée que dans des modèles *in vitro*. L'activation d'une telle voie est relativement faible par rapport aux voies régulières d'activation. Les effets suivant l'activation de cette voie s'observent lorsque les effets des voies régulières sont absents. Par contre, on pourrait s'attendre à ce que, physiologiquement, cette voie abrégée soit effectivement activée dans ces conditions, c'est-à-dire en cas de déficience de certains fragments et d'activation erronée de l'une ou l'autre des voies régulières. Par conséquent, l'existence de la «*Lectin C2-bypass pathway*» pourrait expliquer pourquoi une déficience en C1 ou C4 cause plus d'effets délétères qu'une déficience en C2 [99-101]. La figure 10 illustre l'activation du complément par la voie lectine en cas de déficience en protéine C2 ou C4.

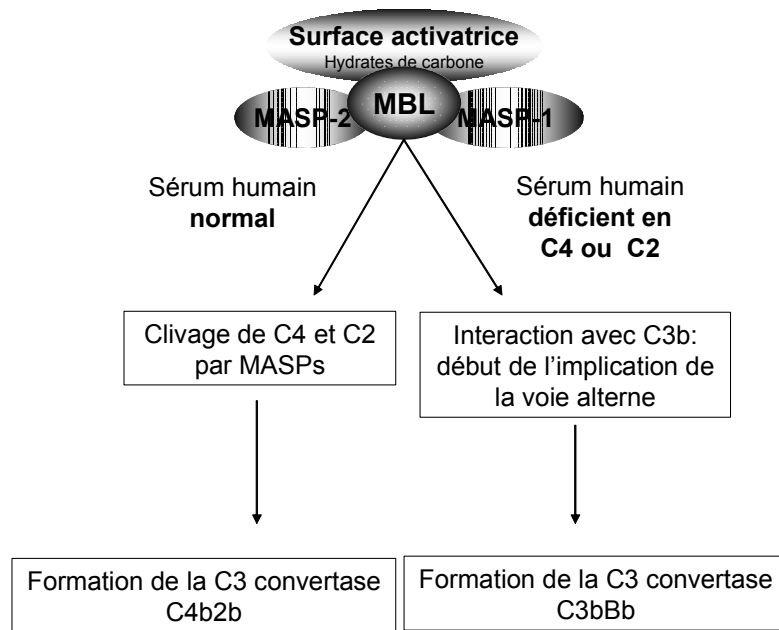


Figure 10. Cascade d'activation de la voie lectine en présence d'un sérum humain normal ou d'un sérum humain déficient en composant C2 ou C4. Les C3 convertase formées diffèrent d'une situation à l'autre puisque l'une s'apparente à la convertase classique (C4b2b) et l'autre à la convertase alterne (C3bBb).

3.3.2 Immunoglobulines

En plus d'interagir avec des résidus mannoses, le MBL peut se lier avec certains types d'immunoglobulines dans le but d'activer la voie lectine du complément. Les immunoglobulines qui interagissent avec le MBL doivent posséder une forme de glycosylation particulière. Parmi les Ig ciblées, on retrouve les IgA polymériques, les d'IgG agalactosylé (IgG-G0), dont les terminaisons Fc sont des résidus GlcNAc et certaines formes glycosylées d'IgM aussi dotés de terminaisons GlcNAc [244].

3.3.2.1 IgA

L'implication des IgA dans l'activation du complément par la voie alterne a été décrite plus haut. En plus de pouvoir activer cette voie, une étude démontre que ces immunoglobulines pourraient aussi être aptes à activer le complément par la voie lectine [245]. Par conséquent, il existerait plusieurs voies proximales aptes à induire la fragmentation du C3 par les IgA. Le mécanisme par lequel les IgA induiraient l'activation de la voie lectine serait semblable à celui du MASP-2. Ainsi, les IgA interagiraient directement avec les MBL et ce, en présence de calcium.

Cependant, en 2001, l'équipe de Roos a découvert que seules les formes dimériques et polymérique des IgA pouvaient activer le complément par la voie lectine [234]. Une autre étude récente a soulevé le fait que les IgA sous une forme degalactosylée et/ou dénaturée pouvaient lier le MBL, mais que les IgA natifs ne pourraient pas être aptes à activer la voie lectine du complément [246].

3.3.2.2 IgG

En 1995, le groupe de Sim s'est penché sur l'effet que pourrait avoir la glycolysation des IgG observée dans l'arthrite rhumatoïde dans l'activation du complément [247]. Ils ont découvert que la liaison du MBL à de multiples IgG-G0 entraînait l'activation du complément chez ce type de patients. Les IgG-G0 comptent pour 35% des IgG sériques totaux et ont la particularité de ne pas être munis de résidus galactose en portion terminale,

mais bien de résidus GlcNAc, résidus auxquels la MBL peut se lier. Apparemment, l'interaction entre un seul domaine CRD du MBL et un IgG serait très faible et instable dans le sérum. Par contre, la présence de multiples IgG-G0 interagissant avec plusieurs domaines CRD favoriserait l'apport d'une interaction de très haute avidité.

3.3.2.3 IgM

En utilisant une colonne d'affinité contenant du MBL lié aux parois, Arnold et ses collaborateurs ont pu observer une liaison MBL-IgM qui semblait être due aux GlcNAc des structures terminales de l'IgM [237]. Ces structures occupent trois sites de glycosylation par chaîne lourde d'IgM, ce qui en fait un candidat potentiel apte à lier le MBL. Par contre, si l'Ig est lié à un antigène, il sera inapte à lier le MBL puisqu'il n'y aurait pas assez de sites GlcNAc disponibles à lier ce dernier. Par conséquent, les auteurs suggèrent que, en condition physiologique, les IgM agrégés du sérum interagiraient avec le MBL dans le but de déclencher l'activation de la voie lectine.

3.3.3 LDL acétylés

En plus d'être pro-athérogéniques (voir section 1.1.1), les A-LDL seraient aptes à initier l'activation de la voie lectine en se liant à la L-ficoline [141]. Les études effectuées jusqu'à présent ne démontrent malheureusement pas les mécanismes par lesquels ces liaisons s'effectuent ni les conséquences d'activation qui en découlent.

3.3.4 Neutrophiles

Nous avons précédemment décrit (section 3.2.2.1) les résultats obtenus par Asberg et Mollnes concernant la capacité des neutrophiles activés à initier la cascade d'activation du complément [211]. En plus de promouvoir l'activation de la voie alterne, les neutrophiles activés et fragmentés par sonication et cavitation sont susceptibles d'activer le complément par la voie lectine. Est-ce que les fragments membranaires des neutrophiles pourraient se lier au MBL et engendrer l'activation du fragment C2 ? Le mécanisme

pourrait-il se faire indépendamment du fragment C2 ? Malheureusement, cette étude étant la première attribuant ce rôle aux neutrophiles, aucun mécanisme n'a encore été décrit.

3.3.5 Cellules apoptotiques tardives/Nécrotiques

Nous avons vu dans la section 3.1.4 que les cellules apoptotiques pouvaient interagir avec la voie classique dans le but d'engendrer une activation du complément. Or, des études ont par la suite démontré que le MBL pouvait lui aussi entrer en interaction avec les cellules apoptotiques. Le MBL et le C1q sont donc des molécules de reconnaissance et «collagènes de défense» qui permettent à l'organisme de se débarrasser de ces cellules apoptotiques souvent délétères et pro-athérogéniques, tout en régulant la synthèse de cytokines pro- et anti-inflammatoires [248]. En 2001, le groupe de Henson a déterminé que le MBL, tout comme le C1q, se liait aux cellules apoptotiques par l'intermédiaire de la calréticuline et du ligand CD91 (aussi appelé *Low density lipoprotein-related protein 1* (LPR1) ou *alpha-2-macroglobulin receptor* ($\alpha_2\text{mr}$)) dans le but d'initier la macropinocytose (formation de vésicules) et de favoriser la capture des cellules apoptotiques par les macrophages [249]. Par contre, il a fallu attendre les recherches de Nauta [250] pour connaître les différents aspects d'une interaction entre le MBL et les cellules apoptotiques. Cette équipe a tenté d'élucider plusieurs facettes encore inédites de cette interaction, tel que : 1) le stade auquel les cellules apoptotiques étaient aptes à lier le MBL ; 2) la capacité des cellules nécrotiques à lier le MBL ; 3) la similitude des sites de liaison du C1q et du MBL sur les cellules apoptotiques ; 4) et surtout, la capacité de cette interaction à engendrer l'activation du complément. Les résultats de l'étude dévoilent que le MBL se lie aux cellules apoptotiques tardives de même qu'aux cellules nécrotiques par le domaine lectine de ses têtes globulaires (région CDR) en présence de calcium. Par contre, bien que le C1q et le MBL lient probablement les mêmes sites sur ces cellules apoptotiques ou nécrotiques, l'interaction MBL/cellules apoptotiques ou MBL/cellules nécrotiques n'engendre pas l'activation du complément par la voie lectine. Une telle conclusion ne nous enseigne pas directement une nouvelle avenue pour favoriser l'activation du complément, mais nous

montre indirectement l'importance de l'interaction MBL/cellules apoptotiques (nécrotiques) dans l'activation des autres voies. En interagissant avec ces cellules, le MBL empêche probablement l'interaction entre le C1q et les autres protéines régulatrices avec les cellules apoptotiques (nécrotique), ce qui contribuerait peut-être dans une certaine mesure à modifier indirectement l'activation totale du complément. Une autre hypothèse pourrait être celle décrite dans une section antérieure (section 3.1.4), voulant que les protéines régulatrices solubles protègent les cellules apoptotiques contre la lyse par le C5b-9 [177].

3.4 Voie des protéases extrinsèques

La voie des protéases extrinsèques gagne en popularité depuis quelques années. Plusieurs études ont démontré que beaucoup de protéases plasmatiques, dont des enzymes protéolytiques contenues dans l'exsudat inflammatoire et les protéases du système de la coagulation et de la fibrinolyse [251], peuvent activer les composantes C3 et C5 directement, sans même passer par les protéines de reconnaissance du complément proximal [252]. La voie des protéases extrinsèques implique généralement que le complément terminal est activé et ce, indépendamment de l'activation de l'une ou l'autre des voies proximales. Parmi les protéases potentielles qui seront discutées ici, on note la kallikréine, la thrombine, la β -tryptase et l'ASP.

3.4.1 Kallikréine

Certaines composantes des systèmes des kinines et de la coagulation semblent aussi grandement impliquées dans l'activation du complément. Le système des kinines est une cascade enzymatique qui débute lorsqu'un facteur de la coagulation sanguine, le facteur Hageman (facteur XII), est activé à la suite d'une lésion tissulaire. Depuis quelques années, les recherches tendent à démontrer que les kinines influencent les principales composantes du système immunitaire (macrophages, lymphocytes B et T, cellules dendritiques) en modulant leur activation, prolifération, migration et fonctions effectrices [253]. L'activation du facteur XII active la prékallikréine qui elle engendre la formation de la kallikréine. Cette dernière, en plus de cliver le kininogène pour former la bradykinine et d'engendrer la formation de peptides médiateurs de l'inflammation, active le complément et ce, indépendamment des voies proximales d'activation. En 1982, le groupe de DiScipio a démontré que la kallikréine plasmatique pouvait cliver le facteur B et ainsi favoriser le clivage de la protéine C3 en C3a et en C3b. L'équipe stipule que le facteur D et la kallikréine clivent le facteur B de manière identique, en présence d'ions magnésium. Par contre, le facteur D demeurerait plus efficace dans cette fonction que le serait la kallikréine. Or, le clivage du facteur B par la kallikréine pourrait se faire dans des conditions de

coagulation excessive ou dans le cas d'une déficience en facteur D. En plus d'être apte à activer la protéine C3, il a aussi démontré que le complément active le C5 en C5a et C5 [254].

3.4.2 Thrombine

Des recherches beaucoup plus récentes ont détecté une activité semblable pour la thrombine, issue de la cascade enzymatique de la coagulation. Huber-Lang et ses collaborateurs ont démontré que le fragment peptidique C5a pouvait être généré sans même la présence de C3 et ce, par le clivage protéolytique du fragment C5 par la thrombine [255]. Par contre, un article récent démontre aussi que la procarboxypeptidase B activable par la thrombine (proCPB), aussi appelée TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor), est activée par le complexe thrombine-thrombomoduline à la surface de l'endothélium vasculaire et inactiverait, par le clivage spécifique du groupement arginine carboxy-terminal, les médiateurs inflammatoires C3a et C5a.

3.4.3 β -tryptase

Parmi les cellules inflammatoires retrouvées dans la plaque athérosclérotique figurent entre autre les mastocytes. Ces cellules participent au développement de la plaque et à l'avènement des complications cliniques qui en découlent [256].

Par quels mécanismes les mastocytes sont-ils activés à l'intérieur de la plaque ? L'une des hypothèses stipule que l'anaphylatoxine C5a serait l'une des substances contenue dans la plaque qui activerait potentiellement les mastocytes [257, 258]. Or, des études encore plus récentes tendent à démontrer aussi le phénomène inverse, c'est-à-dire une activation des anaphylatoxines par les mastocytes. Cette situation par laquelle le complément serait activé par des éléments extérieurs à la cascade habituelle impliquerait la présence d'une protéase extrinsèque produite par les mastocytes. Le groupe de Fukuoka a tenté dernièrement de caractériser les mécanismes de production d'anaphylatoxines dans l'asthme et les réactions allergiques. La β -tryptase est la protéase majeure des mastocytes, elle est impliquée dans les réponses allergiques puisqu'elle est relâchée en symbiose avec

l'histamine et les protéoglycans durant l'exocytose [259]. Les recherches de cette équipe ont démontré que la β -tryptase peut générer et activer les protéines C3 et C5 sans toutefois nécessiter la présence des convertases [250]. A l'heure actuelle aucune étude n'a déterminé si la β -tryptase pouvait aussi favoriser l'activation du complément par une voie extrinsèque dans le processus d'athérogénèse.

3.4.4 Protéases bactériennes

L'ASP est une sérine protéase et un facteur virulent produit par la bactérie Gram-négative anaérobie *Aeromonas sobria* qui peut être impliquée dans plusieurs infections locales qui aboutissent souvent à une infection systémique tel le sepsis [260]. En 2007, il a été découvert que l'ASP engendrait la coagulation plasmatique humaine en clivant la prothrombine pour produire l' α -thrombine [261]. Par conséquent, cette sérine protéase bactérienne pourrait contribuer à la mise en place d'événements thrombotiques suivant un sepsis causé par une infection bactérienne. Les mécanismes par lesquels l'ASP engendre ses activités ont été suggérés cette année, en 2008, par Nitta et ses collègues [262].

En incubant la protéine C5 humaine avec la protéase ASP enzymatiquement modifiée, Nitta a démontré qu'il y avait induction de la migration de neutrophiles dépendante de la dose d'ASP utilisée [262]. Cet effet, attribuable à l'activité du peptide C5a, était inhibé par l'antagoniste du récepteur C5a (C5aR). Or, ces évidences illustrent que les infections et les troubles de coagulation causées par cette bactérie pourraient être attribuables au fragment C5a qui a été produit par clivage directe du C5, soit par la voie des protéases extrinsèques.

Ensemble, ces activités de clivage engendrées par des protéines «exogènes» au complément résultent en une génération de peptides actifs du complément. Parmi les composantes actives générées se trouve le fragment C3b, activateur principal de la voie alterne. Par conséquent, on peut stipuler qu'il existe une étroite collaboration entre l'initiation de l'activation du complément par des composantes «extérieurs» au complément et la voie alterne, puisque cette dernière peut servir à amplifier l'activation du complément qui a été initiée par les protéines telles la kallikréine, la thrombine, la β -tryptase et l'ASP.

CHAPITRE 4

4 L'activation du complément dans l'initiation et progression de la maladie coronarienne

La section précédente nous a démontré que différents facteurs impliqués à plusieurs stades de la maladie coronarienne sont à l'origine de l'activation du complément. Par exemple, certaines formes de pentraxines et de lipoprotéines, les complexes immuns, le matériel apoptotique ou nécrotique, les plaquettes activées et un endothélium endommagé sont des exemples d'initiateurs de l'activation du complément. Mais, à l'inverse, qu'arrive-t-il lorsque le complément est activé de manière excessive dans le processus de ces maladies ? Par quels mécanismes le complément participe-t-il à l'avènement des effets délétères dans les syndromes coronariens aigus ?

La présente section consistera à décrire l'implication d'une activation du complément dans l'avènement des effets délétères rencontrés dans les maladies coronariennes et les dommages de reperfusion qui en découlent.

4.1 Activation du complément dans les maladies coronariennes

Les associations entre l'activation du complément et les maladies coronariennes sont nombreuses. Beaucoup d'études, fondamentales pré-cliniques et cliniques, ont démontré l'évidence d'une activation du complément à l'intérieur des parois artérielles athérosclérotiques, dans les sections infarctées du myocarde et suite aux interventions de reperfusion (angioplastie, pontage aorto-coronarien).

Dans une revue publiée en 2006 [10], nous avons résumé les avancées médicales impliquant la régulation de la cascade du complément dans ces types d'événements coronariens. Bien que notre revue ait été rédigée il y a peu de temps, la comparaison entre cette dernière et l'ouvrage actuel illustre bien la croissance exponentielle des recherches sur l'implication du complément dans ce type de maladie inflammatoire.

La plupart des études disponibles révèlent l'existence d'une activation complète, ou partielle, du complément dans les pathologies ciblées. Cependant, encore très peu d'études

décrivent les mécanismes par lesquels le complément contribue à la progression des maladies coronariennes.

La section qui suit offre une vue d'ensemble de l'implication du complément dans les maladies coronariennes. Elle consiste à décrire les évidences d'une activation excessive potentiellement néfaste du complément dans trois contextes physiopathologiques différents : l'athérosclérose, les SCA et les interventions médicales de reperfusion (angioplastie, PAC). Les effets engendrés par l'implication du complément sur diverses fonctions de cellules impliqués dans ces processus seront également discutés en détail.

4.1.1 Activation du complément dans l'athérosclérose

Depuis près de vingt-cinq ans, plusieurs recherches ont démontré que beaucoup de composantes activées, de protéines régulatrices et de récepteurs du complément sont détectés au sein des lésions athérosclérotiques [182, 263, 264]. Par exemple, les récepteurs des anaphylatoxines C3a et C5a qui sont exprimés à la surface de plusieurs types cellulaires (cellules endothéliales, macrophages, lymphocytes T, cellules musculaires lisses) présents dans la plaque athérosclérotique contribuent à augmenter l'instabilité de la plaque et à engendrer sa rupture et l'avènement de SCA [258]. Les effets des produits d'activation C3a et C5a sont très diversifiés : ces anaphylatoxines sont impliquées dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la vasoconstriction, la chimiotaxie et l'activation des cellules inflammatoires [85].

La découverte des mécanismes par lesquels les anaphylatoxines produisent une multitude d'effets pro-inflammatoires ne cesse de croître. Ainsi, des études publiées dans les deux dernières années démontrent que le C5a induit l'expression de PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) par les macrophages en circulation ou présents dans la plaque athérosclérotique. Ce processus, qui se fait via l'activation de NF-kB dans les macrophages, favorise la déstabilisation de la plaque athérosclérotique et même la stabilisation du thrombus, puisque le PAI-1 inhibe la formation de la plasmine [265, 266].

Il existe également une corrélation entre la présence d'athérosclérose et le dépôt de C5b-9 [12, 267]. La régulation de l'activation du complément au sein de l'artère lésée n'est

pas uniforme à l'intérieur de l'intima. Nous avons vu précédemment que les LDL enzymatiquement modifiés participent à la progression de la plaque athérosclérotique. Ces E-LDL sont retrouvés dans la couche musculo-élastique profonde de l'intima (la couche qui est plus près de la média). Or, des études ont démontré que le C5b-9 et la properdine, protéine régulatrice positive de la C3 convertase alterne, colocalisent dans cette couche de l'intima. Si l'on extrapole nos connaissances, il serait logique d'avancer que, puisque les E-LDL activent le complément par la voie alterne, ces lipoprotéines auraient un rôle actif dans l'activation du complément dans la couche profonde de l'intima [268]. Au niveau de la couche superficielle riche en protéoglycans (près des cellules endothéliales et de la lumière des vaisseaux), ce sont plutôt les protéines régulatrices telles le facteur H et le C4BP qui ont été détectées [269, 270].

D'autres protéines régulatrices qui agissent à différents stades de la cascade ont aussi été retrouvées à l'intérieur de l'intima de l'artère endommagée par la plaque en progression. La vitronectine [271], la clusterine [272] et beaucoup de protéines régulatrices ont été retrouvées au site de la lésion athérosclérotique ou en circulation dans le plasma [273-276].

Évidemment, les différentes cellules sécrétrices du complément impliquées dans le développement de la plaque n'expriment pas toutes les protéines régulatrices au même niveau. Par exemple, les cellules musculaires lisses (CML) n'expriment qu'une quantité limitée de protéines régulatrices du complément. Cette caractéristique suggère que ces cellules sont une des premières cibles potentielles pour une attaque par le complément, puisque la présence de C5b-9 est remarquée sur les CML dans les lésions athérosclérotiques précoces [277]. De manière intéressante, il semble y avoir de plus en plus d'évidences qui montrent que la présence de C5b-9 à la membrane de CML entraîne une suite d'événements important dans le développement de la plaque athérosclérotique, tels la prolifération de ces CML et leur expression de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion [278, 279]. Dans les lésions athérosclérotiques plus avancées, les macrophages engorgés de cholestérol subissent une apoptose et parfois même une nécrose.

Ce phénomène serait peut-être à l'origine de la présence accrue de C5b-9 sur les membranes des macrophages dans ces lésions plus tardives [280]. L'énumération de ces quelques observations laisse voir la capacité du complément à faire progresser la plaque athérosclérotique vers des complications aiguës, tels les SCA.

4.1.2 Activation du complément dans les dommages de reperfusion

L'importance de l'implication du complément dans l'augmentation des dommages de reperfusion, que ce soit dans les infarctus du myocarde, les angioplasties primaires ou les pontages coronariens, a été démontrée dans plusieurs études au cours des dernières années [281]. Les études démontrent que l'initiation de l'activation du complément varie dépendamment des contextes de reperfusion. Ainsi, une activation du complément suivant une reperfusion lors d'un pontage aorto-coronarien différera de l'initiation de l'activation du complément observée lors d'angioplasties ou d'un infarctus du myocarde, par exemple. La participation relative de chacune des voies varie d'un état physiopathologique à l'autre.

Globalement, beaucoup d'études révèlent que de multiples protéines, ARNm et gènes des protéines du complément (principalement C5 à C9), sont remarqués dans les zones infarctées engendrées par l'ischémie. Ces protéines activées sont colocalisées avec les marqueurs inflammatoires classiques (CRP) mesurés en situation de maladies coronariennes aiguës. Ces études démontrent que ces corrélations sont reproductibles jusqu'à cinq (5) jours [257]. Yasuda *et al.* [282], 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, 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 CTC. Paradoxalement, une étude distincte a démontré la présence de niveaux élevés de CTC associés avec des niveaux élevés de CRP chez des patients avec angine instable [283].

Fait intéressant mais encore obscur, l'ischémie d'une section du coeur et la reperfusion du tissu engendrent des effets différents sur l'activation du complément. Alors que le processus par lequel le complément engendre ses effets dans le myocarde en condition d'ischémie est relativement lent (heures) [275], le processus de reperfusion entraîne une augmentation rapide de l'activation du complément (minutes) [284]. Or, malgré ces délais, la formation de C5b-9 est démontrée aussi bien en ischémie qu'en reperfusion [275].

Bien que l'activation du complément soit utile dans l'élimination des cellules et débris apoptotiques et /ou nécrotiques fabriqués par les dommages ischémiques, il n'en demeure pas moins que le complexe terminal C5b-9 peut induire lui-même l'apoptose ou la nécrose des cellules du myocarde [285]. De plus, tel que décrit précédemment, le complexe terminal peut engendrer des dommages tissulaires par d'autres mécanismes indépendants à sa capacité lytique. Ainsi, en augmentant l'expression de molécules d'adhésion ou la production locale de cytokines, le C5b-9 peut causer des dommages important au myocarde [286, 287]. L'anaphylatoxine C5a contribue elle aussi à favoriser l'infiltration des cellules inflammatoires au site des dommages. Grâce à ses propriétés chimiotactiques, le C5a favorise la chimiotaxie des neutrophiles et induit la production d'agents oxydatifs [288].

En chirurgie cardiaque (PAC), davantage de mécanismes sont susceptibles d'engendrer une activation excessive du complément. Tout comme dans les infarctus ou les angioplasties, les PAC sont associés avec des dommages de reperfusion relatifs à une inflammation qui entraîne une activation excessive du complément dans le myocarde. Or, en plus de cette inflammation *in vivo*, une réponse inflammatoire systémique est engendrée lors de circulation extracorporelle [289].

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 [289]. L'héparine et

le matériel chirurgical employé qui est recouvert d'héparine réduisent cette activation du complément. Cependant, l'administration de la protamine 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 classique [9].

4.1.3 Complément et facteurs de risques des maladies cardiovasculaires

Certains facteurs de risque des maladies cardiovasculaires peuvent avoir un effet direct sur l'activation du complément et ainsi favoriser la mise en place des mécanismes qui contribuent à ses effets délétères dans la progression de la maladie. Le tabagisme, le diabète et la dyslipidémie, qui inclut l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie et les faibles niveaux de HDL, sont les deux principaux facteurs jusqu'à maintenant associés à une activation excessive du complément.

4.1.3.1 Le tabagisme

Le tabagisme est l'un des facteurs de risque majeur qui contribue à l'avènement de l'inflammation et de la maladie vasculaire [282, 283]. Il a été démontré que la fumée de cigarette induit la production plasmatique d'anaphylatoxines C3a et C5a et modifie la protéine C3, induisant ainsi l'activation du complément par la voie alterne [290, 291]. De plus, il est connu que, *in vitro*, la cigarette induit de multiples effets aux cellules endothéliales. Parmi ces effets on dénote l'induction de l'apoptose, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*), de l'adhésion des leucocytes et de l'inflammation [292-294]. Or, puisque l'on savait que plusieurs récepteurs du complément sont présents à la surface des cellules endothéliales [295], le groupe de Yin a tenté de déterminer si le complément pouvait être relié aux effets néfastes de la cigarette sur les cellules endothéliales [296]. Étonnamment, ce groupe a découvert que le tabagisme augmentait le dépôt de C4 à la surface des cellules endothéliales, mais n'affectait pas la production de peptides activés, probablement à cause de la production de protéines régulatrices du complément par l'endothélium vasculaire.

4.1.3.2 Dyslipidémie et diabète de type II

La dyslipidémie, qui inclue l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie et les faibles niveaux de HDL, compte aussi parmi les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Une étude publiée au début de la décennie dévoile que l'activation du complément est associée avec une grande variété de maladies lipidiques, et plus particulièrement avec les dyslipidémies associées à une dysfonction endothéliale ou à un mauvais fonctionnement du système fibrinolytique (hypertriglycéridémie) [297].

En 2005, une étude a fait état pour la première fois qu'une augmentation de la protéine C3 était, tout comme l'augmentation d'autres protéines inflammatoires (haptoglobine, fibrinogène) ou tout comme un indice de masse corporel (IMC) élevé, associée avec le risque de développer du diabète de type 2, un facteur de risque important de l'athérosclérose [298]. Les syndromes métaboliques, autrefois appelés «syndromes de résistance à l'insuline», sont une cause importante du diabète de type 2 et sont maintenant étroitement associés avec le risque de développer un SCA [299]. En 2007, une étude de Van Oostrom à laquelle participait une équipe montréalaise (Alan D. Sniderman, Université McGill) a démontré que la protéine C3 semblait être un bon marqueur dans l'identification des patients atteints d'un syndrome métabolique [300]. Ces résultats abondent dans le même sens que des résultats précédents montrant une association positive entre les niveaux élevés de C3 et l'obésité ou les niveaux de triglycérides postprandiaux [301]. Une des raisons qui pourrait expliquer ces augmentations proportionnelles réside peut-être dans le fait que les adipocytes (cellules présentes dans les tissus adipeux) peuvent produire la protéine C3 et que les chylomicrons (lipoprotéines qui se forment lors de la période de digestion, principalement par les entérocytes) sont à l'origine de cette production [296, 297].

Une étude récente a révélé qu'une hypercholestérolémie sévère est associée avec une augmentation plasmatique du C3 et de son peptide, le C3a. La conclusion de cette étude suggère qu'une augmentation des niveaux de C3 et C3a favorise la prolifération des

cellules de la néointima et contribue ainsi au développement de la plaque d'athérome chez les patients avec hypercholestérolémie familiale [302].

Aujourd'hui, les cliniciens portent un intérêt particulier aux effets d'une diminution de HDL en condition pathologique. Des niveaux de HDL bas sont corrélés avec une fréquence plus élevée de maladies cardiovasculaires [303]. Depuis quelques années, des équipes de recherche se sont lancées à la découverte des effets pléiotropiques des HDL. Or, hormis leur capacité à transporter le cholestérol des organes et tissus vers le foie, ces lipoprotéines auraient aussi pour fonction de réguler l'activation du complément [304]. En effet, plusieurs études réalisées en protéomiques ont permis de découvrir une association entre le HDL et certaines composantes du complément, plus particulièrement les protéines permettant sa régulation (C1 inhibiteur et facteur H [305] ; clusterine et vitronectine [306]).

4.1.4 Effet sur les fonctions plaquettaires

Nous avons décrit dans le chapitre 3 que les plaquettes et les microparticules plaquettaires pouvaient activer le complément, et ce par plusieurs mécanismes. Avant même que l'on découvre que les plaquettes elles-mêmes pouvaient activer le complément, plusieurs recherches avaient démontré que l'activation du complément pouvait engendrer l'activation des plaquettes. Depuis la fin des années 1980, beaucoup de recherches ont été effectuées sur les effets d'une activation du complément sur les activités plaquettaires. Sims et ses collègues figuraient parmi les pionniers dans ce domaine.

4.1.4.1 Activité pro-coagulante

Tel que nous l'avons vu dans le second chapitre de cette thèse, le complexe terminal du complément peut non seulement s'insérer dans les membranes des cellules et y engendrer la lyse, mais il peut aussi initier l'activation d'une grande variété de cascades intracellulaires pour ainsi engendrer diverses activités cellulaires. L'équipe de Sims a démontré que, au niveau des plaquettes sanguines, le C5b-9 induit une activité de sécrétion par les granules α et β de même que l'augmentation de sites de liaison pour le facteur Va

(«a» pour «activé») de la coagulation, qui agit comme cofacteur avec le facteur Xa pour convertir la prothrombine en thrombine [183, 307]. Évidemment, ces événements engendrés par la liaison du C5b-9 aux plaquettes, entraînent l'assemblage et l'activation du complexe enzymatique de la pro-thrombinase, ce qui conduit alors à une augmentation de l'activité pro-coagulante des plaquettes.

4.1.4.2 Agrégats plaquettes/leucocytes

La properdine peut être produite par les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes T et par les cellules endothéliales suite à une stimulation par des cytokines spécifiques ou une force de cisaillement appropriée [218, 308]. La properdine est, comme plusieurs composantes activées du complément, présente au site de la lésion athérosclérotique [270]. Tel que nous l'avons survolé dans le chapitre décrivant les mécanismes de déstabilisation de la plaque et de formation du thrombus, les leucocytes et les plaquettes jouent un rôle à plusieurs niveaux dans la progression de l'athérosclérose et l'avènement des SCA. De plus, les agrégats plaquettes/leucocytes sont détectables dans le sang des patients avec angine instable, accident vasculaire-cérébral et suivant une angioplastie coronarienne [309-312]. Jusqu'à tout récemment, l'hypothèse qui expliquait ce mécanisme stipulait que le roulement des leucocytes sur les plaquettes se faisait par la P-sélectine et que l'adhésion entre les deux types de cellules se faisait par le ligand CD11b/CD18 des leucocytes sur les plaquettes [313, 314]. Or, malgré ces données, nous n'avons que très peu d'informations disponibles concernant les mécanismes d'activation directe des leucocytes qui favoriseraient cette interaction plaquettes/leucocytes. Des résultats récents indiquent que, étonnamment, la properdine n'active pas les plaquettes (aucune augmentation de la P-sélectine) mais favorise plutôt une activation des leucocytes [315] (augmentation de l'expression de CD11b). Subséquemment, il s'en suit une augmentation de la quantité d'agrégats plaquettes/leucocytes.

4.1.4.3 Formation de PMP pro-coagulantes

Nous avons décrit dans le chapitre 2 (section 2.3.5.4.1) que l'un des mécanismes de protection des cellules contre la lyse cellulaire était la formation de vésicules membranaires [309-311]. Les plaquettes sont un exemple de type cellulaire qui emploie ce genre de protection [316]. Ces vésicules membranaires ainsi formées, aussi appelées microparticules, sont très riches en C5b-9. À la fin des années 1980, Sims s'est intéressé à la composition et la fonction des microparticules plaquettaires exposées au complexe C5b-9 [317]. Il a alors constaté que les microparticules plaquettaires formées par la présence de C5b-9 à la surface des plaquettes consistaient en un site de liaison principal pour le facteur V de la coagulation et ainsi la surface catalytique principale du complexe prothrombinase. Il souligne aussi que ce phénomène est applicable aux microparticules plaquettaires, mais non aux plaquettes elles-mêmes. Sims a extrapolé ces conclusions, de l'*in vitro* à l'*in vivo* : il suggère que les microparticules plaquettaires formées suite à l'activation du complément pourraient faciliter l'assemblage et la dissémination des complexes enzymatiques pro-coagulants. Cette découverte ne fut pas sans conséquences : il y a très peu de temps, un article démontrait que les microparticules plaquettaires possèdent une activité pro-coagulante de l'ordre de 50 à 100 fois plus élevée que celle des plaquettes activées [188]. Nous verrons dans une section ultérieure que le C5b-9 engendre des effets homologues dans la formation des microparticules de cellules endothéliales [318] : les cellules endothéliales avec des complexes C5b-9 sur leur membrane forment aussi des vésicules (microparticules) dont la surface est propice à l'assemblage du complexe pro-thrombinase.

4.1.4.4 PMP : transporteurs du complément

Bien que l'implication du C5b-9 dans la formation des microparticules plaquettaires ait commencé à gagner en intérêt il y a plus de 20 ans, c'est seulement depuis peu que l'on a démontré l'évidence que les microparticules exposent à leurs surfaces des composantes et des protéines régulatrices du complément. Dans une étude conduite en 2007 sur des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (AR), il a été démontré pour la première fois non seulement

que les microparticules (présentes dans la liquide synovial) portent à leurs surfaces certaines protéines du complément (C1q, C4 et C3), mais aussi que cette caractéristique est corrélée avec la présence de certaines molécules aptes à initier l'activation du complément, telles les IgG, les IgM (patients avec AR) et la CRP (donneurs sains) [317]. Cette étude selon laquelle les microparticules activent le complément par la voie classique, suggère aussi que les microparticules pourraient produire leurs effets pro-apoptotiques et pro-inflammatoires via les protéines activées du complément.

Depuis les études de Biro et ses collaborateurs, d'autres équipes ont tenté d'aborder cette thématique. Yin et ses collaborateurs se sont basés sur l'évidence que les microparticules plaquettaires et le système du complément avaient tous deux des activités pro-coagulantes, pro-inflammatoires et pro-athérogéniques pour tenter de déterminer si une activation du complément avait lieu à la surface des PMP [195]. Ils ont publié en 2008 que les PMP générées à partir de l'incubation des plaquettes avec le ionophore calcique A23187 exprimaient certaines composantes activées du complément. Leurs résultats suggèrent que les PMP pourraient agir à titre de transporteurs du complément aux sites des lésions vasculaires, ce qui se traduirait par une inflammation dirigée par les composantes activées du complément au site de la rupture de la plaque athérosclérotique [267, 319].

4.1.5 C5b-9 : au-delà de la lyse cellulaire

Lorsqu'il est présent en grande concentration à la surface des cellules, le CTC peut, par son activité lytique, infliger de nombreux dommages aux cellules, dont une mort cellulaire rapide par nécrose ou apoptose [320, 321]. Par contre, tel que mentionné plus tôt, l'implication du CTC dans le développement des maladies coronariennes va bien au-delà de sa capacité à lyser les membranes des cellules. Lorsqu'il est présent en concentration «non-lytique» (iCTC) à la surface des cellules, il engendre de multiples autres activités. En plus de permettre la production d'une grande variété de cytokines et médiateurs pro-inflammatoires dans le plasma par l'augmentation de l'activité de NF- κ B [321], le iCTC peut engendrer l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules cibles [322],

stimuler la production de métabolites oxygénés actifs par les leucocytes [323], induire l'apoptose [324] et activer le cycle cellulaire dans certains types de cellules [325].

Or, en plus de favoriser des activités qui contribuent à l'augmentation de l'inflammation et à la déstabilisation de la plaque, le iCTC pourrait contribuer à la néovascularisation de la plaque, l'empêchant ainsi de se fissurer [325]. Une étude plutôt récente a souligné que le iCTC était apte à induire l'activation du cycle cellulaire des cellules endothéliales par l'implication de la voie de signalisation intracellulaire PI3K/Akt [326].

Plusieurs études démontrent que le CTC y est aussi souvent co-localisé avec la CRP et les cellules apoptotiques [142, 327, 328]. 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 étaient engendrées lors de l'assemblage du CTC. Ces événements ont pour effet d'augmenter les concentrations d'ARNm et les sécrétions protéiques de l'interleukine-8 (IL-8) et de la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) [329]. 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 athérosclérotique [330]. Finalement, dans une étude faite chez des lapins dont la diète était riche en cholestérol, la présence de CTC dans l'intima corrélait avec une augmentation de la teneur en cholestérol, précédant l'infiltration des monocytes et la formation des CS [331].

4.1.6 Biomarqueurs plasmatiques

Depuis quelques années, on remarque dans la littérature que davantage d'efforts sont mis à trouver des biomarqueurs spécifiques aux maladies coronariennes aiguës. Des publications récentes révèlent que certaines protéines non activées du complément pourraient prédire des troubles relatifs à l'athérosclérose. Bien qu'elles soient majoritairement produites par le foie, nous avons vu que certaines composantes du complément peuvent aussi être synthétisées par un grand nombre de cellules qui participent

à la progression de l'athérosclérose et des syndromes qui en découlent (les macrophages, les plaquettes, cellules endothéliales, les adipocytes et les cellules musculaires lisses). Deux études indépendantes publiées en 2007 énoncent que des niveaux élevés en C4 prédisent les événements cardiovasculaires, tels les accidents vasculaires cérébraux [331, 332].

Depuis quelques années, la CRP est reconnue comme étant un marqueur inflammatoire systémique. Or, une étude publiée en 2008 s'est intéressée à comparer les associations entre les cas d'infarctus du myocarde (ou les facteurs de risques de SCA) et les niveaux de CRP et de C3, respectivement [332]. Ces analyses ont été faites chez des hommes âgés de 65 ans et plus qui ont subi un infarctus du myocarde au préalable. Les résultats de l'étude ont démontré que les niveaux de C3 étaient associés aux infarctus du myocarde, et ce indépendamment de la présence des facteurs de risques associés ou des niveaux élevés de CRP ou de fibrinogène. La présence de la CRP quant à elle était dépendante des autres facteurs. Ces données suggèrent que le C3 serait un meilleur marqueur que la CRP pour décrire un état inflammatoire relatif aux infarctus aigus du myocarde.

4.1.7 Les multiples interactions cellules endothéliales/complément

Nous avons pu constater dans une des sections précédentes que l'endothélium vasculaire peut produire une grande variété de composantes et récepteurs du complément, de même que divers récepteurs et protéines régulatrices. Le tableau III fait une synthèse des composantes de la cascade du complément et des protéines régulatrices qui peuvent être produites par les cellules endothéliales à l'état de repos, ou encore suite à une stimulation spécifique reflétant un état physiopathologique précis.

	Composantes de la cascade du complément	Protéines régulatrices du complément
<u>Cellules au repos</u>	C1r, C1s, C2, mRNA pour C1qA, C1qC [333] C3 [334, 335] C5, C6, C7, C8, C9 [336-338]	C1-inhibiteur [333] facteur H [346] CD59 [347] facteur I [348] Vitronectine and clusterine [349, 350] CD55, CD46, CD59, CD35 [351]
<u>Cellules traitées avec :</u> <i>CTC</i>		
<i>IFN-γ</i>	↑ C3, facteur B [339] ↓ C7 [338] ↑ C4, facteur B [340]	↑ CD55 [352] ↑ facteur H, ↑ facteur I [348] ↑ C1-inhibiteur [340] ↑ CD55 [352]
<i>IL-1</i>	↑ C3 [339, 341]	↓ facteur H [339] ↑ Vitronectine, ↑ clusterine [349, 350]
<i>TNF-α</i>	↑ C3 [334, 342]	↑ facteur I [348] ↑ Vitronectine, ↑ clusterine [349, 350] ↑ CD55, [352]
<i>CRP*</i>		↑ CD55, ↑CD46, ↑CD59 [151]
<i>IL-6</i>	↑ C3 [342]	
<i>Facteur de croissance (bFGF, VEGF)</i>		↑ CD55 [353]
<i>Thrombine/histamine</i>		↑ CD55 [354]
<i>Statines</i>		↑ CD59 [47]
<u>Cellules exposés à des conditions d'hypoxie/réoxygénation</u>	↑ C1q, C3c, C3d, C4, C5, C9 [343] ↑ déposition de C3 classique-dépendant [344] ↑ déposition de C3 lectine-dépendant [345]	↑ CD55, ↑CD46, ↑CD59 [343] ↑ CD35 [169]

Tableau III. Production des composantes du complément par l'endothélium vasculaire dans différentes conditions physiopathologiques

*Cette étude a été critiquée par Van den Berg [355] qui stipule que la capacité de la CRP à induire l'expression de protéines régulatrices du complément par l'endothélium vasculaire était due non pas à la CRP elle-même, mais plutôt à l'azide de sodium contenu dans la solution.

L'implication du complément dans l'apparition des dommages causés à l'endothélium réside de manière importante dans la capacité du complément à interagir avec les différents systèmes sanguins, comme le système de la coagulation et le système des kinines [356, 357]. Le tableau IV résume les différents effets fonctionnels d'une activation du complément sur l'activité des cellules endothéliales.

Effets fonctionnels	C1q	C5a	CTC
Expression des molécules d'adhésion	↑ ELAM-1 ↑ ICAM-1 ↑ VCAM-1 [358]	↑ P-sélectine ↑ vWF [287] ↑ E-sélectine ↑ ICAM-1 ↑ VCAM-1 [286]	↑ ELAM-1 ↑ VCAM-1 [359] ↑ P-sélectine [360] ↑ VCAM-1 [322]
Mobilisation des leucocytes		↑ de l'adhésion PMN/EC [287] ↑ extravasation des leucocytes [361]	↑ extravasation des leucocytes [361, 362]
Production de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance	↑ IL-1 ↑ IL-8 ↑ IL-6 ↑ MCP-1 [363]	↑ IL-1 ↑ IL-6 ↑ TNF-α ↑ IL-8 ↑ RANTES ↑ MIP-1α ↑ MIP-1β [364]	↑ IL-1 ↑ IL-8 ↑ MCP-1 [324, 365] ↑ bFGF ↑ PDGF [366, 367] ↑ expression du gène RANTES [368]
Coagulation		↑ Gene expression for IL-6, VEGFC, IL-18R [286] ↑ vWF [287] ↑ Heparan sulphate [369] ↑ FT [370]	↑ FT [322] ↑ adhesion et activation du plasminogène [371] ↑ complexe Prothrombinase [318] ↑ PAF [372]

Tableau IV. Activation des cellules endothéliales par le complément et/ou le complément activé.

CHAPITRE 5

5 RÉSULTATS

5.1 Objectif général de la thèse

L'objectif général de ma thèse consistait à caractériser les rôles physiopathologiques du complément dans le syndrome coronarien aigu dans le but ultime de trouver des cibles thérapeutiques qui permettront le développement de nouvelles approches pour le traitement de ces pathologies. Les éléments qui ont constitué la ligne directrice de mes travaux avaient été pré-établis dans un ordre logique et chronologique précis. Les lignes directrices de ces investigations, qui ont fait l'objet d'un total de quatre articles en préparation ou soumis pour publication, sont énumérées dans les sections suivantes (5.2 à 5.5).

Les diverses conclusions apportées par nos investigations ont soulevé de nombreuses hypothèses de travail. Par conséquent, les conclusions obtenues nous ont amenés à nous intéresser à mieux connaître les mécanismes précis impliqués dans les interactions entre la thrombose et l'inflammation, le tout par l'entremise de l'activation du complément. Les travaux que j'ai amorcés suite à de multiples mises-au-point techniques, visaient principalement à expliquer le rôle du complément dans l'interaction inflammation-thrombose et dans les maladies coronariennes aiguës. Un des éléments étudiés dont j'élaborerai les détails dans le chapitre 6 (Discussion) est l'effet de la thrombospondine-1, protéine sécrétée lors de l'activation des plaquettes, sur la formation et la stabilisation des convertases de la voie alterne.

Je désire aussi préciser que de nombreuses mises au point préalables ont été nécessaires avant et pendant ces études, Il s'avère important de prendre conscience que, puisque j'étais la «pionnière» du complément dans mon laboratoire, j'ai dû faire l'élaboration complète de bons nombres de protocoles par moi-même. Ce travail fut très laborieux et j'en suis fière comme reconnaissante, puisqu'il m'a permis de mettre au point des techniques potentialisées de même qu'économiques, qui donneront la possibilité à mes

«successeurs» de poursuivre plus efficacement la quête des connaissances sur les interactions thrombose-complément-inflammation.

5.2 Présentation de l'article #1

Ce premier article introduit l'étude des mécanismes d'activation du complément entraînant son activation excessive dans les phases chroniques et aiguës de la maladie coronarienne. Bien que, comme nous l'avons vu, la littérature décrivant les évidences d'une activation du complément dans la progression de l'athérosclérose et l'avènement de complications aiguës abonde, très peu d'études ont démontré les nuances existant quant aux voies empruntées par le complément pour aboutir à une activation excessive dans les divers types de pathologies coronariennes. Beaucoup d'études, fondamentales et cliniques, ont été menées dans le but de diminuer l'inflammation relative aux complications de l'athérosclérose et des SCA en utilisant entre autre des peptides potentialisant l'expression d'agents anti-inflammatoires ou des anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines inflammatoires. Malheureusement, leur succès fut limité. Dans la présente étude, nous proposons de mieux connaître l'implication de chacune des voies du complément dans la maladie coronarienne chronique et aiguë et son mécanisme d'action en condition pathologique. Nous avons mesuré les niveaux *in vivo* de CRP, protéine de phase aiguë apte à initier la cascade du complément, de MBL et des composantes activées du complément spécifiques à chacune des voies d'activation dans le sérum de sujets atteints de maladie coronarienne chronique ou aiguë. En plus de ces tests de détection sériques, nous avons entrepris des études *in vitro* qui visaient à caractériser le rôle de chacune des voies du complément dans l'activation, la lyse et l'apoptose des cellules endothéliales (HUVEC). Pour ce faire, nous avons incubé le sérum des patients sur une monocouche de cellules endothéliales durant 72 heures. Nous avons par la suite analysé l'activité de chacune des voies en mesurant les niveaux de leurs composantes spécifiques et en attestant la présence d'une activation de la voie terminale du complément, que ce soit sous sa forme soluble ou membranaire à la surface des cellules elles-mêmes ou à la surface des fragments cellulaires. Par la suite, nous avons mesuré l'apoptose des cellules HUVEC par différentes méthodes. Les analyses ont été effectués en microscopie (fluorescence) puis en cytométrie soit dans le

surnageant de culture ou après avoir minutieusement détaché les cellules adhérentes. La mise en place de ces tests allait nous permettre de mieux comprendre les effets des différentes voies du complément dans la destruction des cellules endothéliales, phénomène largement impliqué dans l'occlusion des artères coronaires.

Ces analyses nous ont permis de constater la mise en place de mécanismes de protection contre la lyse cellulaire dans l'angine stable et le rôle potentiel de la voie alterne dans la lyse et l'apoptose cellulaire et conséquemment dans la transition d'une plaque athérosclérotique relativement stable vers une plaque plus vulnérable.

Dans cette étude, nous avons soulevé que :

- Il y a une activation excessive du complément et de l'inflammation systémique qui varie selon la physiopathologie de la maladie.
- Étonnamment, l'angine stable se traduit par des niveaux sériques bas de MBL
- L'activation terminale du complément dans l'angine stable résulte en la mise en place de mécanismes de protection contre un taux d'insertion excessif du C5b-9 dans les membranes cellulaires (formation de la forme soluble du complexe terminal, sC5b-9).
- L'infarctus du myocarde est associé à une activation de la voie alterne du complément qui résulte en la lyse et l'apoptose cellulaire.

Participation des différents auteurs de la publication N°1 :

CM : Mise au point des méthodes, conceptualisation du projet, validation des méthodes, expériences, stratégies expérimentales, analyse des résultats et écriture de l'article

JR : Expériences

MG : Expériences, stratégies expérimentales

BL : Consultations scientifiques

AB : Consultations scientifiques

PT : Conceptualisation du projet, analyse des résultats et écriture de l'article

Article en préparation

A study on the implications of the complement system in various
manifestations of coronary artery disease

Catherine Martel, MSc; Jacinthe Rivard; Marta Ghitescu, BSc; Benoit Labarthe, PharmD,
PhD ; Arnaud Bonnefoy, PhD; Pierre Thérroux, MD

Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Catherine Martel was supported by a Doctoral Research Award from the Canadian
Institutes of Health Research (CIHR)

Address correspondence to Pierre Thérroux, 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

Background. The complement system is a key mediator of the inflammatory response and is known to play a role in coronary artery disease (CAD), and especially in acute coronary syndromes (ACS). However, the specific potential role of each activation in pathway in the stable-to-vulnerable plaque transition is still under investigation and largely unknown.

Methods. The study included a total of 147 patients distributed as ST-elevation myocardial infarction (STEMI) (n=45), non-ST-elevation myocardial infarction (NSTEMI) (n=64), stable angina (n=18), and a control group of normal healthy volunteers (n=20). Complement activation was assessed both in serum *ex vivo* or in the supernatant of endothelial cells (HUVEC) incubated with the serum.

Results. Direct *ex vivo* measures in serum showed lower mannan binding lectin (MBL) levels (p=0.073, overall) and a 2.3-fold higher level of sC5b-9 in patients with stable angina than in healthy subjects (p<0.0001) STEMI (p<0.0001) and NSTEMI (p=0.002). In patients with myocardial infarction, serum levels of Bb strongly correlated with C5a and sC5b-9 in both STEMI and NSTEMI (C5a, p<0.0001 for both ; sC5b-9, p<0.0001 and p=0.004, respectively). sC5b9 levels were higher in the latter than the former (p=0.03). Endothelial cells studies revealed a 2.2 fold increase in C5b-9 expression in patients CAD compared with healthy subjects (p=0.003 for all categories); this expression also correlated with late apoptosis levels (p<0.0001).

Conclusions. Low MBL levels and protection against cell lysis appears to be associated with stable angina, while the activation of the alternative pathway resulting in cell lysis and apoptosis is associated with myocardial infarction. We suggest that specific inhibition of the alternative pathway might be a good therapeutic target in preventing ACS.

Key words: Complement, Inflammation, Membrane attack complex, Acute coronary syndrome, Stable Angina.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is the consequence of chronic inflammatory response in vessel walls. Whereas risk factors can be successfully managed to reduce the inflammatory load, the inflammation process is not currently a direct therapeutic target. Such interventions could help control the high mortality and morbidity rates still associated with the disease.

The complement has been traditionally conceived as a critical part of the innate immune system, but more recent research has documented its ability to activate cells involved in both the adaptive and innate immune response to modulate a variety of immune activities and act as a linker between the innate and adaptive immunity. In addition, the complement system maintains cell homeostasis in eliminating cellular debris and immune complexes.

Although its role in atherosclerosis has also been well documented [1], the specific roles of the different pathways are less well known. Concomitantly, new drugs targeting specific complement activity have been developed [2].

In this study, we sought to define the relative roles of complement proteins in various manifestation of coronary artery disease, specifically determine the ability of each complement pathway to produce endothelial cell lysis and cell apoptosis.

METHODS

Study design and patients

A total of 147 individuals were studied, including 20 apparently healthy controls and 127 patients, 45 with an acute ST segment elevation MI, 64 with a non-ST segment elevation MI, and 18 with stable chronic angina. The study protocol was reviewed and approved by the Montreal Heart Institute Ethics Committee and all patients provided a written informed consent before the start of the study.

STEMI patients were part of a cohort of patients enrolled in the Assessment of Pexelizumab in Acute Myocardial Infarction (APEX-AMI) trial in which we already reported on the effects of Pexelizumab after 24 hours. These patients had a high-risk

anterior or extended STEMI and were studied within 6 hours of the onset of symptoms. The NSTEMI were studied within 12 hours of onset of symptoms. These patients had an episode of chest pain that lasted for 30 min or more with and an elevation in serial troponin T levels typical of an acute myocardial infarction. The blood samples in these patients with a ST or NSTEMI were obtained at admission before the administration of intravenous drugs. The control individuals were selected from a pool of hospital employees and were not using any drugs. Excluded from all groups were patients with a chronic or evolving infectious, inflammatory, autoimmune or neoplastic disease, or using steroidal or non steroidal anti-inflammatory drugs or hormonal therapy.

Blood sampling

Blood samples were collected from the arterial access site for coronary angiography after the first puncture and from a forearm venipuncture for patients with NSTEMI upon hospital arrival and for stable angina and healthy subjects. A maximum of 50 mL of blood was collected in BDTM red top vacutainer tubes and allowed to clot for up to one hour at room temperature with no anticoagulants. The tubes were then centrifuged at 2500 g for 15 minutes at room temperature. After centrifugation, 1 mL of serum was transferred into cryotubes and stored at -70°C for later analyses.

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Clonetics, SanDiego, Ca, USA, batch CC-2519) were seeded in 75-cm² flasks (Sarstedt Inc. Montreal, Quebec, Can.) and cultured as recommended by the manufacturer at 37°C under 95% air and 5% humidified CO₂ in Endothelial Growth Media bullet kit (EGM-2 bullet kit, LONZA, Walkersville, MD) containing Endothelial Basal Medium (EBM-2, LONZA) and 2% foetal bovine serum (FBS) supplemented with EGM-2 SingleQuots (LONZA). Confluent HUVECs were then washed with phosphate-buffered saline (PBS), detached with a Trypsin/EDTA solution (LONZA), neutralized with Trypsin Neutralizing Solution (LONZA) and washed again

with PBS. A total of 2500 cells/cm² suspended in EGM-2 medium were then plated in 35 mm dishes. When confluence was reached after 12 to 14 hours, the EGM-2 medium was replaced by an EBM-2 medium supplemented with 20% of filtered patients' serum. All experiments were performed using HUVECs at passages 3 to 5.

After an incubation period of 72 hours, the supernatants of the cell cultures were collected, the adherent HUVECs detached with a trypsin/EDTA solution and kept on ice until centrifugation. The cells in supernatants and the trypsinized cells were washed separately at 4°C with PBS, centrifuged at 200g for 5 minutes at 4°C, pooled, washed with PBS and centrifuged a second time. The cell-free supernatants from each well were aliquoted in cryotubes and frozen at -70°C for later analysis of complement activity and cytokines production.

Study parameters

Inflammatory activity. Serum CRP levels were measured by immunonephelometry (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany).

Complement activation. *In vivo* complement activation and endothelial cell-mediated complement activation were assessed by measuring the levels of C3a, C4a, C5a, sC5b-9, Bb and MBL in the serum and the HUVECs supernatants. The anaphylatoxins C3a, C4a and C5a were measured by a particle-based immunoassay (BDTMCytometric Bead Array (CBA)). With this approach, samples are incubated for 2 hours with beads coated with a mixture of capture antibodies specific for C3a, C4a or C5a plasma proteins and their desArg forms (C3adesArg, C4adesArg, C5adesArg) to form sandwich complexes. The complexes are then washed, incubated for 1 hour with the phycoerythrin-conjugated detection antibodies and detected by measuring the fluorescence intensity at 575 nm on a Coulter EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter, FL) equipped with an argon laser at 488 nm wavelength.

Commercially available solid phase sandwich ELISA tests were used to determine the levels of the complement proteins sC5b-9 and Bb (Quidel, San Diego, California). MBL levels were measured with a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (MBL Oligomer ELISA kit, KIT 029, AntibodyShop, Denmark). The formation of C5b-9 on the surface of HUVECs was detected by flow-cytometry using a monoclonal mouse anti-human C5b-9 (clone aE11, Dako, Mississauga, Ontario, Can.) specific for a neoepitope on the poly C9 complement factor. This neoepitope is exposed in the solid- and in the fluid-phase of the terminal complement complex, but not on native C9 [3]. The antibody was added to $0.5-1 \times 10^6$ cells/mL and incubated for 30 minutes at room temperature in phosphate buffer containing 1% bovine serum albumine (BSA), 0.1% Tween 20 and 1% goat serum (all from Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, Ont., Canada). The cells were then washed and centrifuged at 500g during 10 minutes. A polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin R-phycoerythrin (Dako) diluted at 1:1000 was added to 50 μ l cell suspensions, incubated for 30 minutes at room temperature and analyzed by flow cytometry. Cells were first selected according to their size and granularity (side and forward scatters) (Figure 1). Particles delimited by gate 1 (G1) were considered intact cells while particles in gate 2 (G2) were considered apoptotic bodies and other cell fragments [4]. Results were expressed as the percentage of cells positive for C5b-9.

Methodological Aspects of Apoptosis Detection

Apoptotic HUVECs were identified by three different ways following the incubation period of 72 hours with the patients' sera.

1. Membrane asymmetry. After washing twice with PBS, 1×10^5 to 1×10^6 cells were suspended in 100 μ L of Annexin-V Binding Buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4), 2.5 μ L of FITC-Annexin V (20 μ g/mL in aqueous buffered solution containing BSA and 0.09% sodium azide) and 5 μ L of propidium iodide (PI) (50 μ g/mL in PBS, pH 7.4) (PharMingen, Becton Dickinson, SanDiego, CA, USA). This mixture was

incubated for 15 minutes in the dark at room temperature and 500 μ L of binding buffer was then added for flow cytometry analysis. Cell debris were excluded by setting an appropriate threshold trigger. For each sample, 3000 cells were analyzed. An Annexin-V-positive and PI-negative signal identified early apoptotic cells, representing a stage of apoptosis not otherwise detected by any other technique. With this method, results are expressed as the percentage of apoptotic cell among the total cell count.

2. *DNA fragmentation.* DNA fragmentation was assessed by flow cytometry using the method described by Nicoletti et al [5] slightly modified. The cells are harvested, washed and suspended following the steps described above. They are then stained for 1 hour with PI (50 μ g/mL) at 4°C in a membrane-solubilizing solution containing Triton X-100 (0.1%) and citrated sodium (0.1%). The percentage of apoptotic cells is calculated from the sub-G1 peak of the DNA histograms. Each sample was analyzed in duplicate and 10,000 events were routinely sampled for each calculation.

3. *DNA strand breaks.* Measurement of DNA strand breaks by the terminal deoxynucleotidyltransferase- deoxyribonucleoside triphosphates (dUTP) nick end labelling (TUNEL) was performed using the APO-BRDUTM kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), analysing deoxynucleotidyltransferase-(TdT) specific binding according to the manufacturer's instructions with minor modifications. Briefly, HUVECs in suspension ($0.5-1 \times 10^6$ /mL) are fixed with 1% paraformaldehyde in PBS, washed in PBS, and suspended in 70% (v/v) ice-cold ethanol. The cells are stored in ethanol at - 20°C until use. Samples and controls are stained with FITC-dUTP through incubation in TdT buffer; fluorescence of 10 000 cells are then analysed by flow cytometry. Results were expressed as the percentage of TUNEL-positive cells.

Statistical analysis

Intergroups comparisons of baseline characteristics normally distributed were done by chi-square tests and one-way ANOVA (unequal variances) and/or pairwise comparisons (LSD Method). Non-normally distributed data were analysed with the Kruskal-Wallis tests and pairwise comparisons assessed by Mann-Whitney tests. A Spearman cross-correlation matrix between various parameters was built and each coefficient tested for significance. Results are presented as mean and standard error of mean (SEM), except where indicated otherwise. Analyses were done with SPSS version 14.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA), defining statistical significance at the 0.05 level, with no corrections factors introduced for the multiplicity of analyses.

RESULTS

Characteristics of patients

The mean age (\pm SD) of the study population was 63.41 ± 11.47 years (range: 34 to 100), stable angina patients and normal controls being older by 5 to 6 years than patients with STEMI or NSTEMI ($p=0.04$). Sex was equally distributed but again with a trend to more women in the stable angina and controls groups (table 1).

Table 1. Group Characteristics

Parameters	STEMI	NSTEMI	SA	Controls	<i>p</i> -value
Population, N	45	64	18	20	
Age, mean (SD)	61.69 (11.72)*	62.63 (13.26)*	67.56 (6.35)	66.10 (6.46)	0.04
Sex, women (%)	8 (17.8%)	14 (21.9%)	8 (44.4%)	8 (40.0%)	NS

P-values are significant at 0.05 within groups.

*Statistically different compared with the SA group.

Complement activation and CRP: ex vivo analysis

Figures 2a to 2g show the serum levels of C-reactive protein and complement components between the four groups. The levels of CRP, C3a, C4a, and sC5b-9 were all significantly higher in patients with the disease than in controls, CRP, Bb, and C5a being at the highest in NSTEMI, and MBL and C3a in STEMI; C4a levels were similarly increased in NSTEMI and STEMI. Of interest, stable angina patients had the lowest MBL values and the highest sC5b-9 values, and Bb levels were decreased by 25% in STEMI compared with controls ($p=0.032$). A correlation between CRP and sC5b-9 formation was observed, but only in patients with STEMI ($r=0.511$, $p=0.002$). Furthermore, Bb and C5a values were correlated together among the NSTEMI group ($r=0.713$, $p<0.0001$) but also among the STEMI group ($r=0.634$, $p<0.0001$). In these two groups, Bb was also correlated with sC5b-9 assembly ($r=0.663$, $p<0.0001$ and $r=0.468$, $p=0.004$, in NSTEMI and STEMI, respectively). Of interest, none of these correlations was significant in the non-MI groups.

Figure 4 shows the correlations between Bb and the terminal components C5a and sC5b-9 in patients with MI, either with ST segment elevation or not.

Complement activation and EC apoptosis: in vitro analysis

C5b-9 assembly on intact EC cell membranes could be detected more than twice as frequently in patients with the disease compared with controls (figure 4a), and as much as 25-30% of cell fragments of patients with ST or NST elevation MI, compared with 12% to 20% of cell fragment of controls and stable angina. (figure 4b).

There was a linear increase in the number of early apoptotic cells annexin V-positive but propidium iodide-negative (AnV+/PI-), from controls, to stable angina and to NSTEMI and STEMI ($p=0.035$) (figure 4c).

Similar results were found for late apoptosis with the DNA fragmentation and the TUNEL methods. Close to 30% of endothelial cells exposed to sera of patients with NSTEMI and STEMI showed DNA fragmentation compared with 20% of HUVEC cells exposed to serum of controls and of stable angina patients (<0.006) (figure 4d). A similar trend was seen using the TUNEL assay (Kruskal-Wallis test, $p=0.056$) (figure 4e).

Figure 5 shows a strong overall correlations intra- and inter-groups between the percentage of cell fragments bearing C5b-9 on their membranes late apoptosis detected by DNA fragmentation ($p<0.0001$).

DISCUSSION

This study investigated the activation of the various complement pathways and the apoptotic activity of patients' serum across various manifestation of coronary artery disease from stable angina to NSTEMI and to STEMI compared with control individuals without the disease. Combining *ex vivo* study on blood markers and *ex vivo* studies on endothelial cell cultures, it was found that 1. Serum CRP, C3a, sC5b-9 levels and to some extent C4a are broad markers of atherosclerosis, as well as an enhanced serum apoptotic activity; and 2. All activation pathways, more specifically the alternative and terminal pathways are further activated in myocardial infarction, with an assembly of the terminal activation complex on cell membranes and on cell fragments that correlated with marked apoptotic activity.

Our data underline how complement activation and systemic inflammation arise in CAD and highlight the relative roles for the different pathways according to pathological state. Low MBL levels and protection against cell lysis are associated with stable angina, while the activation of the alternative pathway resulting in cell lysis and apoptosis is associated with both kinds of myocardial infarction.

Lectin pathway activation in stable angina

Almost two decades ago, Yasuda et al have demonstrated an activation of the complement system following an acute myocardial infarction as well as its role in myocardial damage, but not in stable angina [6]. Accordingly, elevated levels of both C3a and CRP were reported in patients with unstable angina but not in those with stable angina [7]. Contrasting observations were reported by Iltumuer and colleagues, showing an evidence of complement activation in stable angina, although their study only focused on the non-activated C3 and C4 components [8]. Our results are in partial agreement with these findings as we found that both systemic inflammation, as evidenced by CRP elevation, and complement activation were elevated in all patients with CAD, including stable angina. Although high levels of the soluble terminal complex (sC5b-9) assembly and the high

prevalence of C5b-9 on intact cells were observed in patients with stable angina, it is noteworthy that very few C5b-9 complexes were found on the membranes of endothelial cell fragments and a relatively low amount of endothelial apoptotic cells were generated compared to patients with STEMI and NSTEMI. Thus, these observations suggest that complement activation occurs on endothelial cells, but not enough to promote cell lysis. The limited complement activation most likely reflects the ability of endothelial cells to activate regulatory mechanisms to attenuate the lytic activity of the membrane-bound terminal complex. One of the mechanisms is the binding of vitronectin, which is secreted by many cell types, including endothelial cells, can bind to the terminal sC5b-9 complexes, thus inhibiting their insertion into cell membranes [9, 10]. This scenario would be consistent with the lower systemic inflammation and deleterious effects associated with stable angina than with ACS.

Furthermore, we also observed that patients with stable angina had in average 2-fold lower levels of the mannan-binding lectin (MBL) protein, the first component of the lectin pathway compared with healthy subjects, STEMI and NSTEMI patients. To our knowledge, our study is the first to report an association between low MBL levels and stable angina. The MBL is a central component of the innate immune system that belongs to the human collectin family. Though the activation of the MBL-associated serine protease-2 (MASP-2), MBL activates the lectin pathway of complement. Madsen et al. have shown that a deficiency in MBL was associated with severe atherosclerosis in humans [11]. It has also been reported that patients who are deficient in MBL (serum concentration less than 100 η g/mL) have a greater tendency towards earlier onset of atherosclerosis as well as a more severe progression of the disease [11, 12]. However, these studies did not investigate the role of MBL in complement activation in patients with stable angina. Ytting et al have recently demonstrated that, in healthy individuals, the circulating levels of MBL were stable over time, which suggest that MBL might be a potentially effective biomarker [13].

Complement activation in ACS

Complement activation is known to contribute to myocardial damage through various pathways, including up-regulation of genes involved in cytokine production, interruption of nitric oxide synthase activity, activation of leucocytes and endothelial cells and finally, increase in apoptosis [14]. The expression of messenger RNA for complement proteins in various vascular cells is up-regulated in atherosclerotic lesions [15] and complement byproducts levels (C5a, C5b-9 and C3a) are elevated present in patients' blood with MI and atherosclerotic plaques [15], with the terminal complement complex frequently co-localizing with CRP [16-18]. CRP is a well-recognized activator of the complement cascade [19-22] and it may be implicated in the pathophysiological mechanisms underlying atherosclerosis and ACS [23-25]. In our study, CRP levels were up to 3-fold more elevated in patients with CAD than in healthy subjects. Furthermore, the soluble terminal complex sC5b-9 formation was related with the systemic inflammation measured only in STEMI patients.

In MI as well as in stable angina, C5b-9 formation was observed on the membranes of the intact cultured endothelial cells. Although the deleterious consequences of each disease are different from another, perhaps this common property might be related to the capacity of sublytic concentrations of C5b-9 to induce cell activation, thus stimulating inflammation, apoptosis or necrosis [26, 27]. Beside its role in cell lysis, C5b-9 formation can lead to various deleterious effects that characterize ACS, such as tissue damage. For instance, sublytic doses of C5b-9 on cell membrane can activate cells and promote pro-inflammatory and pro-apoptotic activity [28, 29]. In addition, C5b-9 on fragmented cells levels was related to late apoptosis. Such a phenomenon reflects the tightly controlled mechanisms by which C5b-9 formation is regulated through the vesiculation of cell membranes that bear C5b-9 on their surface [30, 31]; a mechanism through which the pro-inflammatory and pro-apoptotic/necrotic properties of C5b-9 are inhibited. Interestingly, C5b-9 on cell fragments of healthy subjects was not statistically different from the other groups and less apoptosis was measured. These findings, in addition to the high apoptotic

rates, could be indicative of cell lysis as a result of an excess of C5b-9 on cell membranes. Although complement activation can result in the elimination of apoptotic and necrotic cells and cell debris, C5b-9 complexes can themselves generate apoptosis and necrosis [32]. Although apoptosis is necessary for tissue integrity and inflammatory response management [33], a large number of studies have demonstrated the occurrence of apoptosis in atherosclerotic plaques, potentially leading to plaque denudation and subsequent transition to vulnerability [34-37].

In patients with STEMI or NSTEMI, complement activation occurred mainly through the alternative pathway, as suggested by the strong correlation existing between Bb peptides levels and C5a and sC5b-9 levels in serum. Furthermore, by contrast with the terminal complement activation in stable angina, the terminal complex formation in ACS resulted in the insertion of the C5b-9 in the cell membranes that mediates cell lysis. Indeed, the amount of C5b-9 detected on cell fragments in addition to the high apoptosis rate suggests an important implication for the C5b-9 complex in cell death during ACS. Moreover, in patients with NSTEMI, more C5a and sC5b-9 were detected, when compared to STEMI. Thus, we suggest that since the complement might have been activated for a longer period than in STEMI (patients were enrolled 12 hours vs. 6 hours following the symptom onset), regulatory mechanism could have been turned-on in the patients' artery. Consequently, vitronectin, secreted by activated platelets, have bound the terminal complex in order to regulate its insertion in cell membranes [10, 38]. The anaphylatoxin C5a, can also generate through a variety of harmful events. It can participate in inflammatory cells infiltration at site of injury and promote the release of various oxidative mediators [39].

Non-offending plaques can cause additional adverse events immediately after an acute myocardial infarction [40, 41]. This observation has generated the hypothesis that circulating factors can induce endothelial damage that, in turn, could be responsible for plaque activation. A more recent study has reported that ACS displays pro-apoptotic effects on human endothelial cells [42]. Considering these results and our findings, we suggest that in patients with acute myocardial infarction, the activation of the complement alternative

pathway might be a possible determinant of the stable-to-vulnerable plaque transition by enhancing endothelial apoptosis thus leading to new ACS.

In summary, our data underline how complement activation and systemic inflammation arise in CAD and highlight the relative roles for the different pathways according to pathological state. Low MBL levels and protection against cell lysis are associated with stable angina, while the activation of the alternative pathway resulting in cell lysis and apoptosis is associated with myocardial infarction. We suggest that reducing MBL levels might delay the apparition of ACS of stable angina whereas specific inhibition of the alternative pathway might be a good therapeutic target in the acute phase of myocardial infarction, thus reducing the propensity of developing a stable-to-vulnerable plaque transition.

REFERENCES

1. Haskard, D.O., J.J. Boyle, and J.C. Mason, The role of complement in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2008. 19(5): p. 478-82.
2. Ricklin, D. and J.D. Lambris, Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol*, 2007. 25(11): p. 1265-75.
3. Mollnes, T.E. and M. Harboe, Immunohistochemical detection of the membrane and fluid-phase terminal complement complexes C5b-9(m) and SC5b-9. Consequences for interpretation and terminology. *Scand J Immunol*, 1987. 26(4): p. 381-6.
4. Simak, J., K. Holada, and J.G. Vostal, Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol*, 2002. 3: p. 11.
5. Nicoletti, I., et al., A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1991. 139(2): p. 271-9.
6. Yasuda, M., et al., The complement system in ischemic heart disease. *Circulation*, 1990. 81(1): p. 156-63.
7. Kostner, K.M., et al., Inflammation, complement activation and endothelial function in stable and unstable coronary artery disease. *Clin Chim Acta*, 2006. 365(1-2): p. 129-34.
8. Iltumur, K., et al., Complement activation in acute coronary syndromes. *APMIS*, 2005. 113(3): p. 167-74.
9. Berge, V., et al., Human umbilical vein endothelial cells synthesize S-protein (vitronectin) in vitro. *Scand J Immunol*, 1992. 36(1): p. 119-23.
10. Plow, E.F., Vitronectin: back into the spotlight. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(5): p. 873-4.
11. Madsen, H.O., et al., Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis. *Lancet*, 1998. 352(9132): p. 959-60.
12. Hegele, R.A., et al., Mannose-binding lectin gene variation and cardiovascular disease in Canadian Inuit. *Clin Chem*, 1999. 45(8 Pt 1): p. 1283-5.
13. Ytting, H., et al., Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise. *Scand J Immunol*, 2007. 66(4): p. 458-64.
14. Laine, P., et al., Evidence for complement activation in ruptured coronary plaques in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2002. 90(4): p. 404-8.
15. Oksjoki, R., P.T. Kovanen, and M.O. Pentikainen, Role of complement activation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2003. 14(5): p. 477-82.
16. 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*, 1998. 18(9): p. 1386-92.
17. Nijmeijer, R., et al., C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am J Pathol*, 2003. 163(1): p. 269-75.

18. Schafer, H., et al., Deposition of the terminal C5b-9 complement complex in infarcted areas of human myocardium. *J Immunol*, 1986. 137(6): p. 1945-9.
19. Mold, C., H. Gewurz, and T.W. Du Clos, Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*, 1999. 42(1-3): p. 23-30.
20. Volanakis, J.E., Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann N Y Acad Sci*, 1982. 389: p. 235-50.
21. Gabay, C. and I. Kushner, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 1999. 340(6): p. 448-54.
22. Bhakdi, S., et al., Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(10): p. 2348-54.
23. Pasceri, V., J.T. Willerson, and E.T. Yeh, Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, 2000. 102(18): p. 2165-8.
24. Zwaka, T.P., V. Hombach, and J. Torzewski, C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*, 2001. 103(9): p. 1194-7.
25. Verma, S., et al., A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*, 2002. 106(8): p. 913-9.
26. Kilgore, K.S., et al., Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor-kappa B activation. *Am J Pathol*, 1997. 150(6): p. 2019-31.
27. Kraus, S. and Z. Fishelson, Cell desensitization by sublytic C5b-9 complexes and calcium ionophores depends on activation of protein kinase C. *Eur J Immunol*, 2000. 30(5): p. 1272-80.
28. Albrecht, E.A., et al., C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol*, 2004. 164(3): p. 849-59.
29. Foreman, K.E., et al., C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest*, 1994. 94(3): p. 1147-55.
30. Sims, P.J. and T. Wiedmer, Repolarization of the membrane potential of blood platelets after complement damage: evidence for a Ca⁺⁺ -dependent exocytotic elimination of C5b-9 pores. *Blood*, 1986. 68(2): p. 556-61.
31. Moskovich, O. and Z. Fishelson, Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex. *J Biol Chem*, 2007. 282(41): p. 29977-86.
32. Nauta, A.J., et al., The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *Eur J Immunol*, 2002. 32(3): p. 783-92.
33. Henson, P.M. and D.A. Hume, Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol*, 2006. 27(5): p. 244-50.
34. Blankenberg, S., et al., Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*, 2003. 107(12): p. 1579-85.

35. Isner, J.M., et al., Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*, 1995. 91(11): p. 2703-11.
36. Kockx, M.M., Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. 18(10): p. 1519-22.
37. Harada, K., et al., Apoptotic cell death in atherosclerotic plaques of hyperlipidemic knockout mice. *Atherosclerosis*, 1997. 135(2): p. 235-9.
38. Seiffert, D. and R.R. Schleef, Two functionally distinct pools of vitronectin (Vn) in the blood circulation: identification of a heparin-binding competent population of Vn within platelet alpha-granules. *Blood*, 1996. 88(2): p. 552-60.
39. Walport, M.J., Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, 2001. 344(14): p. 1058-66.
40. Guazzi, M.D., et al., Evidence of multifocal activity of coronary disease in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 1997. 96(4): p. 1145-51.
41. Gilpin, E.A., et al., Periods of differing mortality distribution during the first year after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 1983. 52(3): p. 240-4.
42. Valgimigli, M., et al., Serum from patients with acute coronary syndromes displays a proapoptotic effect on human endothelial cells: a possible link to pan-coronary syndromes. *Circulation*, 2003. 107(2): p. 264-70.

Figure 1. Cells were selected by the side and forward scatters. Cells delimited by gate one (G1), i.e. with high side (SSC) and forward (FSC) scatter, were considered intact cells while cells in gate two (G2) were considered apoptotic bodies or other cell fragments. Results are expressed as the percentage of cells positive for C5b-9.

Figure 2. *Ex vivo* measurements of C-reactive protein and complement activation in the sera of healthy subjects (Ctrls), in patients with stable angina (SA), NSTEMI and STEMI. CRP (a), MBL (b), Bb (c), C3a (d), C4a (e), C5a (f), sC5b-9 (g) measurements were assessed. *P*-values are significant at 0.05. *Significant compared to healthy subjects; †Significant compared to stable angina; ‡Significant compared to NSTEMI.

Figure 3. *Ex vivo* correlations between Bb and the terminal complement components C5a (a) and sC5b-9 (b) in patients with NSTEMI and STEMI. *P*-values are significant at 0.05.

Figure 4. Apoptosis, necrosis and membrane-bound C5b-9 following HUVEC incubation in presence of sera from healthy volunteers (Ctrls), patients with stable angina (SA), NSTEMI and STEMI. C5b-9 formation on intact cells (a) and on cell fragments (b) in addition to apoptosis detected by phosphatidylserine externalization (c), DNA fragmentation (d) or the TUNEL assay (e). *P*-values are significant at 0.05. *Significant compared to healthy subjects; †Significant compared to stable angina; ‡Significant compared to NSTEMI.

Figure 5. Correlations between membrane-bound C5b-9 vs. late apoptosis following cell culture were also evaluated (c). *P*-values are significant at 0.05.

Figure 1.

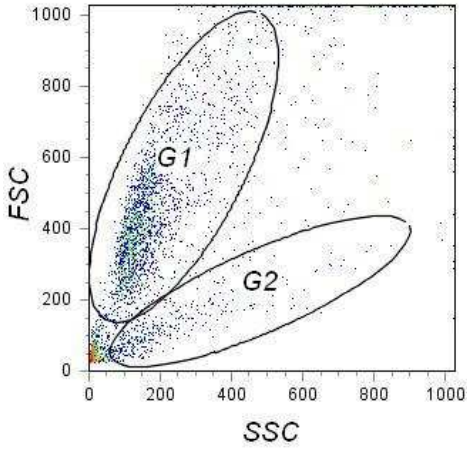
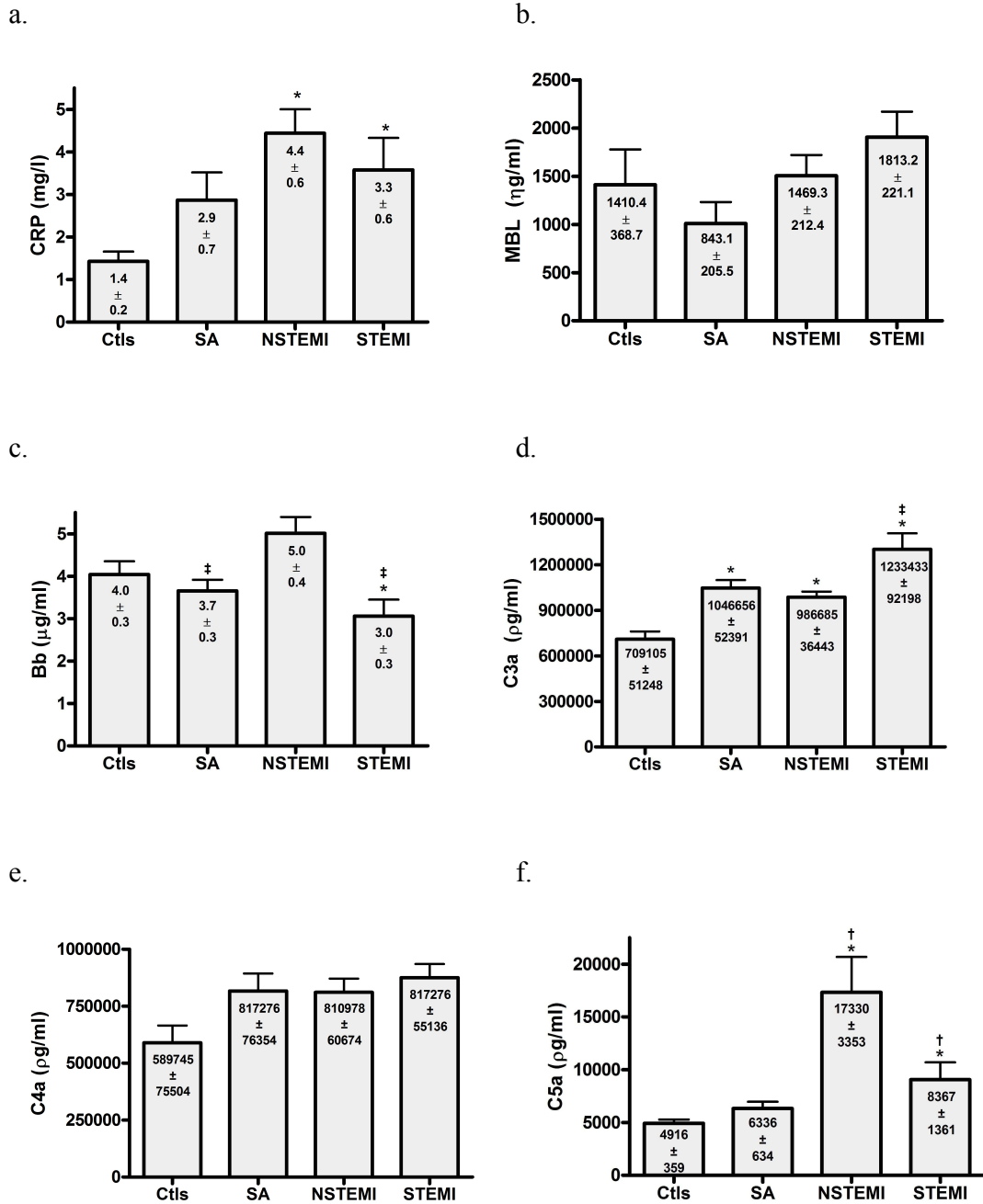


Figure 2.



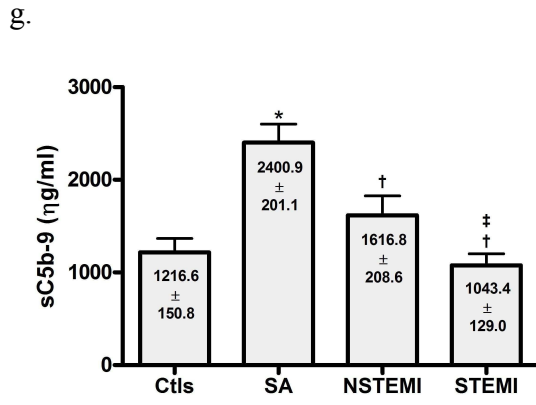
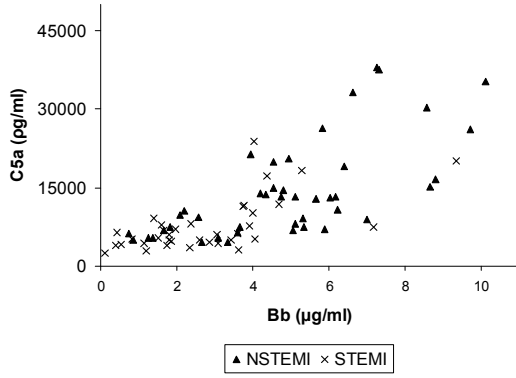


Figure 3.

a.



b.

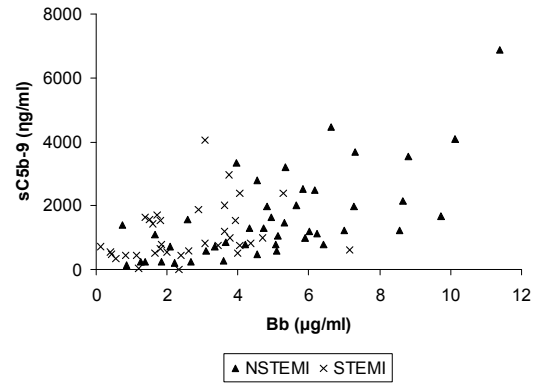
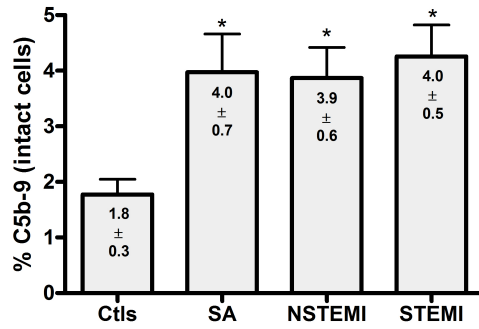
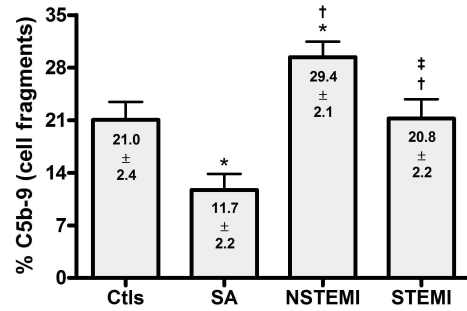


Figure 4.

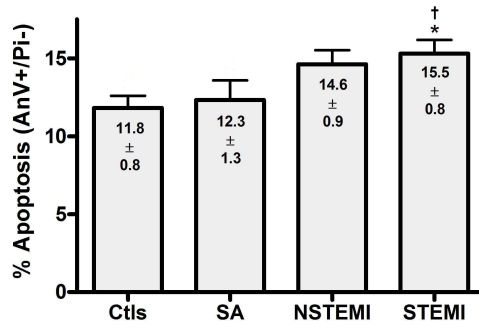
a.



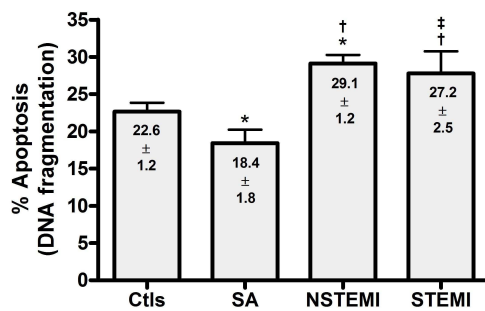
b.



c.



d.



e.

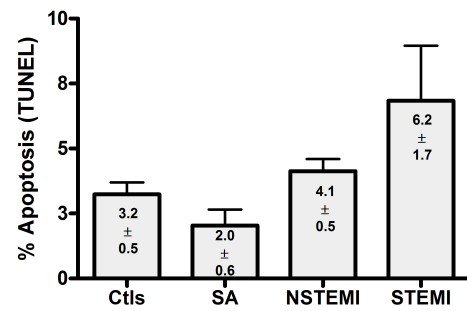
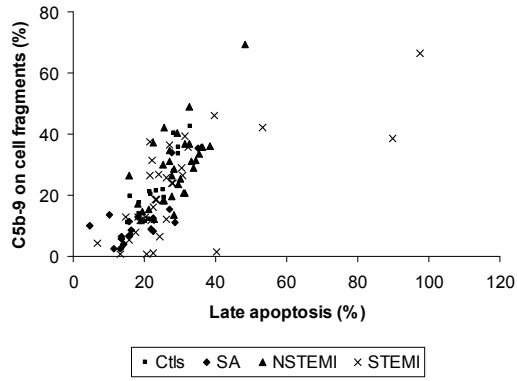


Figure 5.



5.3 Présentation de l'article #2

Les infarctus du myocarde constituent un problème majeur de santé publique à travers le monde [373]. Les angioplasties coronariennes percutanées primaires (PCI) sont utilisées dans le but de désobstruer l'artère responsable d'un infarctus aigu et de rétablir la circulation sanguine dans le myocarde. Dans la majorité des cas, ces interventions réduisent la nécrose myocardique et améliorent la survie des patients subissant un infarctus aigu du myocarde. Cependant, la recanalisation d'une artère obstruée n'est souvent pas suffisante pour empêcher un phénomène délétère de non-reperfusion tissulaire (no-reflow) dans la phase aiguë d'un infarctus du myocarde [374]. Ce phénomène de «no-reflow» implique qu'il y a un retard de reperfusion tissulaire en rapport avec une obstruction microvasculaire à l'étage tissulaire d'aval. Les embolies coronaires distales et la destruction endothéliale associées à une réaction inflammatoire importante conduisent à une obstruction microvasculaire, et ainsi à une mauvaise irrigation du tissu cardiaque durant les premières semaines de l'infarctus [375]. La mauvaise irrigation du tissu cardiaque associée à une réponse inflammatoire excessive augmente le risque de mortalité subséquente [7, 8]. L'importance du «no-reflow» s'accroît à mesure que la durée de l'occlusion coronaire augmente, ce qui s'associe à une augmentation de la taille de l'infarctus (i.e. augmentation de la portion non-irriguée et conséquemment nécrosée du cœur) [376].

Conséquemment, la nécessité de mettre en place un traitement apte à réduire la taille de l'infarctus et ultimement à diminuer la mortalité post-infarctus chez les patients à haut-risque a soulevé l'intérêt de la communauté scientifique. Beaucoup de traitements ont été mis à l'essai dans le but de réduire l'inflammation excessive observée dans les infarctus, mais en vain. Parmi eux, pour n'en nommer que quelques uns, on retrouve l'anti-TNF- α , l'anti-P-sélectine, l'anti-CD11b/CD18 (*complement receptor type 3*), et même certains anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines activées du complément, dont le C1q de la voie classique.

En 2007, la revue JAMA (The Journal of the American Medical Association) publiait les résultats d'une étude clinique de phase III qui s'avérait pourtant très prometteuse [377]. L'étude APEX-AMI (*Assessment of PEXelizumab in Acute Myocardial Infarction*) visait à évaluer l'efficacité du pexelizumab, un anticorps monoclonal humanisé qui se lie à la composante C5 du complément, à diminuer la mortalité à 30 jours suivant une angioplastie coronarienne percutanée primaire pratiquée chez des patients avec STEMI. Malgré les résultats positifs attendus, le pexelizumab n'a pas rencontré l'effet escompté.

Les deux (2) publications suivantes sont le résultat d'analyses effectuées dans le but premier de mieux comprendre les mécanismes d'activation du complément dans l'infarctus aigu du myocarde (STEMI) en comparant l'activité de composantes activées spécifiques à chacune des voies d'activation durant la phase aiguë de la maladie et 24 heures après angioplastie et l'inhibition de l'activation du C5. En comparant le groupe traité par pexelizumab à celui traité par placebo, les résultats de nos sous-études nous ont permis de mieux comprendre les conclusions controversées des études impliquant le pexelizumab, ce traitement qui s'est avéré pourtant si prometteur dans la diminution de la mortalité post-infarctus.

Le premier article de cette série de deux est le fruit d'une sous-étude dans laquelle nous avons comparé, *in vivo*, l'activité relative de chacune des voies du complément dans la phase aiguë de l'infarctus précédant l'angioplastie et dans les 24 heures suivant l'administration d'un placebo ou d'un traitement contre l'activation de la composante C5 du complément. Les résultats obtenus suggèrent que l'inhibition de l'activation de la protéine C5 est efficace pour limiter les effets délétères causés par l'anaphylatoxine pro-inflammatoire C5a mais, paradoxalement, favoriserait une surexpression du complexe terminal soluble.

Les résultats présentés dans cet article ont fait l'objet d'une présentation au congrès de l'*American Heart Association (AHA)* et du Congrès Canadien sur la Santé Cardiovasculaire (CCS) en octobre et novembre 2007.

Dans cette étude, nous avons soulevé que :

- L'activation de la voie alterne du complément dans la phase aiguë de l'infarctus est majoritairement responsable de l'activation de la voie terminale du complément et de l'inflammation excessive qui en découle.
- Par rapport au placebo, le pexelizumab stabilise mais ne diminue pas la production de l'anaphylatoxine pro-inflammatoire C5a entre la phase aiguë et les 24 heures suivant l'angioplastie.
- Le pexelizumab n'est pas suffisant pour prévenir la formation du complexe terminal soluble du complément. De manière surprenante, le pexelizumab aurait même tendance à augmenter les concentrations de ce complexe.

Participation des différents auteurs de la publication N°2 :

CM : Mise au point des méthodes, conceptualisation du projet, expériences, stratégies expérimentales, analyse des résultats et écriture de l'article.

AB : Analyse des résultats et rédaction de l'article

PT : Conceptualisation du projet, analyse des résultats et écriture de l'article

Soumis à Circulation

Complement Activation in Patients with ST-elevation Myocardial Infarction
and Effects of C5 inhibition with Pexelizumab

Authors' last name/Short title: Martel, Thérooux/Complement activation and C5 inhibition
in STEMI

Catherine Martel, MSc; Arnaud Bonnefoy, MD; Pierre Theroux, MD

Department of Medicine Montreal Heart Institute and University of Montreal, Montreal,
Quebec, Canada

Catherine Martel was the recipient of a Doctoral Research Award from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Dr Theroux was a member of the steering committee for the APEX-AMI trial and received operational funding from Proctor & Gamble and Alexion Pharmaceuticals for an inflammation marker sub-study.

Address correspondence to Pierre Thérooux, 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

Background. A key role for complement in the pathophysiology of myocardial ischemia and reperfusion injury has long been assumed, but its exact pathophysiological implications remain, however, largely unknown. This study assessed the activity of complement proteins from each pathway during the first few hours of an evolving ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI).

Methods. C-reactive protein (CRP) and activated complement proteins were studied in 45 consecutive patients enrolled in the APEX-AMI trial in one center upon hospital arrival and 24 hours later. Patients randomly receive placebo or the C5 inhibitor pexelizumab (PEX), and were promptly referred for primary PCI.

Results. In the placebo group, CRP levels increased from 3.7 ± 0.8 to 15.2 ± 5.6 mg/L ($p<0.006$), and terminal C proteins C5a from 8.67 ± 1.4 to 11.8 ± 1.8 ng/ml ($p=0.09$) and sC5b-9 from 1023 ± 343 to 1482 ± 230 ng/ml ($p=0.09$). At baseline, Bb from the alternative pathway correlated best with activation of the terminal C5a ($p=0.002$) and sC5b-9 ($p=0.02$) whereas in the following 24 hours, C3a and C5a then correlated together. PEX had no effect on CRP levels at 24 hours, decreased Bb (12% vs. -15%, $p=0.043$) and C5 levels (38% vs -23%, $p=0.003$) but tended to increase that of sC5b-9 (45% vs. 100%, $p=0.073$); the only correlations then existing were between CRP with classical and alternative C proteins C4a and Bb.

Conclusions. The study suggests a very early activation of the alternative pathway in STEMI and marked activation of terminal complement. Blocking C5 with pexelizumab inhibits C5a but increased the soluble complement terminal complex. The paradoxical findings of complement terminal pathway activation with the drug are relevant for future investigations on the role of complement in MI and potential therapeutic interventions.

Key Words

Complement activation, C-reactive protein, terminal complement complex, sC5b-9, acute myocardial infarction, Pexelizumab.

INTRODUCTION

A putative role has long been assigned to the complement system the pathophysiology of myocardial infarction, including deleterious effects of the terminal complement in ischemia and reperfusion injury [1]. All three proximal activation pathways to complement activation converge to the formation of C3 convertases that act as gateway to formation of the terminal complement in cleaving C5 into C5a and C5b. C5a is soluble, diffusible and potent anaphylatoxin; C5b is a membrane-bound peptide and that is rapidly inactivated unless it can bind C6 on membranes, then to C7 to form C5b-7, and C8 and C9 to form C5b6789, also named C5b-9 or the terminal complement complex (TCC). When fully assembled, TCC form the membrane attack complex (MAC) which lead to rapid osmotic cell death by forming functional pores into cell membranes allowing free in and out movement of water, ions, other small molecules.

Pexelizumab is a recombinant humanized single-chain antibody that binds human C5 with picomolar affinity to prevent the cleavage of C5 to C5a and C5b, leaving intact the proximal complement pathways. Early studies with the drug suggested clinical benefits in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery (CABG) and in patients with ST-elevation myocardial infarction (STEMI) managed with primary percutaneous coronary intervention (PCI) [2-4]. The primary endpoint of an infarct size reduction were not met in MI trials, but a meta-analysis that included 5916 patients from all four randomized placebo-controlled trials published suggested that the drug could associated with a significant mortality reduction [5]. A subsequent phase III investigation, however, failed to show such benefits; the mortality rates were similar between placebo or pexelizumab among 5745 STEMI patients treated with primary PCI in the APEX-AMI trial [6], and no significant benefits were observed on the primary end point of death or myocardial infarction, or both, in CABG-only patients in the Pexelizumab for Reduction in Myocardial Infarction and MOrtality in Coronary Artery Bypass Graft surgery (PRIMO-CABG) trial among 2746 patients [7].

These conflicting results prompted substudies on the effects of pexelizumab on activation of the various components of the complement cascade. Blood that had been prospectively collected from patients enrolled in the APEX-AMI trial for a study of inflammation markers was used for this purpose.

METHODS

Study design and patients

The study population included 45 consecutive patients enrolled in the APEX-AMI trial at the Montreal Heart Institute. The inclusion criteria were 1) STEMI with onset of symptoms within the previous 6 hours; 2) high-risk MI defined by the ECG criteria of ≥ 2 -mm ST elevation in 2 anterior lateral leads, or in 2 inferior leads coupled with ST depression in 2 contiguous anterior leads for a total of ≥ 8 mm, or a new left-bundle branch block; 3) immediate primary angioplasty selected as the reperfusion method. Patients were randomly assigned to receive an intravenous bolus of 2.0 mg/kg of pexelizumab or matching placebo given double-blinded prior to PCI over 10 minutes followed by a 0.05 mg/kg/h infusion of pexelizumab or matching placebo as a continuous intravascular drip of 20 ml/h over the subsequent 24 hours. The relevant exclusion criteria were 1) known or suspected complement deficiency, 2) active serious infection, 4) serious medical conditions likely to alter recovery, and 5) prior fibrinolytic therapy for treatment of the qualifying event. The study protocol was reviewed and approved by the local Ethics Committee and all patients provided written informed consent before enrollment.

Blood sampling and analyses

Twenty-five mL of blood was withdrawn in red top vacutainers containing no anticoagulants from the arterial access site for coronary angiography at baseline and from an antecubital vein at 24 hours. The tubes were left standing for 30-45 min for complete clot formation, and then centrifuged at 1800g for 15 min at room temperature. The serum was rapidly transferred into 1-mL cryotubes to be stored at -70°C for batch analyses at the end of the study.

Complement proteins assessed were mannan-binding lectin (MBL), fractions Bb, C3a, C4a, C5a, and the soluble form of C5b-9 membrane attack complex (sC5b-9). MBL is implicated in the activation of lectin pathway. C4a is an activation protein common the

classical and lectin pathways; Bb is produced upon activation of the alternative pathway, and C3a upon activation of the common proximal pathway.

Bb, sC5b-9, and MBL were measured with enzyme immunoassays on an automated Robotic ELISA instrument (Personal Lab MC, Adaltis INC, Montreal, Qc, Canada), the former two using kits A007 and A009 from Quidel (San Diego, USA), respectively and the latter the MBL Oligomer Elisa Kit 029 (Antibodyshop, Grusbakken, Denmark). Expected Bb values in serum of healthy human donors range between 1 to 7.3 $\mu\text{g/mL}$ (mean 4.13 $\mu\text{g/mL}$). The detection threshold for sC5b-9 three-standard deviations above the zero value is 7.9 ng/mL and a valid quantification is achieved within a range of values from 40 ng/mL to 6000 ng/mL ; values below 1000 ng/mL are expected in healthy human donors. The intra- and inter-assay coefficients of variation for the tests were 5% and 10%, respectively. MBL kits allow the detection of values of 0 to 4000 ng/mL , 2 ng/mL being the lowest concentration detectable 2 SD above the zero standard. Expected values in healthy human donors range from 0 and 7000 ng/mL . Coefficients of variation for the intra- and inter-assay reproducibility of the test were 4% and 10% respectively. Approximately 20% of these donors had a concentration of MBL less than 100 ng/mL , which is considered a MBL deficiency.

The anaphylatoxins C3a, C4a, and C5a were assessed with a particle-based immunoassay (BDTM Cytometric Bead Array, San Diego, CA, USA) that minimizes the variations related to *ex vivo* activation. In this method, beads of distinct fluorescence intensities are coated with capture antibodies specific to complement fragments. The kits in addition to the anaphylatoxins, measure their C3adesArg, C4adesArg and C5adesArg forms produced by carboxypeptidase N (carboxypeptidase arginine), which is specific for the hydrolysis of the COOH terminal of anaphylatoxins. These desArg are the first inactive metabolites, their biological activities being reduced by 100 to 1000 times compared with the native anaphylatoxins [8]. The serum was incubated for 2 hours with the respective beads, then washed and incubated for one hour with the PE-conjugated detection antibodies. The sandwich complexes formed were detected with a Coulter EPICS XL flow

cytometer equipped with an argon laser at 488 nm wavelength (Coulter EPICS XL Flow Cytometer™, Beckman Coulter, Florida, USA), and measured using BD CBA Software applying a 4-parameter curve fit. The sensitivity of the assays for C4a was 10.5 µg/mL, for C3a, 4 µg/ml, and for C5a 1.2 µg/mL. Intra assays coefficients of variation ranged between 3% and 5% and inter assays ranged between 11% and 16%. Expected average (SD) values in serum of normal healthy human donors as reported calculated by the manufacturer (N=10) were 1119.7 ng/mL (560.70 ng/mL), 280.6 ng/mL (58.9 ng/mL) and 11.8 ng/mL (5.3 ng/mL) for C3a, C4a and C5a, respectively.

C-reactive protein levels were measured by particle-enhanced immunonephelometry using a high sensitivity C-reactive protein reagent and the Dade Behring Nephelometer BN-TM ProSpec (Marburg, Germany).

Statistical analysis

Intergroup comparison for baseline characteristics and levels of serum markers between baseline and 24 hours in placebo or PEX treated patients were done using chi-square tests and Kruskal-Wallis tests. The changes observed from baseline to 24 hours were compared within and between the two study groups by an ANCOVA, which merges an analysis of variance with regression analyses for the various continuous variables. Some analyzed parameters were log-transformed because they were not distributed normally. Cross-correlations between the various parameters were made using Spearman cross-correlation matrices on log-transformed parameters; correlations coefficients were subsequently tested for significance. Results are presented as means and standard error of mean (SEM), except otherwise indicated. Analyses were done with SPSS version 14.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). P-values \leq 0.05 were significant, with no corrections factors introduced for the multiplicity of analyses.

RESULTS

Study population

Of the 45 patients studied, 21 received placebo and 24 received pexelizumab; all underwent primary angioplasty. The baseline characteristics and concomitant medications administered were similar between the 2 groups, except for more women and more frequent successful restoration of a TIMI grade 3 flow despite less stenting procedures in the pexelizumab than in the placebo group (Table 1). Such were not the case in the overall population of the APEX-AMI trial where TIMI grade 3 flow was achieved in 86% and 87% of patient receiving placebo and pexelizumab, respectively and stenting was performed in 89% of patients in both groups.

Complement activation in the placebo and pexelizumab groups

In the control group, levels of CRP increased during the first 24 hours by 4.2-fold ($p=0.006$), and those of the soluble terminal complex sC5b-9 by 1.5-fold ($p=0.09$). The complement proteins of the classical, lectin, and alternative pathways were not altered but a slight non-significant increase in C5a by 38% was observed (Table 2).

In the pexelizumab group, CRP and sC5b-9 levels at 24 hour increased by 5.3-fold, ($p<0.0001$) and 2.0-fold ($p=0.003$) respectively compared with baseline. However, a slight, but non-significant, 23% decrease was found in C5a levels. As in the placebo group, the proximal pathways complement proteins showed minimal changes between baseline and 24 hours.

Correlations between the various pathways

The levels of alternative pathway specific Bb fragment correlated with those of C5a ($p=0.002$) and of sC5b-9 ($p=0.04$) at baseline, and those of C4a and C3a did not. C4a correlated with C3a ($p=0.01$) and Bb ($p=0.02$). At this early stage, CRP correlated with sC5b-9 ($p=0.02$), but with no other markers.

These correlations were all lost at 24 hours in both the control and pexelizumab groups, except for a reinforced correlation between C3a and C4a ($p=0.01$) in the placebo group, and weak correlations between CRP and Bb and C4a in the pexelizumab group ($p=0.05$).

Intergroup comparisons

The percent changes from baseline to 24 hours in the proximal pathways proteins C3a, C4a, and MBL were minimal were not different in both study groups. Co-variance analysis shows that pexelizumab, however, when compared to placebo, was associated with Bb ($p=0.043$) and C5a ($p=0.003$) reduction (Figure 1e-1f and 1g-1h), and a trend in sC5b-9 levels increase ($p=0.073$) (Figure 1c-1d). Changes in CRP levels also shown in the figure 1 were quantitatively the same ($p=NS$) (Figure 1a-1b).

DISCUSSION

This study aimed to get more insight into the implications of complement in acute myocardial infarction. It uniquely characterized activated proteins from all complement pathways in a population of STEMI patients enrolled in the APEX-AMI trial allowing comparing complement activation with and without C5 inhibition. The results are suggestive of an initial activation of the alternative pathway followed by activation of the classical/lectin and terminal pathways in the following 24 hours. Pexelizumab had no effects on the increase in CRP levels, blunted Bb and C5a levels, and was associated with an increase in sC5b-9, the soluble form of the membrane attack complex (C5b-9).

Complement activation

Based on literature reports and our own experience in control individuals and patients with stable coronary artery disease, all markers including CRP were obviously elevated at admission. Levels of C5a and sC5b-9 at baseline correlated with those of Bb suggesting a dominant role of the alternative pathway at that time. This pathway is constitutively active, does not need the presence of an antibody, and is readily primed by the simple binding of iC3 when hydrolyzed to iC3b in plasma. Such early activation of the alternative pathway 6 to 12 hours in myocardial infarction followed by an activation of the classical pathway has already been described in another study [9].

Levels of proteins of the classical and lectin proximal pathways were practically unchanged in both groups after 24 hours, whereas PEX abrogated Bb elevation. The correlation observed between the alternative and terminal pathways then weakened and that observed within the proximal/lectin pathways strengthened while terminal complement proteins C5a and sC5b-9 keep increasing, supporting ongoing activation. Pexelizumab altered these patterns mainly by blunting further production in Bb and C5a levels while amplifying sC5b-9 levels elevation.

The role complement in myocardial infarction is mainly supported by immunohistochemistry studies that showed deposition of C1 to C9 proteins and messenger

RNAs, and of CRP and CRP-complement complexes in areas of recent and old infarcts [10, 11], and of C9 and C5b-9 on cardiac myocytes [10, 11]. In rat models, C3 deposits are found as early as 2 hours after a coronary occlusion [12], and high levels of sC5b-9 in serum and in left ventricle with deposits of terminal complement proteins in the myocardium within 8 hours [13].

Studies on blood markers of complement activation are, however, less conclusive. Few have been performed in small and often heterogeneous populations assessing a limited number of complement components, often inactivated proteins. A most consistent finding has been an elevation of sC5b-9 when cell necrosis is present, the amount of which correlating with CK-MB elevation and also with CRP [14, 15].

Our study was particularly propitious to characterize the role of complement in myocardial infarction. It included a homogeneous population of patients enrolled in one center in the APEX-AMI trial. All had a high-risk STEMI quickly studied at hospital admission within a few hours after onset of chest pain and after 24 hours, and promptly referred to primary angioplasty while placebo or pexelizumab was administered by study design.

Despite this favourable scenario, no strong signals emerged from the data to accurately define the implications of the various complement components, particularly with respect to proximal activation pathways, but also to C5a; CRP and sC5b-9 values were more useful. Accordingly, the cross correlations performed provided only indirect evidences of the links between the different pathways. These weaknesses likely relate to the complexity of interactions within the complement system, a variable and often short half-life of the activated components, and in myocardial infarction, mixed pathophysiology. Thus, C5a half-life is approximately 1 minute if the molecule does not promptly anchor a receptor. C3 activation products although unstable are more readily detectable due to half-lives of a few hours. On the other hand, the terminal complex sC5b-9 is relatively stable *in vitro* with a half-life 50 to 60 min and can be considered a reliable indicator of activation of the terminal pathway activation. The biological effects of complement in myocardial

infarction are presumably first focal to subsequently extend regionally to tissue and cells. They can progress to become pan-coronary in patients with multiples culprit lesions, and in extreme cases systemic like in the systemic inflammation response syndrome (SIRS).

CRP and complement activation

CRP levels were only slightly elevated at the onset of symptoms and increased many-fold during the following 24 hours, as previously described in our first study similar to this one [16]. Contrasting with the previous findings, however, pexelizumab had no effects on CRP levels in the present study. Reviewing the data revealed that the reduction previously described was an artifact due to an inappropriately high 24-hour value in the placebo group, likely due to chance since all others CRP values at various time points up to 72 hours were similar in the placebo and pexelizumab groups.

Baseline levels of CRP correlated with those of sC5b-9 ($p=0.02$), 24-hour levels in the placebo group bear no correlations with any complement proteins, and 24-hour levels in the pexelizumab group correlated weakly with Bb and C4a. On these results, one could speculate on roles of CRP in the complement activation process. Pentameric CRP has indeed long been recognized as an activator of the classical pathway [17]. More recently, it became clear that native CRP can dissociate into individual monomeric units with this modified CRP expressing new antigenic reactivity and new neo-epitopes [18]; these are associated with different pathophysiological effects, one being exposing a binding site for factor H. As factor H decreases the activity of C3bBb, its inhibition will promote C5 cleavage by the convertase [19-21].

Pexelizumab and the complement pathway

The APEX-AMI trial tested the hypothesis that pexelizumab could reduce mortality in high-risk myocardial infarction managed by primary angioplasty through an inhibition of formation of terminal component and of associated excessive inflammation and cell toxicity. Such an effect was not seen in this study. Pexelizumab had no effect on the

proximal complement, abrogated the elevation of C5a observed in the placebo group, and was associated with an unexpected significant increase in sC5b-9. This failure of pexelizumab to prevent activation of the terminal complement and formation of the membrane attack complex matches the clinical failure of the drug to reduce infarct size and prevent the morbidity and mortality associated with bypass surgery and with myocardial infarction [4, 6, 20]. They are inconsistent, however, with previous reports that showed with pexelizumab a near complete dose-related inhibition of the complement hemolytic activity [6] and a 99% inhibition of sC5b-9 formation in patients undergoing bypass surgery [3].

In the absence of clear explanations for these apparently paradoxical findings, one can speculate on potential mechanisms. First, could pexelizumab effectively blocks C5 cleavage in the vascular pool, but not so well in the extravascular milieu and at cell levels? Second, could alternative mechanisms extrinsic to the complement system bypass C3-dependant C5 convertase initiate activation of the terminal complement in certain situations? Thrombin could be such a candidate as it is generated during myocardial infarction and can substitute for the C3-dependent C5 convertase in the absence of C3 [22, 23]. Third, could activators, inhibitors, or other regulators of the assembly of C5, C6, C7, C8 and C9 to form the membrane attack complex (C5b-9) influence its activity? Vitronectin plays such a role by preventing the polymerization and incorporation of C8 and C9 within the C5b-9 complex [24, 25]. In the same line, C5 inhibition could alter the balance between membrane-bound active C5b-9 and presumably sC5b-9. Thus a study in patients with STEMI undergoing primary PCI that low plasma levels of sC5b-9 were strongly and independently associated with a depressed left ventricular ejection fraction $\leq 35\%$; the explanation proposed was higher complement activity with accumulation of sC5b-9 in the infarcted myocardium [26].

The results of this study provide few answers and raise many questions. More it evokes working hypotheses. A better understand of the fundamental role of the complement

in myocardial infarction and reperfusion and of its beneficial and deleterious effects would help direct the powerful biological force into a therapeutic tool.

REFERENCES

1. 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*, 1998. 97(22): p. 2259-67.
2. Shernan, S.K., et al., Impact of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, on total mortality and adverse cardiovascular outcomes in cardiac surgical patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 2004. 77(3): p. 942-9; discussion 949-50.
3. Fitch, J.C., et al., Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation*, 1999. 100(25): p. 2499-506.
4. 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*, 2003. 108(10): p. 1184-90.
5. Mahaffey, K.W., et al., Effect of pexelizumab on mortality in patients with acute myocardial infarction or undergoing coronary artery bypass surgery: a systematic overview. *Am Heart J*, 2006. 152(2): p. 291-6.
6. Armstrong, P.W., et al., Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2007. 297(1): p. 43-51.
7. Verrier, E.D., et al., Terminal complement blockade with pexelizumab during coronary artery bypass graft surgery requiring cardiopulmonary bypass: a randomized trial. *JAMA*, 2004. 291(19): p. 2319-27.
8. Matthews, K.W., S.L. Mueller-Ortiz, and R.A. Wetsel, Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. *Mol Immunol*, 2004. 40(11): p. 785-93.
9. Halas, Y.A., et al., Serum C-reactive protein and complement proteins in patients with acute myocardial infarction. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2005. 27(3): p. 405-16.
10. Yasojima, K., et al., Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction. *Circ Res*, 1998. 83(8): p. 860-9.
11. Nijmeijer, R., et al., C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am J Pathol*, 2003. 163(1): p. 269-75.
12. Vakeva, A., et al., Time course of complement activation and inhibitor expression after ischemic injury of rat myocardium. *Am J Pathol*, 1994. 144(6): p. 1357-68.
13. Sumitra, M., et al., Time course studies on the initiation of complement activation in acute myocardial infarction induced by coronary artery ligation in rats. *Mol Cell Biochem*, 2005. 268(1-2): p. 149-58.
14. Yasuda, M., et al., The complement system in ischemic heart disease. *Circulation*, 1990. 81(1): p. 156-63.

15. Iltumur, K., et al., Complement activation in acute coronary syndromes. *APMIS*, 2005. 113(3): p. 167-74.
16. Theroux, P., et al., Prognostic significance of blood markers of inflammation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary angioplasty and effects of pexelizumab, a C5 inhibitor: a substudy of the COMMA trial. *Eur Heart J*, 2005. 26(19): p. 1964-70.
17. Kaplan, M.H. and J.E. Volanakis, Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J Immunol*, 1974. 112(6): p. 2135-47.
18. Ying, S.C., et al., Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1989. 143(1): p. 221-8.
19. Jarva, H., et al., 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*, 1999. 163(7): p. 3957-62.
20. Mold, C., H. Gewurz, and T.W. Du Clos, Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*, 1999. 42(1-3): p. 23-30.
21. Sjoberg, A.P., et al., Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting of the inhibitory activity of C4b-binding protein. *J Immunol*, 2006. 176(12): p. 7612-20.
22. Huber-Lang, M., et al., Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*, 2006. 12(6): p. 682-7.
23. Markiewski, M.M., et al., Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol*, 2007. 28(4): p. 184-92.
24. Plow, E.F., Vitronectin: back into the spotlight. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(5): p. 873-4.
25. Seiffert, D. and R.R. Schleef, Two functionally distinct pools of vitronectin (Vn) in the blood circulation: identification of a heparin-binding competent population of Vn within platelet alpha-granules. *Blood*, 1996. 88(2): p. 552-60.
26. Haahr-Pedersen, S., et al., Level of complement activity predicts cardiac dysfunction after acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol*, 2009. 21(1): p. 13-9.

Figure 1. Percent changes between baseline and 24 hours in the placebo (and pexelizumab groups. CRP (a), MBL (b), sC5b-9 (c), Bb (d), C3a (e), C4a (f) and C5a (g) measurement were achieved. P-values represent differences observed from baseline and 24 hours.

Figure 1.

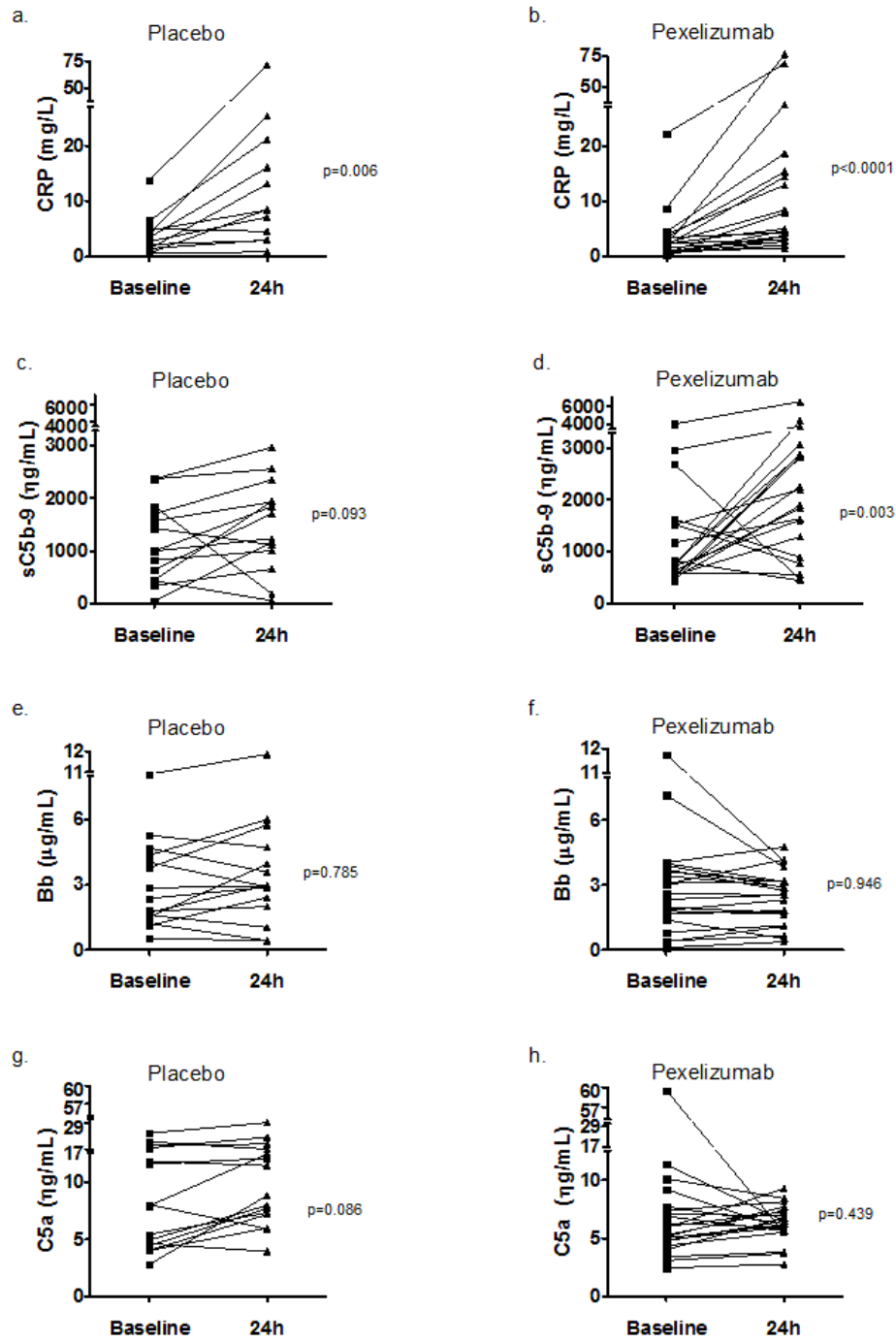


Table 1. Baseline Characteristics and acute therapy applied by subgroups of patients administered placebo and pexelizumab.

<i>Substudy at MHI (45)</i>		
	<i>Placebo (n=21)</i>	<i>Pexelizumab (n=24)</i>
Age, median (IQR)	62 (58-70)	60 (52-59)
Gender, Men (%)	16 (76.2)	21 (87.5)
Body Weight, median (IQR), kg	81 (68-86)	80 (70-84)
Clinical history, %		
<i>Prior MI</i>	19.1	16.7
<i>Prior CHF</i>	4.7	4.2
<i>Diabetes Mellitus</i>	14.3	12.5
<i>Current smokers</i>	42.9	37.5
Treatment in-hospital (%)		
<i>ASA</i>	20 (95.2)	24 (100)
<i>Clopidogrel</i>	19 (95.0)	23 (95.8)
<i>Statins</i>	21 (100)	23 (95.8)
<i>B-blockers</i>	19 (95.0)	21 (87.5)
Procedural outcomes, No. (%)		
<i>TIMI-3 flow</i>	16 (76.2)	20 (83.3)
Stent implantation, No. (%)	19 (90.5)	18 (75.0)

Abbreviations: IQR, Interquartile range; MI, myocardial infarction; CHF, congestive heart failure; TIMI, Thrombolysis in Myocardial Infarction.

Table 2. Baseline and 24-hour values

<i>Parameters</i>	<i>Placebo</i>		<i>p</i>
	Baseline	24h	
CRP, mg/l	3.65 (0.75)	15.22 (5.56)	0.006*
MBL, ηg/ml	2053.1 (343.0)	2168.0 (426.24)	0.89
Bb, μg/ml	3.2 (0.43)	3.6 (0.73)	0.76
C3a, ηg/ml	1254.1 (163.2)	1313.6 (167.4)	0.59
C4a, ηg/ml	969.2 (81.4)	1002.9 (80.7)	0.77
C5a, ηg/ml	8.56 (1.39)	11.82 (1.80)	0.09
sC5b-9, ηg/ml	1023.56 (166.2)	1482.4 (230.22)	0.09

<i>Parameters</i>	<i>Pexelizumab</i>		<i>p</i>
	Baseline	24h	
CRP mg/l	3.07 (0.95)	16.16 (5.56)	<0.001*
MBL, ηg/ml	1613.4 (287.6)	1495.7 (311.41)	0.691
Bb, μg/ml	2.9 (0.50)	2.5 (0.27)	0.38
C3a, ng/ml	1215.3 (100.9)	1112.2 (98.4)	0.47
C4a, ng/ml	779.1 (71.6)	810.7 (66.7)	0.55
C5a, ng/ml	8.21 (2.28)	6.29 (0.34)	0.44
sC5b-9, ηg/ml	1106.1 (197.7)	2208.9 (324.1)	0.003*

**P-values* are significant at 0.05, statistically significant *p-values* are in bold.

Table 3. Spearman's correlations between levels of the various complement activated components, MBL and CRP

a. Baseline (before PEX or placebo infusion)

		MBL	sC5b-9	Bb	C3a	C4a	C5a
CRP	r (p)	-0.10 (0.54)	0.37 (0.02)	0.19 (0.23)	0.05 (0.75)	-0.03 (0.85)	0.18 (0.27)
MBL	r (p)		0.20 (0.20)	0.29 (0.05)	-0.07 (0.66)	0.06 (0.69)	0.21 (0.17)
sC5b-9	r (p)			0.31 (0.04)	0.17 (0.29)	0.19 (0.23)	0.36 (0.02)
Bb	r (p)				-0.03 (0.84)	0.36 (0.02)	0.44 (0.002)
C3a	r (p)					0.41 (0.01)	0.08 (0.61)
C4a	r (p)						0.08 (0.60)

b. 24 hours on placebo infusion

		MBL	sC5b-9	Bb	C3a	C4a	C5a
CRP	r (p)	0.14 (0.66)	0.14 (0.66)	0.06 (0.86)	-0.37 (0.24)	-0.08 (0.81)	-0.13 (0.68)
MBL	r (p)		-0.09 (0.76)	0.40 (0.16)	-0.14 (0.64)	0.17 (0.55)	0.35 (0.23)
sC5b-9	r (p)			0.27 (0.35)	0.23 (0.43)	0.33 (0.25)	0.09 (0.77)
Bb	r (p)				-0.26 (0.35)	0.16 (0.58)	0.35 (0.20)
C3a	r (p)					0.65 (0.01)	0.12 (0.68)
C4a	r (p)						0.15 (0.60)

c. 24 hours on Pexelizumab infusion

		MBL	sC5b-9	Bb	C3a	C4a	C5a
CRP	r (p)	-0.22 (0.36)	-0.27 (0.26)	0.45 (0.05)	-0.41 (0.08)	0.45 (0.05)	-0.36 (0.12)
MBL	r (p)		0.12 (0.59)	0.17 (0.47)	0.35 (0.12)	0.09 (0.70)	0.27 (0.24)
sC5b-9	r (p)			0.17 (0.47)	0.23 (0.32)	-0.01 (0.96)	0.35 (0.11)
Bb	r (p)				-0.16 (0.48)	0.37 (0.10)	0.19 (0.40)
C3a	r (p)					0.19 (0.40)	-0.22 (0.34)
C4a	r (p)						-0.21 (0.36)

Data represent correlation (p-values); statistically significant r and p-values are in bold.

5.4 Présentation de l'article #3

La destruction endothéliale est associée à l'obstruction microvasculaire retrouvée dans les phénomènes de «no-reflow» [375]. Quels phénomènes pourraient être responsables de l'endommagement de ces vaisseaux qui causent une mauvaise irrigation du tissu cardiaque durant les premières semaines de l'infarctus ? Suite aux résultats paradoxaux obtenus dans notre première sous-étude découlant de l'investigation principale APEX-AMI, nous avons voulu mieux connaître l'effet de l'activation du complément sur la destruction des cellules endothéliales. Pour ce faire, nous avons incubé le sérum des patients (admission et 24 heures suivant la perfusion de placebo ou pexelizumab) sur une monocouche de cellules endothéliales durant 72 heures. Nous avons par la suite analysé l'activité de chacune des voies en mesurant les niveaux de leurs composantes spécifiques et en attestant la présence d'une activation de la voie terminale du complément, que ce soit sous sa forme soluble ou associée à la membrane des cellules intactes ou fragmentées. Par la suite, nous avons mesuré l'apoptose des cellules HUVEC par différentes méthodes. Les analyses ont été effectués en microscopie (fluorescence) puis en cytométrie soit dans le surnageant de culture ou après avoir détaché les cellules adhérentes. Le but de cette sous-étude était de mettre en relief les effets d'une inhibition de l'activation de la protéine C5 du complément sur la lyse et l'apoptose des cellules endothéliales.

Les résultats de cette seconde sous-étude suggèrent qu'une inhibition de l'activation de la protéine C5 est efficace pour limiter les effets délétères d'une activation du complément associés à la production de l'anaphylatoxine C5a et du complexe terminal soluble. Cependant, nous soulignons que, bien que le pexelizumab soit efficace pour diminuer la concentration de C5b-9 à la surface des cellules, une inhibition de l'activation du C5 n'est pas suffisante pour engendrer des concentrations non-lytiques de C5b-9. Par conséquent, le pexelizumab ne semble avoir aucun effet bénéfique sur les dommages causés aux cellules endothéliales dans l'infarctus du myocarde.

Les résultats présentés dans cet article ont fait l'objet d'une présentation au congrès de l'*American College of Cardiology (ACC)* en février 2008.

Dans cette étude, nous avons soulevé que :

- La phase aiguë de l'infarctus est associée à la présence accrue de C5b-9 sur les membranes des cellules et des fragments cellulaires et avec l'apoptose des cellules endothéliales.
- Le pexelizumab n'influence cependant pas la sécrétion de cytokines inflammatoires par les cellules endothéliales.
- Le pexelizumab diminue efficacement la formation de C5b-9 à la surface des cellules endothéliales et l'activation terminale du complément par les cellules endothéliales.
- Malgré cela, le pexelizumab n'a étonnamment pas d'effet sur l'apoptose des cellules endothéliales.

Participation des différents auteurs de la publication N°3 :

CM : Mise au point des méthodes, conceptualisation du projet, expériences, stratégies expérimentales, analyse des résultats et écriture de l'article.

PT : Conceptualisation du projet, analyse des résultats et écriture de l'article.

Article en préparation

How does the serum of Pexelizumab-Treated ST-Segment Elevation MI Patients affects complement activation and apoptosis in endothelial cells: A substudy of the APEX-AMI trial

Catherine Martel, MSc ^{1,2}, Paul W Armstrong, MD ³, Christopher B Granger, MD ⁴; Pierre Theroux, MD ^{1,2}

¹Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

⁴Duke Clinical Research Institute, Durham, North Carolina, USA

Catherine Martel was the recipient of a Doctoral Research Award from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR)

Address correspondence to Pierre Théroux, 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. Complement activation and apoptosis are pathophysiological mechanisms implicated in myocardial infarction (MI). In the recent APEX-AMI trial, Pexelizumab (PEX), a monoclonal antibody blocking C5 and activation of the terminal complement, failed to reduce mortality in patient with ST-segment elevation MI (STEMI). This study explored the potential reasons for this failure in cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) incubated with serum of patients administered PEX or placebo.

Methods. Sera were obtained at baseline and after 24 hours drug infusion. Complement proteins C4a, C3a, Bb, MBL, C5a, and sC5b-9, HUVEC-bound C5b-9 and cytokines released were assessed by cytometric bead arrays, enzyme-linked immunoassays, multi-Luminex analyte profiling beads, and flow cytometry. HUVECs apoptosis was quantified by DNA fragmentation, TUNEL, and propidium iodide and annexin-V labeling.

Results. At baseline, the levels of all parameters were similar between groups and remained so at 24 hours in the placebo group. Pexelizumab inhibited the activation of the terminal complement proteins C5a, sC5b-9, and C5b-9 by 88%, 77%, and 80%, respectively ($p \leq 0.0001$) but it did not reduce the levels of any cytokines. In the placebo and PEX groups, the density of membrane-bound C5b-9 correlated with the extent of apoptosis ($r=0.815$, $p < 0.0001$ and $r=0.683$, $p=0.001$, respectively. Serum-mediated apoptosis of HUVECs was correlated with the density but was not associated with a detectable impact of PEX.

Conclusions. Incubation of HUVECs with serum from patients with STEMI was associated with the activation of the terminal complement system and cell apoptosis. Treatment with Pexelizumab abrogated this activation, but had no effect on cytokines release and apoptosis.

Key words: Apoptosis, cell culture, Complement, Inflammation, Membrane attack complex, Myocardial infarction, Pexelizumab, Biomarkers.

INTRODUCTION

Timely reperfusion of the occluded coronary artery reduces infarct size and prevents mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) [1]. The benefits, however, are often sub-optimal because of delayed treatment, incomplete revascularization, no-reflow at cell levels, and reperfusion-induced cell injury. Although numerous interventions have been attempted over the last three decades to protect the ischemic cells, [2] none have provided convincing evidences of efficacy to warrant clinical introduction.

Pexelizumab, a recombinant fully humanized single-chain antibody with picomolar affinity for a sequence of human C5, was the latest promising intervention tested. While preserving the proximal complement involved in host defense, the drug abrogates the progression to the activation of the terminal complement by preventing the cleavage of C5 into C5a and C5b. C5a is a potent anaphylatoxin, and C5b, the first component of the membrane attack complex (MAC). The latter has deleterious effects on inflammation, vasoconstriction, vascular leakage, and activation of white cells with free radicals and cytokines generation, and of which is cytotoxic, cytolytic, and pro-apoptotic [3, 4].

Early studies with Pexelizumab supported a drug benefit in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery [5] and in patients with STEMI managed with fibrinolysis [6] or primary PCI [7]. Although the primary endpoint of reduction of infarct size was not met, a mortality reduction was consistently observed. This finding was further supported by a metaanalysis that included four randomized placebo-controlled trials and a total of 5916 patients [8], a number of experimental studies [8-10] including a reduction in inflammation markers observed in one STEMI study [11]. APEX-AMI was designed on the background of these observations with the objective of showing a reduction in mortality in patients with STEMI oriented to primary PCI. The trial was then the largest study performed in this population of patients [12]. Prospective inflammation substudies were

incorporated in the trial with the goal of exploring putative mechanisms to explain the mortality reduction with pexelizumab in the absence of an effect on infarct size.

Because the APEX-AMI trial failed to show a benefit of pexelizumab [12, 13], we designed a study that specifically examined, in a model of cell culture, the anti-complement and anti-apoptotic effects of the serum of patients administered pexelizumab. Although the trial was negative, we still carried out our substudy as we expected that valuable information on the drug effects might be obtained explaining its lack of benefits and be used for future research with complement inhibitors or other anti-inflammatory drugs.

METHODS

Study design and patients

This substudy included 45 consecutive patients recruited in the APEX AMI trial representing 78% of the population of patients randomized at the Montreal Heart Institute, excluding only patients for whom a blood sampling could not be obtained before initiation of the study drug [12]. The study was approved by the local Ethic Committee with the recommendation of including in the main consent form one paragraph describing the substudy and it was also approved by the sponsor and the Steering Committee. The details of the APEX-AMI trial have been reported elsewhere in details [12]. In summary, the study enrolled patients with STEMI with an onset of symptoms within the previous 6 hours and oriented to primary percutaneous coronary intervention. A high-risk situation was also required defined as ≥ 2 -mm ST elevation in 2 anterior leads for anterior MI, ≥ 2 -mm in 2 inferior leads with ST depression in 2 contiguous anterior leads for a total of ≥ 8 mm in inferior MI, or the presence of a presumably new left-bundle branch block with ≥ 1 -mm concordant ST elevation. Patients were randomized double-blinded to a bolus of (2.0 mg/kg bolus) plus continuous infusion for 24 hours (0.05 mg/kg/h) or equivalent placebo.

Blood sampling

Baseline blood samplings were collected from the arterial puncture site for coronary angiography before any guide wires insertion and from a forearm vein at 24 hours. A total of 100 mL of blood was withdrawn, distributed into the two samplings in red top vacutainer tubes and allowed to clot for up to one hour at room temperature without the addition of anticoagulants. The tubes were then centrifuged at 1800 g for 15 minutes at room temperature, the serum was transferred in 1 ml- cryotubes and stored at -70°C for later batch analyses.

Cell culture

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) obtained from Clonetics, (SanDiego, CA, USA, batch CC-2519) were seeded in 75-cm² flasks (Sarstedt Inc. Montreal, Qc, Can.) and cultured as recommended by the manufacturer at 37°C under 95% air and 5% humidified CO₂ in Endothelial Growth Media bullet kit (EGM-2 bullet kit, LONZA, Walkersville, MD) containing Endothelial Basal Medium (EBM-2, LONZA) and 2% foetal bovine serum (FBS) supplemented with EGM-2 SingleQuots (LONZA). Confluent HUVECs were then washed with phosphate-buffered saline (PBS), detached with a Trypsin/EDTA solution (LONZA) that was subsequently neutralized with Trypsin Neutralizing Solution (LONZA) and washed again with PBS. A concentration of 2500 cells/cm² in EGM-2 was then plated in 35 mm dishes. When confluence was reached after 12 to 14 hours, the EGM-2 medium was replaced by an EBM-2 medium supplemented with 20% filtered serum from patients. All experiments were performed using HUVECs at passages 3 to 5.

After an incubation period of 72 hours, the supernatants were collected, the adherent HUVECs were detached with a trypsin-EDTA solution and kept on ice until centrifugation. The cells in the supernatants and the trypsinized cells were washed separately at 4°C with PBS, centrifuged at 200 g for 5 minutes at 4°C, pooled, washed with PBS and centrifuged a second time. The cell-free supernatants from each well were aliquoted in cryotubes and frozen at -70°C for future batch analysis of complement activity and cytokines production.

Study parameters

Complement activation. This study assessed HUVEC-mediated complement activation following incubation with patients' sera containing or not pexelizumab. Complement activation was assessed by measuring MBL, Bb, sC5b-9, C3a, C4a and C5a and in the supernatant of HUVECs. Commercially available solid phase sandwich ELISA tests were

used to determine the levels of the complement proteins Bb and sC5b-9 (Quidel, San Diego, California). MBL levels were measured by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (MBL Oligomer ELISA kit, KIT 029, AntibodyShop, Denmark). The levels of the anaphylatoxins C3a, C4a and C5a were measured by a particle-based immunoassay (BDTMetric Bead Array (CBA)). Briefly, samples were incubated for 2 hours with beads coated with C3a, C4a and C5a. The beads were all similar in size but with different fluorescence intensities. Then, the complexes formed were washed and incubated for 1 hour with the PE-conjugated detection antibodies and detected by flow cytometry using a Coulter EPICS XL flow cytometer equipped with an argon laser at 488 nm wavelength (Coulter EPICS XL Flow CytometerTM, Beckman Coulter, FL, USA).

C5b-9 formation on HUVECs surface was detected by flow-cytometry using a monoclonal mouse anti-human C5b-9 (clone aE11, Dako, Mississauga, Ontario, Can.), specific to a neoepitope on poly C9 complement factor. This neoepitope is exposed in the solid phase and membrane form and in the fluid-phase form of the terminal complement complex, but not in native C9. The antibody reacts with both membrane-bound and adsorbed terminal complement complex [14]. The antibody was added to $0.5-1 \times 10^6$ cells/ml and incubated for 30 minutes at room temperature in phosphate buffer containing 1% bovine serum albumine (BSA), 0.1% Tween 20 and 1% goat serum. The cells were washed and centrifuged at 2000 rpm (500g) during 10 minutes. A polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin R-phycoerythrin (Dako) diluted at 1:1000 was then added to a 50 μ L cell suspension and incubated for 30 minutes. Cells were first selected according to their size and granularity (side and forward scatters) (Figure 1). Particles delimited by gate 1 (G1) were considered intact cells while particles in gate 2 (G2) were considered apoptotic bodies and other cell fragments [4]. Results were expressed as the percentage of cells positive for C5b-9. Cell debris were excluded from the analysis.

Inflammatory activity. Levels of various cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-10, d'IL-12, INF- γ , IP-10, RANTES) were measure in the supernatants using the Bio-Plex cytokine assays technology (LUMINEX 200, Luminex Corporation, Austin, TX, USA). Based on the principles of flow-cytometry and designed in a capture sandwich immunoassay format, Bio-Plex cytokines assays are here ten-plex bead-based assays (Bio-Rad Laboratories Inc., Montréal, Qc, Canada) designed to quantify multiple cytokines culture supernatants.

Serum CRP levels were measured by immunonephelometry (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany).

Methodological Aspects of Apoptosis Detection

Apoptotic HUVECs were identified by three different ways following the incubation period of 72 hours with the patients' sera.

1. Membrane asymmetry. After washing twice with PBS, 1×10^5 to 1×10^6 cells were suspended in 100 μ L of Annexin-V Binding Buffer (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4), 2.5 μ L of FITC-Annexin V (20 μ g/mL in aqueous buffered solution containing BSA and 0.09% sodium azide) and 5 μ L of propidium iodide (PI) (50 μ g/mL in PBS, pH 7.4) (PharMingen, Becton Dickinson, SanDiego, CA, USA). This mixture was incubated for 15 minutes in the dark at room temperature and 500 μ L of binding buffer was then added for flow cytometry analysis. Cell debris were excluded by setting an appropriate threshold trigger. For each sample, 3000 cells were analyzed. An Annexin-V-positive and PI-negative signal identified early apoptotic cells, representing a stage of apoptosis not otherwise detected by any other technique. With this method, results are expressed as the percentage of apoptotic cell among the total cell count.

2. *DNA degradation.* DNA degradation was assessed by flow cytometry using the method described by Nicoletti et al [5] slightly modified. The cells are harvested, washed and suspended following the steps described above. They are then stained for 1 hour with PI (50 µg/mL) at 4°C in a membrane-solubilizing solution containing Triton X-100 (0.1%) and citrated sodium (0.1%). The percentage of apoptotic cells is calculated from the sub-G1 peak of the DNA histograms. Each sample was analyzed in duplicate and 10,000 events were routinely sampled for each calculation.

3. *DNA strand breaks.* Measurement of DNA strand breaks by the terminal deoxynucleotidyltransferase- deoxyribonucleoside triphosphates (dUTP) nick end labelling (TUNEL) was performed using the APO-BRDUTM kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), analysing deoxynucleotidyltransferase-(TdT) specific binding according to the manufacturer's instructions with minor modifications. Briefly, HUVECs in suspension (0.5-1 x 10⁶/mL) are fixed with 1% paraformaldehyde in PBS, washed in PBS, and suspended in 70% (v/v) ice-cold ethanol. The cells are stored in ethanol at - 20°C until use. Samples and controls are stained with FITC-dUTP through incubation in TdT buffer; fluorescence of 10 000 cells are then analysed by flow cytometry. Results were expressed as the percentage of TUNEL-positive cells.

Statistical analysis

Intergroup comparisons of baseline characteristics and early in-hospital data were compared with chi-square tests. Changes from baseline to 24 hours were compared using an ANCOVA, which merges an analysis of variance with regression analyses for the various continuous variables. Complement proteins and inflammation markers were log-transformed to adjust for non-normal distribution. A Spearman correlation matrix was built to cross-correlate the various complement proteins over time and within groups, with the goal of linking changes in the terminal complement with the various activation pathways. Results are presented as means and standard error of means (SEM) and they were

considered statistically significant when two-tailed were less than 0.05, with no corrections factors introduced for the multiplicity of analyses. Analyses were conducted using SAS version 8.2 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) and SPSS version 14.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

RESULTS

Study population

Table 1 compares the baseline characteristics and the early in-hospital data of the patients included in our substudy with those of the overall population of the APEX-AMI trial. The percentages of men and women were similar to those of the main trial. However less women were included in the pexelizumab subgroup in the substudy but likely of little significance considering the small number of women enrolled in the substudy. Otherwise, the various characteristics were similar across the three populations, with no statistically significant differences. The baseline characteristics were representative of current populations of patients with STEMI enrolled in clinical trials. The early in-hospital data showed that the APEX-AMI population received state-of-the-art treatment, with very early PCI and high use of recommended therapies.

Complement activation

Table 2 and figure 2 compare the levels of complement components between the pexelizumab-treated group and the placebo-treated group before and after treatment, following HUVEC exposure to the patient's sera. No change in the levels of proteins MBL, C3a, C4a and Bb observed between baseline and 24 hours in both groups (table 2). C5a and sC5b-9 levels were reduced by 92% and 71% in the pexelizumab group (table 2, figure 2a and 2b). Concomitantly, pexelizumab reduced the expression of the membrane attack complex by 79% on intact cells and more than 75% on cell fragments.

At baseline, only a few hours after the onset of chest pain, formation of the soluble terminal complex sC5b-9 correlated with the terminal anaphylatoxin C5a and the peptide Bb ($p < 0.005$ for both), the two last correlating together ($r = 0.35$, $p = 0.02$).

At 24 hours in the placebo group, the correlation between the proximal and the terminal pathway remained strong with Bb of the alternative pathway ($r = 0.60$, $p = 0.02$ vs. C5a, and $r = 0.67$, $p = 0.001$ vs. sC5b-9). A correlation of the MBL levels with C5a and sC5b-

9 levels was found ($r=0.53$, $p=0.05$ and $r=0.53$, $p=0.04$) those were strongly correlated ($r=0.88$, $p=0.001$).

Inflammation markers in supernatants

Table 3 shows that no significant differences were observed in the levels of inflammation markers in the two groups of patients. At baseline and 24 hours, cytokines levels were similar and the changes observed in the placebo and pexelizumab groups were, in general, directionally and quantitatively similar (table 4). Of interest, baseline CRP levels were correlated with the terminal components C5a ($r=0.361$, $p=0.046$) and sC5b-9 ($r=0.486$, $p=0.005$), and tended to be correlated with Bb from the alternative pathway ($r=0.331$, $p=0.064$). At 24 hours, the correlation between CRP and Bb ($r=0.643$, $p=0.024$) was stronger whereas the correlation with sC5b-9 was not longer significant ($r=0.508$, $p=0.092$). Furthermore, no correlation was observed after the 24-hour treatment with pexelizumab.

Cell apoptosis

Table 4 shows that pexelizumab had no effect on HUVEC apoptosis. The various methods used to quantify apoptosis yielded consistent results. Of interest, there was a strong positive baseline correlation between percentage of intact and fragmented HUVECS positive for MAC and late apoptosis ($p<0.0001$). This was also true at 24 hours in both the placebo and pexelizumab groups ($p<0.002$).

DISCUSSION

Our study was specifically designed to examine the anti-complement and anti-apoptotic effects of pexelizumab. Using HUVECs incubated with the serum of patients with STEMI treated with pexelizumab, the main findings are 1) pexelizumab strikingly inhibited the terminal complement proteins by approximately 80% without altering the proximal complement proteins and 2) inflammatory markers and apoptosis were unaffected by treatment. It was coupled with a large phase 3 study which principal objective was a reduction in mortality with the drug. High-risk patients with anterior or high-risk inferior MI evolving for only a few hours were enrolled. They were all treated homogeneously with aspirin, clopidogrel, and an anticoagulant. The use of a GPIIb/IIIa antagonist was encouraged and all patients were referred for primary angioplasty. As the trial was negative, the goal of our study was re-oriented to try to find reasons for the clinical failure. Otherwise, the study was carried out as initially planned to look at the effect of the serum obtained from patients – therefore containing a placebo or pexelizumab – on cell cultures *ex vivo*. Collectively, our results demonstrate that pexelizumab performed as expected from its design and we suggest that the lack of effect observed in the APEX-AMI was perhaps related to its inability to inhibit endothelial cells-mediated inflammation and endothelial cell apoptosis.

HUVEC complement activity following patients' serum exposure

In patients with STEMI, complement activation occurred very early and was as marked a few hours after the onset of symptoms as it was 24 hours later. As expected with C5 inhibitors, pexelizumab only inhibited the terminal pathway to complement activation. Bb was best correlated with an elevation of the terminal complement proteins suggesting that the alternative is implicated in complement activation in the acute phase of MI. These observations are in agreement with previous reports demonstrating that the alternative pathway is activated initially in MI [32].

Some reports have suggested that the alternative pathway might be more sensitive to pexelizumab compared with the other proximal pathways. Reports have indicated that the complement terminal complex can be formed via the alternative pathway in human atherosclerotic coronary lesions [33] since it was colocalized with properdin in the deep intima, while apoptotic cells and protein S were associated with C4BP, the major inhibitor of the classical complement pathway.

Inflammatory markers

A number of inflammatory markers are found elevated in myocardial infarction [26-30]. In a previous phase 2 trial, we found that a 24-hour infusion of pexelizumab was associated with a 32% and 20% lower level of CRP and IL-6 [11]. However, these effects were not observed at 48 hours after the discontinuation of pexelizumab. The loss of effect over time was probably due to the pharmacodynamic profile of pexelizumab, since the bolus and 24-hour infusion inhibited the hemolytic activity of complement for less than 12 hours after the drug was discontinued [6, 7, 31].

In our study, the lack of effect of pexelizumab on *in vitro* inflammatory markers was consistent with the lack of clinical benefits observed in the APEX-AMI trial. IL-12 was the only inflammatory cytokine secreted by HUVECs that was significantly decreased by the serum from patients treated with pexelizumab. Thus, our results translated the paradoxically decreases and increases that controversy anti- and pro- inflammatory cytokine productions. We did not assess the effects of pexelizumab on cytokines relevant to immunity. However, it is well known that there are complex interactions in the inflammatory/immune status of patients with STEMI and that a single intervention is not likely to be completely effective, stressing the need to determine a panel of markers.

HUVEC apoptosis

Apoptosis is a cell death process characterized by morphological and biochemical features occurring at different stages. Because apoptosis is a kinetic event [18] and that the

different methods currently available have inherent limitations that render them imperfect, we have different methods to assess HUVEC apoptosis. Annexin-V is a hallmark of the early to middle stages of apoptosis. It is a 36 kDa Ca^{2+} -dependant protein that has a strong affinity for phosphatidylserine that is translocated to the outer surface of the cell plasma membrane soon after apoptosis begins. Propidium iodide (PI) is a fluorescent vital dye that stains the DNA of cells with damaged membrane in red. As it does not cross the plasma membrane of viable cells and viable cells at a very early stage of apoptosis but with preserved membrane integrity, it is a marker of early and late apoptosis and necrosis. The TUNEL assay was introduced in 1992 by Gavrieli and colleagues [17], this technique is based on the specific binding of terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) to 3'-OH ends of fragmented DNA.

The 3 different methods we used to detect apoptosis consistently showed the lack of effect of pexelizumab. The activation of the terminal pathway of complement leads to the formation of the terminal complement complex, which is known to be involved in cell apoptosis. Indeed, Vakeva and colleagues have demonstrated, in a rat model for myocardial ischemia and reperfusion injury, that treatment with anti-C5 antibodies protected against myocardial cell apoptosis [4]. Over the past few years, some reports have shown that, in addition to its involvement in cellular activation and proliferation[19], sublytic amounts of the terminal MAC induced cell apoptosis. This effect was dose-dependant because 1) lytic amounts of C5b-9 lead to necrosis, 2) sublytic amounts of C5b-9 lead to cell activation [19] and protected against apoptosis [20] and 3) intermediate amounts of C5b-9 lead to the induction of apoptosis as well as the soluble form of MAC [21]. Increasing evidences suggests that endothelial cell apoptosis might play a potential role in the progression of acute coronary syndrome. Endothelial cell apoptosis may contribute to plaque erosion, participate in thrombus formation and stimulate platelet aggregation, leading to myocardial infarction [22-24]. A potential explanation as to why pexelizumab failed to inhibit HUVECs apoptosis might be related to the fact apoptotic cells can downregulate membrane-bound complement regulatory proteins and activate complement. Most

apoptotic cells do not undergo complement-mediated lysis. Trouw and its colleagues [25] have reported that during late apoptosis, the cells acquire fluid-phase complement inhibitors, such as C4b-binding protein (C4BP) and factor H (fH), that compensate for the downregulation of membrane-bound complement regulatory proteins and protect against excessive complement activation and lysis. These authors demonstrated that late apoptotic cells were positive for C4BP and fH and that the increases in the percentage of late apoptotic cells were correlated with concomitant increases in C4BP binding. C4BP binds to dead cells mainly via phosphatidylserine whereas fH binds via multiple interactions with CRP. These observations suggest that the cellular effects of MAC are dose-dependent as well as dependent on its membrane or soluble forms. The dose of pexelizumab used in the APEX-AMI trial was the same as in the COMMA study. Hemolytic assay has shown that this dose produce near to complete inhibition of complement activity for 24 hours [7].

In summary, incubation of HUVECs with serum from patients with STEMI was associated with activation of the terminal complement pathway and cell apoptosis. Pexelizumab strikingly abrogated this activation but had no effect on cytokine release and apoptosis. Although the APEX-AMI trial did not reach its primary goal, it has nevertheless provided valuable information on anti-C5 therapy in myocardial infarction. The paradoxical findings of the lack of clinical benefit of pexelizumab despite its inhibitory effects on endothelial cell-mediated complement activation provide new avenues for future research on the role of the complement in acute myocardial infarction as well as for targeting new therapeutic interventions.

REFERENCES

1. Antman, E.M., et al., ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction; A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of patients with acute myocardial infarction). *J Am Coll Cardiol*, 2004. 44(3): p. E1-E211.
2. Claeys, M.J., et al., Determinants and prognostic implications of persistent ST-segment elevation after primary angioplasty for acute myocardial infarction: importance of microvascular reperfusion injury on clinical outcome. *Circulation*, 1999. 99(15): p. 1972-7.
3. Thomas, T.C., et al., Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. *Mol Immunol*, 1996. 33(17-18): p. 1389-401.
4. 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*, 1998. 97(22): p. 2259-67.
5. Verrier, E.D., et al., Terminal complement blockade with pexelizumab during coronary artery bypass graft surgery requiring cardiopulmonary bypass: a randomized trial. *JAMA*, 2004. 291(19): p. 2319-27.
6. 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*, 2003. 108(10): p. 1176-83.
7. 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*, 2003. 108(10): p. 1184-90.
8. Mahaffey, K.W., et al., Effect of pexelizumab on mortality in patients with acute myocardial infarction or undergoing coronary artery bypass surgery: a systematic overview. *Am Heart J*, 2006. 152(2): p. 291-6.
9. Sherman, S.K., et al., Impact of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, on total mortality and adverse cardiovascular outcomes in cardiac surgical patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 2004. 77(3): p. 942-9; discussion 949-50.
10. Fleisig, A.J. and E.D. Verrier, Pexelizumab -- a C5 complement inhibitor for use in both acute myocardial infarction and cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Expert Opin Biol Ther*, 2005. 5(6): p. 833-9.
11. Theroux, P., et al., Prognostic significance of blood markers of inflammation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary angioplasty and effects of pexelizumab, a C5 inhibitor: a substudy of the COMMA trial. *Eur Heart J*, 2005. 26(19): p. 1964-70.

12. Armstrong, P.W., et al., Assessment of Pexelizumab in Acute Myocardial Infarction (APEX AMI): a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of pexelizumab in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Am Heart J*, 2005. 149(3): p. 402-7.
13. Armstrong, P.W., et al., Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2007. 297(1): p. 43-51.
14. Mollnes, T.E. and M. Harboe, Immunohistochemical detection of the membrane and fluid-phase terminal complement complexes C5b-9(m) and SC5b-9. Consequences for interpretation and terminology. *Scand J Immunol*, 1987. 26(4): p. 381-6.
15. Kabir, J., M. Lobo, and I. Zachary, Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem J*, 2002. 367(Pt 1): p. 145-55.
16. Nicoletti, I., et al., A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1991. 139(2): p. 271-9.
17. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992. 119(3): p. 493-501.
18. Vermes, I., C. Haanen, and C. Reutelingsperger, Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, 2000. 243(1-2): p. 167-90.
19. Burger, A., et al., Up-regulation of intracellular calcium, cyclic adenosine monophosphate and fibronectin synthesis in tubular epithelial cells by complement. *Eur J Immunol*, 1999. 29(4): p. 1188-93.
20. Soane, L., et al., C5b-9 terminal complement complex protects oligodendrocytes from death by regulating Bad through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Immunol*, 2001. 167(4): p. 2305-11.
21. Nauta, A.J., et al., The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *Eur J Immunol*, 2002. 32(3): p. 783-92.
22. Mallat, Z., et al., Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*, 1999. 99(3): p. 348-53.
23. Bombeli, T., et al., Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood*, 1997. 89(7): p. 2429-42.
24. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood*, 1999. 93(11): p. 3831-8.
25. Trouw, L.A., et al., C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack. *J Biol Chem*, 2007.

26. de Beer, F.C., et al., Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J*, 1982. 47(3): p. 239-43.
27. Griselli, M., et al., C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med*, 1999. 190(12): p. 1733-40.
28. Kushner, I., M.L. Broder, and D. Karp, Control of the acute phase response. Serum C-reactive protein kinetics after acute myocardial infarction. *J Clin Invest*, 1978. 61(2): p. 235-42.
29. Neumann, F.J., et al., Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*, 1995. 92(4): p. 748-55.
30. Yasuda, M., et al., The complement system in ischemic heart disease. *Circulation*, 1990. 81(1): p. 156-63.
31. Fitch, J.C., et al., Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation*, 1999. 100(25): p. 2499-506.
32. Halas, Y.A., et al., Serum C-reactive protein and complement proteins in patients with acute myocardial infarction. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2005. 27(3): p. 405-16.
33. Oksjoki, R., et al., Complement regulation in human atherosclerotic coronary lesions. Immunohistochemical evidence that C4b-binding protein negatively regulates the classical complement pathway, and that C5b-9 is formed via the alternative complement pathway. *Atherosclerosis*, 2007. 192(1): p. 40-8.

Figure 1. Cells were selected by the side and forward scatters. Cells delimited by gate one (G1), i.e. with high side (SSC) and forward (FSC) scatter, were considered intact cells while cells in gate two (G2) were considered apoptotic bodies or other cell fragments. Results are expressed as the percentage of cells positive for C5b-9.

Figure 2. Patients treated by PEX had strikingly decreased levels of the terminal complement components C5a (a), sC5b-9 (b) and MAC, both on intact cells (c) and cell fragments (d) when compared with levels at admission. *P-value calculated on adjusted means ≤ 0.05 .

Figure 1.

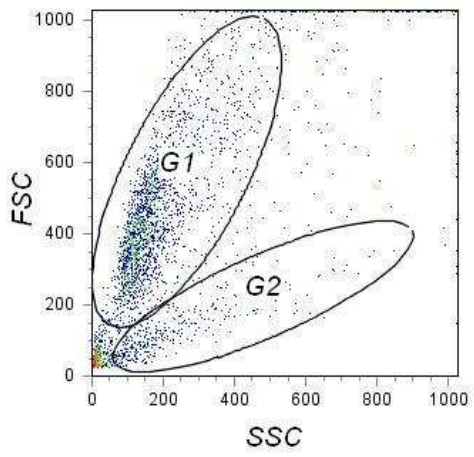
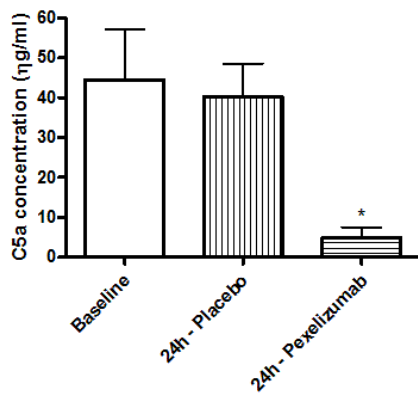
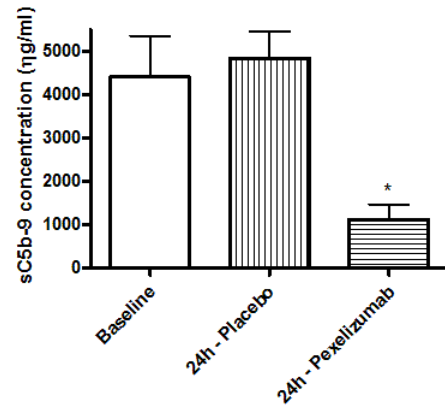


Figure 2.

a.



b.



c.

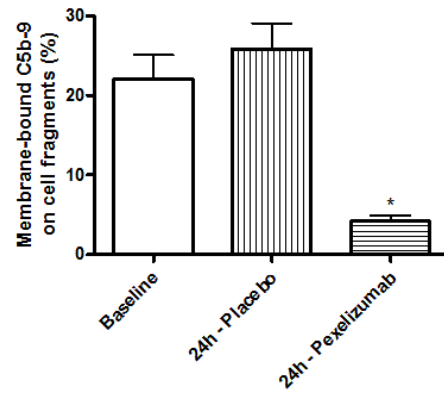
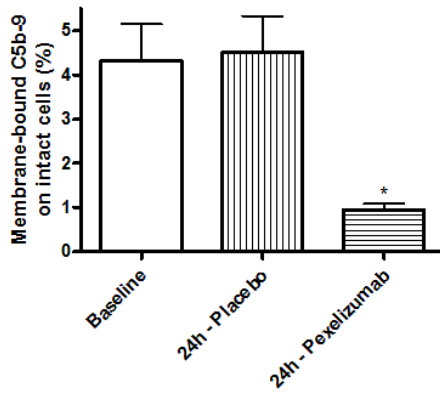


Table 1. Baseline Characteristics, Timeliness and procedural details according to randomized study assignment*

<i>Parameters</i>	<i>Substudy at MHI</i>		<i>APEX-AMI trial worldwide</i>	
	<i>(N=45)</i>		<i>(N=5745)</i>	
	<i>Placebo</i> <i>(n=21)</i>	<i>Pexelizumab</i> <i>(n=24)</i>	<i>Placebo</i> <i>(n=2885)</i>	<i>Pexelizumab</i> <i>(n=2860)</i>
Age, median (IQR)	62 (58-70)	60 (52-59)	61 (52-71)	61 (51-71)
Gender, Men (%)	16 (76.2)	21 (87.5)	2251 (78.02)	2169 (75.8)
Body Weight, median (IQR), kg	81 (68-86)	80 (70-84)	80 (70-91)	80 (70-91)
Clinical history, %				
<i>Prior MI</i>	19.1	16.7	12.3	11.9
<i>Prior CHF</i>	4.7	4.2	3.6	3.7
<i>Diabetes Mellitus</i>	14.3	12.5	16.2	15.5
<i>Current smokers</i>	42.9	37.5	43.6	42.9
Treatment in-hospital, %				
<i>ASA</i>	20 (95.2)	24 (100)	2802 (97.1)	2771 (96.9)
<i>Thienopyridine</i>	19 (95.0)	23 (95.8)	2673 (92.7)	2648(92.6)
<i>Statins</i>	21 (100)	23 (95.8)	2626 (91.0)	2602 (91.0)
<i>B-blockers</i>	19 (95.0)	21 (87.5)	2442 (84.6)	2426 (84.8)
Procedural outcomes, No. (%)				
<i>TIMI-3 flow</i>	16 (76.2)	20 (83.3)	2482 (86.0)	2491 (87.1)
<i>TIMI-2 flow</i>	0 (0)	1 (4.8)	198 (6.9)	167 (5.8)
Stent usage, No. (%)	19 (90.5)	18 (75.0)	2561 (88.8)	2563 (89.6)

Abbreviations: IQR, Interquartile range; MI, myocardial infarction; CHF, congestive heart failure; TIMI, Thrombolysis in Myocardial Infarction.

*Percentages may not sum to 100 due to rounding.

Table 2. Complement proteins levels at baseline and 24 hours after perfusion of placebo and pexelizumab

<i>Parameters</i>	<i>Placebo</i>		<i>Pexelizumab</i>		<i>p</i>
	Baseline	24h	Baseline	24h	
MBL, η g/mL	485.5 \pm 85.8	512.2 \pm 116.3	316.2 \pm 60.3	321.2 \pm 60.2	0.778
Bb, μ g/mL	17.0 \pm 0.9	17.0 \pm 1.09	18.5 \pm 0.8	17.2 \pm 0.8	0.423
C3a, η g/mL	1617.9 \pm 135.1	1420.9 \pm 70.5	1543.8 \pm 110.3	1363.5 \pm 88.7	0.776
C4a, η g/mL	230.6 \pm 37.4	208.9 \pm 20.2	133.9 \pm 17.7	134.1 \pm 15.3	0.094
C5a, ηg/mL*	31.1 \pm 5.3	39.3 \pm 9.0	27.9 \pm 8.5	2.3 \pm 0.2	\leq0.0001
sC5b-9, ηg/mL*	4269.2 \pm 680.5	4240.8 \pm 526.9	3924.0 \pm 321.9	1132.0 \pm 343.1	\leq0.0001
MAC, %					
Intact cells*	4.29 \pm 0.79	4.51 \pm 0.82	4.37 \pm 0.84	0.94 \pm 0.14	\leq0.0001
Cell fragments*	26.97 \pm 3.2	25.87 \pm 3.21	16.94 \pm 3.0	4.18 \pm 0.68	0.033

Data are means \pm SEM

**p*-values comparing changes between baseline values and 24 hours values in the PEX group versus the placebo group are statistically significant.

Table 3. Inflammatory markers

<i>Parameters</i>	<i>Placebo</i>		<i>Pexelizumab</i>	
	Baseline	24h	Baseline	24h
In serum				
<i>CRP mg/L</i>	3.91 ± 1.05	15.22 ± 5.56	3.31 ± 1.08	16.16 ± 5.56
In supernatants				
<i>IL-1β, ηg/mL</i>	27.2 ± 3.0	23.1 ± 2.6	29.3 ± 2.9	26.1 ± 2.5
<i>IL-1ra, ηg/mL</i>	233.3 ± 22.4	200.6 ± 2.7	223.0 ± 23.0	220.8 ± 30.8
<i>IL-4, ηg/mL</i>	31.4 ± 3.4	26.6 ± 2.7	32.7 ± 3.0	30.1 ± 2.7
<i>IL-6, ηg/mL</i>	2224.5 ± 260.4	1990.7 ± 201.5	2318.7 ± 290.5	1853.0 ± 177.0
<i>IL-10, ηg/mL</i>	7.01 ± 1.6	6.0 ± 1.2	8.6 ± 1.7	6.7 ± 1.7
<i>IL-12, ηg/mL</i>	31.0 ± 4.2	30.2 ± 4.8	37.1 ± 7.5	29.3 ± 3.0
<i>INF-γ, ηg/mL</i>	329.3 ± 32.7	279.4 ± 30.6	336.3 ± 31.2	306.1 ± 27.3
<i>IP-10, ηg/mL</i>	1745.2 ± 328.1	1471.1 ± 297.3	1572.1 ± 216.8	1269.5 ± 218.4
<i>RANTES, ηg/mL</i>	9854.6 ± 1296.3	7887.8 ± 1228.8	8972.8 ± 1755.5	8776.2 ± 1479.0
<i>TNF-α, ηg/mL</i>	192.2 ± 18.1	165.9 ± 16.5	196.6 ± 15.9	183.6 ± 15.4

Data are means ± SEM

Table 4. Apoptosis inductions in HUVECs exposed to the serum from patients treated either with Placebo or Pexelizumab, at admission and 24 hours post-PCI.

<i>Parameters*</i>	<i>Placebo</i>		<i>Pexelizumab</i>	
	Baseline	24h	Baseline	24h
Annexin+/Pi-, %	15.5 (1.0)	13.42 (1.01)	15.5 (1.3)	14.85 (1.23)
DNA fragmentation, %	28.5 (5.3)	23.45 (1.9)	27.6 (3.7)	24.5 (1.6)
TUNEL, %	8.5 (4.3)	4.81 (0.73)	5.8 (2.1)	5.25 (0.89)

Data are means (SEM)

5.5 Présentation de l'article #4

Le quatrième article diffère des articles précédents en ce sens qu'il vise davantage à expliquer le rôle du complément dans l'interaction inflammation-thrombose dans les maladies coronariennes aiguës. Cette fois, nous tentons d'illucider les effets d'une activation plaquettaire dans un contexte d'hypercholestérolémie, sur la production d'effets délétères engendrés par l'activation du complément. Les plaquettes sont des éléments clés dans l'hémostase, la thrombose, l'inflammation et les dommages vasculaires [378, 379]. Tel que nous l'avons décrit dans les chapitres précédents, plusieurs études ont démontré une association sans équivoque entre l'activation plaquettaire et l'activation du complément dans les maladies coronariennes aiguës [183, 184, 307, 380]. L'hypercholestérolémie fait partie des facteurs de risques des maladies cardiovasculaires et a été décrite comme étant une source de potentialisation d'activation du complément. Cependant, aucune étude à ce jour ne décrit l'effet de l'hypercholestérolémie sur l'activation du complément par les plaquettes activées. Dans ce quatrième article, nous avons d'abord voulu soulever les effets de l'hypercholestérolémie sur l'activation du complément par les plaquettes activées. Dans un deuxième temps, nous avons analysé les effets d'un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, l'atorvastatine, sur cette activation. Nous avons par le fait même caractérisé les interactions existant entre les microparticules issues de l'agrégation plaquettaire et l'activation du complément avant et après la prise de statine. Les résultats de notre étude suggèrent que l'atorvastatin pourrait réduire les effets délétères engendrés par une activation excessive de la phase terminale du complément par les plaquettes activées chez les patients hypercholestérolémiques.

Dans cette étude, nous avons soulevé que :

- L'activation du complément par les plaquettes activées est potentialisée très tôt par une aggrégation au collagène.
- La production d'anaphylatoxines pro-inflammatoires est augmentée dans l'hypercholestérolémie, et ce principalement suivant une aggrégation au TRAP et au collagène
- La production de microparticules plaquettaires suite à l'activation des plaquettes est augmentée dans l'hypercholestérolémie, et ce principalement suivant une aggrégation au collagène.
- L'atorvastatine diminue l'activation du complément, et plus particulièrement sa phase terminale (C5a et C5b-9).
- L'atorvastatine diminue la formation de microparticules plaquettaires et la présence de C5b-9 à leur surface.

Participation des différents auteurs de la publication N°4 :

CM : Mise au point des méthodes, conceptualisation du projet, expériences, stratégies expérimentales, analyse des résultats et écriture du papier

SM : Expériences et stratégies expérimentales

PM : Stratégies expérimentales

AB : Conceptualisation du projet, stratégies expérimentales et analyse des résultats

PT : Conceptualisation du projet, analyse des résultats et écriture du papier

Article en préparation

Atorvastatin attenuates the increased platelet-mediated complement activation
in hypercholesterolemic patients

Catherine Martel, MSc; Said Matar, BSc; Pascal Maurice PhD; Arnaud Bonnefoy, PhD;
Pierre Théroux, MD

Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Catherine Martel was supported with a Doctoral Research Award from the Canadian
Institutes of Health Research (CIHR)

Address correspondence to Pierre Théroux, 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

Background. A growing number of evidences address a role for complement activation in plaque progression, destabilisation and rupture and thrombus stabilization. One of the mechanisms underlying such effects is suspected to be the numerous interactions existing between complement, platelets and high-density lipoprotein (HDL) levels. Herein, we aim to characterize platelet- and PMP-mediated complement activation in patients with hypercholesterolemia and to explore the effect of the lipid-lowering drug atorvastatin on platelet- and PMP-mediated complement activation.

Methods. Platelet aggregates and platelet microparticles (PMP) following platelet-rich plasma (PRP) aggregation from normal controls (N=10) and stable hypercholesterolemic patients before and after a 6-week treatment with atorvastatin 40 mg (N=5) were measured. Complement activation was determined by the anaphylatoxins generation and the assembly of membrane attack complex (C5b-9) on aggregating platelets and PMP. C3a, C4a and C5a production and C5b-9 assembly on aggregating platelets were measured by flowcytometry, with either cytometric bead array (CBA) or using an anti-human MAb specifically reacting with a neoepitope on poly-C9 factor and expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

Results. In healthy volunteers C5b-9 expression on membranes of aggregated platelets correlates with P-selectin expression and percentage of aggregation ($p < 0.0001$). After 5 minutes, collagen-activated platelets bear 1.6-, 2.1- and 2.4-fold more C5b-9 on their membranes ADP-, TRAP- and A23187-activated platelets. By contrast to C5a (NS), C3a and C4a production following platelet aggregation vary according to the agonist used ($p = 0.045$ and $p < 0.0001$, respectively). In hypercholesterolemic patients, no correlation was observed between the percentage of aggregation and the expression of C5b-9 among aggregates ($p = \text{NS}$). Within all groups, C5b-9 expression on platelets aggregated by collagen and subsequently measured proximal ($p < 0.0001$) and terminal anaphylatoxins levels ($p = 0.016$), PMP production and C5b-9 expression on released PMP tend to be increased in patients with untreated hypercholesterolemia. Atorvastatin lowered those effects, with a marked reduction of C5a production (0.001) and PMP release (0.016).

Conclusion. Platelet-mediated complement activation is agonist-dependant and enhanced in hypercholesterolemic patients, but manageable by a 6-week atorvastatin therapy. Statin therapy following collagen aggregation has decreased C5b-9 expression in platelet aggregates, completely stunt C5a production, and diminished PMP release and C5b-9 expression on PMP. Consequently, we suggest that atorvastatin could reduce the deleterious effects of platelet-mediated complement activation.

Key Words

Complement activation, platelets, platelet microparticles, terminal complement complex, hypercholesterolemia, atorvastatin.

INTRODUCTION

Complement activation is a crucial mechanism that bridges innate and adaptive immunity and it is also a major contributor to inflammation. In the setting of coronary artery disease, complement activation is mainly characterized by the presence of activated complement and regulatory proteins or complement receptors within the atherosclerotic lesions or in areas of recent and old myocardial infarctions [1-3]. It was recently suggested that many of these proteins also contributed to plaque progression, destabilization and rupture, and to thrombus stabilization [4, 5].

Dyslipidemia is an important risk factor for the development of coronary artery disease as well as a contributing factor to the progression of atherosclerosis. The relationship between dyslipidemia and complement activation is suggested in many studies implying dyslipidemic patients. One of them attests that serum levels of C3 and C4 correlate significantly with serum lipid levels in hyperlipidemia [6, 7]. High plasma concentrations of complement sC5b-9 were detected in hypercholesterolemic patients [8] and inversely related to high-density lipoprotein HDL [8, 9]. In addition, experimental studies have convincingly demonstrated that different forms of low-density lipoprotein (LDL) promote complement activation [10-12]. Indeed, enzymatically-modified LDL can bind, either directly or via C-reactive protein (CRP), the protein C1q thus activating the classical pathway of complement [11],[13]. Similarly, acetylated-LDL can initiate the activation of the lectin pathway through its binding to L-ficolin[14]. It has been demonstrated that high levels of plasma CRP, as described in hypercholesterolemia, were sensitive to therapy with atorvastatin and rosuvastatin [15]. Thus, it was further described that high plasma values of C3 and C4 in primary hypercholesterolaemia were reduced by lowering lipid levels with atorvastatin [7].

Platelets play key roles in numerous physiological and pathological processes, such as hemostasis, inflammation, thrombosis and vascular injury,[16, 17] and they are closely associated with complement activation in acute coronary disease. It is well known that complement activation promotes platelet activation,[18, 19] leading to the progression of

disease. Conversely, activated platelets support the activation of both the classical and alternative pathways through the binding of platelet's gC1qR to C1q globular heads or through the binding of platelet' P-selectin to C3b, respectively [20, 21]. In addition, upon platelet activation, pro-coagulant and pro-atherogenic vesicles, also named microparticles (PMP), are released in the circulation, constituting approximately 70% to 90% of all circulating microparticles. [22] Elevated PMP levels are associated with arterial thrombosis [23, 24] and PMP have also been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis as well as the regulation of angiogenesis [25, 26]. Yin and colleagues provided evidence that PMPs were able to support complement activation in situ [27].

Despite these observations, little is actually known about the underlying mechanisms of platelet-mediated complement activation in hypercholesterolemia. Accordingly, this study was designed to characterize platelet- and PMP-mediated complement activation in patients with hypercholesterolemia and to explore the effect of the lipid-lowering drug atorvastatin on platelet- and PMP-mediated complement activation.

METHODS

Study population

This study include a total of 15 subjects of at least 18 years of age, 5 of whom had untreated but stable hypercholesterolemia (fasting LDL >3.5 mmol/L measured twice over a 5-day period). Patients in the hypercholesterolemic group receive atorvastatin (40 mg) for a period of 6 weeks. The control group consist of 10 healthy volunteers without known coronary artery disease and free from any medication that interfere with platelet function for at least 10 days.

The study protocol was reviewed and approved by the Montreal Heart Institute Ethics Committee, and all patients provided written informed consent before inclusion.

Blood sampling

Twenty mL of blood were withdrawn from the antecubital vein at baseline and at the end of the 6-week treatment with atorvastatin. The first 2 mL were discarded and the remaining 18 mL were transferred in plastic tubes containing 0.105 M sodium citrate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Platelets aggregation

Blood samples were centrifuged at 130g for 15 minutes at room temperature, the platelet-rich plasma (PRP) was removed and centrifuged a second time at 1800g for 15 minutes at room temperature to obtain platelet-poor plasma (PPP). All aggregation studies were performed with a Chrono-log aggregometer 570 (Chrono-log Corporation, Havertown, PA, USA) using PRP adjusted to 250 000 platelets/ μ L and activated with either 5 μ M adenosine diphosphate (ADP), 10 μ M thrombin receptor agonist peptide (TRAP), 2.5 μ g/mL collagen and 50 μ M calcium ionophore A23187.

In studies involving healthy volunteers, the kinetic of aggregation was assessed at 30 seconds, five and ten minutes while aggregation was assessed for 10 minutes because of a strict limitation in blood sampling volume. In all patients, non-activated PRP was used as

a negative control for both platelets and complement activation. Aggregation at every time point was expressed as a percentage of aggregation. Following platelet aggregation, 50 µg/mL of Nafamostat Mesilate (BD Pharmingen™ FUT-175) was added to stabilize the samples.

Study parameters

C5b-9 expression on platelets aggregates

After the addition of FUT-175, samples were centrifuged at 1800g for 15 minutes, the supernatant was separated from platelets and frozen immediately at -70°C for further analyses. The isolated platelets were resuspended in a phosphate buffer saline solution (PBS) containing 1% bovine serum albumin (BSA), 10 mM EDTA and 5% goat serum. Suspensions were left at room temperature for 1 hour in order to prevent non-specific binding. The samples were then centrifuged at 1800g for 15 minutes and supernatants were discarded. Platelets were resuspended in a PBS solution containing 1% BSA, 10 mM EDTA and 1% goat serum.

The formation of the terminal complement complex on the aggregated platelets was assessed by flow cytometry (Coulter EPICS XL Flow Cytometer™, Beckman Coulter, Florida, USA) and confocal microscopy (Yokogawa CSU-X, Calgary, Alberta, Can.). A mouse anti-human C5b-9 (DakoCytomation, Denmark) was added to the platelets suspensions and incubated for 30 minutes at room temperature. The platelets were then washed, centrifuged at 500g during 10 minutes and resuspended in a PBS solution containing 1% BSA and 1% goat serum. A secondary antibody (Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L), Invitrogen Canada Inc, Burlington, Ont., Can.) was added to the platelet suspensions and incubated for 30 minutes. The platelets were then washed twice and resuspended in Annexin-binding buffer (140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4). The platelets were stained with an Alexa Fluor 647 Anti-human CD62P (P-selectin) antibody (BioLegend, San Diego, CA, USA) for either flow cytometry

or confocal microscopy analyses, and with Pacific Blue® Annexin V (BioLegend) for confocal microscopy. The platelets then were washed and analysed by flow-cytometry and confocal microscopy. For flow-cytometry analyses, platelets were selected by the side and forward scatters to exclude debris. Presence of C5b-9 and P-selectin expression was expressed as mean of fluorescence intensity (MFI).

Complement activated products

Anaphylatoxins levels were measured in PRP supernatants. The supernatants were thawed at 4°C overnight and centrifuged at 8000g for 5 minutes to pellet and discard remaining platelets. An initial amount of 11.1 µL of supernatant was needed to perform the analyses. The remaining supernatant was kept for further analyses. The levels of the anaphylatoxins C3a, C4a and C5a were measured with a particle-based immunoassay (BDTM Cytometric Bead Array, San Diego, CA, USA). In these kits, beads of distinct fluorescence intensities are coated with specific capture antibodies specific to complement fragments. The PRP supernatant was incubated for 2 hours with the respective beads, then washed and incubated for 1 hour with the PE-conjugated detection antibodies. The sandwich complexes formed were detected with a Coulter EPICS XL flow cytometer equipped with an argon laser at 488 nm wavelength (Coulter EPICS XL Flow Cytometer™, Beckman Coulter, Florida, USA), and measured using BD CBA Software applying a 4-parameter curve fit. The sensitivity of the assays for C4a is 10.5 µg/mL, for C3a, 4 µg/mL, and for C5a 1.2 µg/mL. Intra- and inter-assay coefficient of variations ranged between 3% and 5% and 11% and 16%, respectively.

Platelet microparticles measurement by flow cytometry

Analyses of PMPs were conducted using the supernatants from the complement activated products assays. Following the incubation of the supernatants with a mix of fluorescent beads of varied diameters (Megamix reagent, Biocytex, Marseille, France), PMPs were identified by flow cytometry based on their size and light scattering properties,

thus allowing a standardization of the set-up of PMP analysis region (0.5-1 μ M). A PMP gate was established for each experiment.

C5b-9 expression on platelet microparticles

C5b-9 expression was analysed by western blot using the supernatants from the complement activated products assays. The supernatants were pelleted at 100,000g for 1 hour at room temperature, washed twice by ultracentrifugation at 100,000 g at room temperature and then resuspended in calcium/magnesium-free Tyrodes–Hepes buffer.

Microparticle protein concentrations were determined with the BCA assay kit (Fischer Scientific, Ottawa, Ont. Can.) according to the manufacturer's protocol. Each sample was then divided into two equal parts of proteins. Half of each sample was treated with 100 μ mol/L dithiothreitol, and Laemmli buffer containing 10% sodium dodecyl sulfate (Bio-Rad Laboratories, Montreal, Qc, Can.) for 5 minutes at 95°C. Each sample (20 μ g per well) was run on a 10 % SDS-polyacrylamide gel at 80 V for 30 minutes and 140 V for 45 minutes, and then transferred to nitrocellulose membranes at 10 V for 30 minutes. Non-specific binding was prevented by incubating membranes overnight in PBS containing 0.07% Tween 20 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont., Can.) and 5% dried milk. The membranes were washed once with PBS-Tween 20 and incubated with mouse anti-human C5b-9 (DakoCytomation) (1:100 dilution) for 2 hours at room temperature. Afterward, the membranes were washed four times in PBS-Tween 20 and anti-mouse peroxidase-conjugated secondary monoclonal antibody (Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate, Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd, Mississauga, Ont., Can.) was added (1:25,000 dilution) for 1 hour. The membranes were washed again 4 times in PBS-Tween 20 then once in PBS only. Bands were detected by a Western Lightning® Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) and exposed to an Amersham Hyperfilm ECL (Ge Healthcare Bio-Sciences Inc, Baie-d'Urfé, Qc, Can.).

Washed platelets were used as the negative control for C5b-9 expression. Briefly, blood samples were centrifuged at 1800 g for 15 minutes to obtain PRP. Acid-citrate-dextrose (ACD) and prostaglandin E1 (PGE1) were added to the PRP at concentrations of 25% and 0.1%, respectively. The ACD/PGE1-treated suspension was then centrifuged at 1800 g for 15 minutes and the supernatant discarded. The platelets were washed twice in CGS buffer (12.9 mM sodium citrate, 33.33 mM glucose, 123.2 mM NaCl, pH 7), resuspended in calcium-free Tyrodes–Hepes buffer (CFTH) (10 mM Hepes, 5.56 mM glucose, 137 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 2.7 mM KCl, 0.36 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, pH 7.4), and normalized to 2×10^8 /mL.

Statistical analyses

A one-way ANOVA (unequal variances) and, when needed, pairwise comparisons (LSD Method) were used to compare changes between the different time points or groups. A Spearman cross-correlation matrix was built between the various parameters and each coefficient was subsequently tested for significance. Results are presented as means and standard error of mean (SEM), except when indicated. All analyses were performed with SPSS version 14.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) with no correction factors introduced for the multiplicity of analyses. A p-value of 0.05 was considered significant.

RESULTS

Platelet aggregation

As expected, the percentage of aggregation increase in a time-dependent manner in healthy volunteers. Between 30 second and 10 minutes, the percentage of aggregated platelets increases by 1.5- ($p<0.0001$), 1.3- ($p=0.001$), 1.5- ($p<0.0001$) and 13.7-fold ($p=0.007$) in the presence of ADP, TRAP, collagen and A23187, respectively. Furthermore, a constant but slight increase in P-selectin expression is observed, albeit not significant.

C5b-9 expression on platelets

C5b-9 expression on resting and aggregated platelets was assessed by flow cytometry and confocal microscopy. In healthy volunteers, C5b-9 expression increases in a time-dependent manner, with increases of 5- ($p=0.005$), 9- ($p<0.0001$), 4- ($p<0.0001$) and 14-fold ($p=0.020$) in the presence of ADP, TRAP, collagen and A23187, respectively (Figure 1). C5b-9 expression following aggregation with ADP ($p=0.008$), TRAP ($p=0.007$) and collagen ($p=0.001$) is already increased at 5 minutes. Interestingly, the greatest increases are observed on collagen activated platelets, with increases of 1.6-, 2.1- and 2.4-fold greater than those of ADP, TRAP and A23187 at the 5-minute time point, respectively. Figure 2 shows confocal microscopy imaging of C5b-9 staining on collagen-aggregated platelets at the 30 seconds, 5 and 10 minutes time points. Non-specific binding is not detected (Figure 2, upper panels).

Compared with healthy volunteers, baseline C5b-9 expression on collagen-aggregated platelets tends to be greater in hypercholesterolemic patients (Figure 3a) ($p=NS$). However, treatment with atorvastatin reduces C5b-9 expression to a level similar to that of healthy volunteers (Figure 3a and c) (NS).

Irrespective of the agonist used, a positive correlation is observed between C5b-9 expression in platelet aggregates and P-selectin expression in healthy volunteers ($p<0.0001$) (Figure 3a). A strong correlation is also observed between C5b-9 expression and the percentage of aggregation ($p<0.0001$), but not in hypercholesterolemic patients (Figure 3b).

However, confocal microscopy reveals that C5b-9 expression within platelets aggregates did not co-localize with P-selectin expression (figure 4a) or with annexin-V expression (figure 4b).

Complement activated products

Activation of the different complement pathways is assessed by measuring the levels of anaphylatoxins in platelet aggregates supernatants. In healthy volunteers, and in contrast to C5a, C3a and C4a production following platelet aggregation varies according to the agonist used ($p=0.045$ and $p<0.0001$, respectively). Figures 6a and 6b show that C3a and C4a production have similar profiles: no aggregation \geq ADP $>$ TRAP $>$ collagen $>$ A23187, whereas the choice of the agonist has no impact on C5a production ($p=NS$). In hypercholesterolemic patients, however, all agonists have a similar effect on C3a and C4a production (figure 7). Compared with healthy volunteers, C3a and C4a levels are at least twice as high in hypercholesterolemic patients ($p<0.0001$), but C5a levels are essentially the same except for TRAP- and collagen-aggregated platelets where levels are 2- and 2.4-fold greater ($p=0.024$ and $p=0.016$, respectively). Atorvastatin treatment decreases C5a levels to those of healthy volunteers for both TRAP- ($p<0.0001$) and collagen-aggregated platelets ($p=0.001$).

PMP production

The production of PMPs during platelet aggregation is assessed in the supernatant of the platelet aggregates by flow cytometry. In healthy volunteers, PMP production is similar irrespective of the agonist ($p=NS$). However, in hypercholesterolemic patients, PMP production is 1.7- to 2.4-fold higher in the supernatant of TRAP- and collagen-aggregated platelets compared with resting platelets (figure 8a). Furthermore, despite the lack of effect of atorvastatin on TRAP-aggregated platelets, it reduces PMP production by 3-fold when collagen is the agonist ($p=0.016$).

C5b-9 expression on PMP

Following PMP isolation, C5b-9 expression is assessed by western blot. For each experiment, washed platelets are used as the negative control (Figure 8b). Despite an equal initial amount of PMP proteins (20 μ g), PMP generated following collagen-induced platelet aggregation have more C5b-9 on their surface than that of PMP generated in the presence of other agonists (Figure 8b). Furthermore, atorvastatin treatment tends to reverse this effect. Otherwise, no difference is observed when the other agonists were compared.

DISCUSSION

This study is designed to characterize platelet- and PMP-mediated complement activation in patients with hypercholesterolemia and to explore the effect of the lipid-lowering drug atorvastatin on platelet- and PMP-mediated complement activation. The main findings are 1) C5b-9 is expressed on the surface of aggregated platelets, 2) hypercholesterolemia increases the expression of C5b-9, 3) in the absence of high LDL levels, C5b-9 expression is correlated with the percentage of platelet aggregation and P-selectin expression, 4) the levels of the anaphylatoxins C3a and C4a, but not C5a, are decreased following platelet aggregation, 5) hypercholesterolemia is associated with a greater expression of C3a, C4a and C5a, and production of platelet microparticles, 6) microparticles generated following collagen-induced platelet aggregation express more C5b-9 and 7) treatment with atorvastatin inhibits the

While collagen-activated platelets bare more C5b-9 on their membranes at 5 minutes than the other aggregates, calcium ionophore A23187 had a less instant effect than the other agonist on platelets aggregation and thus, on C5b-9 expression. Despite this, platelets activated by A23187 tend to have higher C5b-9 on their surface following a 10 minute aggregation. In addition, C3a and C4a production during platelet aggregation was more pronounced in absence of agonist, and decreased with the agonist strength. The choice of the agonist had no effect on C5a levels, the later remaining relatively low.

Within all groups, C5b-9 expression on collagen-aggregated platelets was higher in patients with untreated hypercholesterolemia, whereas those levels have a propensity to be abrogated by statins. In addition, the anaphylatoxins C3a and C4a levels measured in the activated platelets' supernatants were up 2-fold more elevated in those patients then in healthy volunteers.

Despite this general dissimilarity of C3a and C4a levels between healthy volunteers and pathological cases, C5a production during ADP- and A23187-mediated platelets aggregation remained unchanged between all groups while it was 2-fold higher in untreated

hypercholesterolemic patients during aggregation by TRAP. This effect was even more pronounced in presence of collagen. Our results also demonstrate that Atorvastatin is able to stunt this C5a production by TRAP- and collagen-mediated aggregation.

In concordance with those results, we found that PMP generation during TRAP-, and to a greater degree collagen-mediated aggregation, was abolished by the six weeks statin therapy. Furthermore, our western blot analyses assess that PMP formed during collagen-mediated aggregation bear more C5b-9 on their surface than all other agonist-mediated aggregation and that these formations are closed down by statin therapy.

Platelet-mediated complement activation

The effects of complement on platelet activation are well known [18, 19, 28]. Activation of complement leads to the production of the inflammatory anaphylatoxins C3a, C4a and C5a and the assembly of the terminal membrane attack complex C5b-9. Deposition of sublytic quantities of C5b-9 on platelets enhances platelet activation, which is characterized by the exposure of phosphatidylserine in the outer leaflets of the platelet membrane [29], α - and β -granules secretion and an increase in factor Va binding sites, which promotes the conversion of prothrombin to thrombin [18, 19] thus increasing the procoagulant activity of platelets [30].

More recently, the role of activated platelets as activators of the classical or the alternative pathways of complement has been demonstrated [20, 21]. Our results support these findings as the activation of platelets from healthy subjects resulted in a significant increase in the expression of C5b-9 as well as the production of the anaphylatoxins C3a and C4a. Our results also extend these previous findings in that a positive correlation between C5b-9 expression in platelet aggregates and P-selectin expression the percentage of platelet aggregation were observed. However, C5b-9 was not colocalized with P-selectin or annexin-V within the platelet aggregates. These observations are difficult to interpret. In hypercholesterolemic patients, the expression of C5b-9 on platelets was also increased to a slightly greater extent than that observed in healthy subjects, but the levels of C3a and C4a

were at least twice as high. These observations suggest that other mechanisms are involved in complement activation. Indeed, Ruef and colleagues have demonstrated the involvement of properdin, a positive regulatory protein, in leukocytes activation and the formation of platelet/leukocytes aggregates [31]. It is possible that the increased complement activation we observed in hypercholesterolemic patients was due, at least in part, to the presence properdin in the plasma.

PMP-mediated complement activation

In addition to the lytic activity associated with the insertion of C5b-9 in cell membranes, it can modulate, in sublytic doses, several cellular functions such as cell activation, proliferation and apoptosis. As some of these effects can become deleterious, cells have developed different mechanisms to limit the insertion of C5b-9 within their membranes. Indeed, Sims and colleagues demonstrated that C5b-9-damaged platelets underwent vesiculation to release these proteins from the plasma membrane thus restoring the integrity of the [32]. These vesicles, named platelet microparticles, have been shown to display procoagulant activity through the binding of coagulation factors VIII and Va and to have a higher binding-site densities for these proteins than those on platelet membranes [33, 34].

Platelet microparticles were found to be elevated in stress-induced platelet activation [35] and in patients with acute coronary syndrome [36, 37]. Biro and colleagues demonstrated that subtle, but significant, differences in phospholipid composition existed according to the agonist used to produce the microparticles. When platelets were activated with collagen, thrombin or collagen plus thrombin, the differences observed between agonists paralleled the differences in P-selectin expression [38]. Our results are in agreement with these findings and emphasize the differences associated with the disease state. In healthy subjects, the production of PMP was similar irrespective of the agonist. However, following activation with TRAP and collagen, the levels of PMP detected in hypercholesterolemic patients were 1.7- to 2.4-fold higher than those of resting platelets.

Furthermore, despite the lack of effect of atorvastatin on TRAP-induced PMP production, it reduced collagen-induced PMP production by 3-fold.

Only recently has it been demonstrated, in patients with rheumatoid arthritis, that cell microparticles present in the synovial liquid had some complement proteins such as C1q, C4 and C3 on their membranes [39]. This suggests that microparticles may initiate complement activation by the classical pathway and produce pro-apoptotic and pro-inflammatory reactions via the complement activated proteins. With respect to platelets, Yin and colleagues have recently demonstrated that the PMP generated following incubation with the calcium ionophore A23187 expressed various complement regulatory and activated proteins such as gC1qR/p33, C1-INH, CD55 and CD59, which suggest the ability of PMP to support complement activation in situ [27]. They also suggested that both platelets and PMP were responsible for the accumulation of complement activated products at site of vascular injury. Thus, complement activation occurring at site of injury could be beneficial in clearing platelet debris from the site of injury whereas the dysregulation of complement activation could contribute to inflammation and thrombosis [40, 41]. Our results are in agreement with these findings in that activation of platelet with various agonists resulted in the expression of C5b-9 on PMP, with the highest expression following activation with collagen.

Hypercholesterolemia and complement activation

Hypercholesterolemia, which includes hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels, is a deleterious pathology that enhances the development of atherosclerosis. Many evidences emphasize on the interaction existing between hypercholesterolemia and complement activation. It has been reported that high plasma values of C3 and C4 were found in primary hypercholesterolemia. Numerous investigations have gauged complement activation by the different LDL forms [10-12]. Half a decade ago, studies have shown that enzymatically-modified LDL (E-LDL) can promote complement activation by several mechanisms. When present in moderated

concentrations ($< 100 \mu\text{g/mL}$), E-LDL binds, via C-reactive proteins, the protein C1q and thus activates the classical pathway of complement [11]. Of interest, the subsequent complement activation can only be generated at the proximal level of complement activation, since no terminal complement complex formation can be observed in that specific situation. The same study shows that, by contrast, when present in high concentrations (i.e. $100\text{--}200 \mu\text{g/mL}$), E-LDL can directly bind C1q. More recently, it has been found that, in conditions close to the physiological situation, E-LDL can directly bind to the C1 complex and thus enhance complement activation by the classical pathway [13]. Another type of pro-atherogenic LDL, acetylated-LDL (A-LDL), has been found to activate complement activation [14]. By contrast to E-LDL, A-LDL would initiate the lectin pathway activation by binding to L-ficolin, a well-known co-factor of this pathway. Unfortunately, no mechanism underlying this activation has been described yet.

Low HDL levels have also been identified as enhancers to complement activation [42]. Indeed, many studies performed in proteomics have addressed an association between HDL levels and some complement regulation proteins, such as C1 inhibitor, factor H, clusterin and vitronectin [43, 44].

Effects of atorvastatin on platelets activation and PMP production

Atorvastatin lowers cholesterol through the inhibition of the enzyme HMG-CoA reductase. It is also known to reduce platelet function [45], and to abrogate platelet activation in a dose-dependent manner through cholesterol-dependent and -independent mechanisms [46]. Indeed, a recent study revealed that platelet reactivity and a proinflammatory chemokine were significantly reduced by atorvastatin 40 mg than by ezetimibe plus atorvastatin 10 mg [47]. In our study, a 6-week atorvastatin treatment reduced C5b-9, C3a and C4a and PMP to levels similar to those of healthy subjects.

Effects of atorvastatin on complement activation

Very few studies have addressed the potential role of statins on complement activation, and the results have been controversial [48, 49]. In the study conducted by Mason and colleagues, they observed that statins stimulated DAF expression on the surface of endothelial cells and they suggested that the modulation of the complement regulatory protein expression may contribute to the early beneficial effects of statins in atherosclerosis through their capacity to enhanced protection against complement-mediated injury. In addition, a recent study conducted in patients with rheumatoid arthritis demonstrated that atorvastatin treatment regulated positively CD59 production, another complement regulation protein produced by endothelial cells during hypoxia [50]. As well, atorvastatin inhibited the production of C3 and C9 in addition to the cell lysis. It was also suggested that the inhibition of the HMG-CoA reductase in vascular smooth muscle cells reduced both the proinflammatory and the mitotic effect of C5b-9 through the downregulation of the activation of NF- κ B and AP-1, and the inhibition of ERK1/2 activation [28]. In humans, several studies have described the ability of atorvastatin to reduce complement activation. In patients with high C3 and total cholesterol levels, treatment with atorvastatin (10 mg/day) plus vitamin E (600 IU/day) for 3 months resulted in the sustained lowering of C3 levels [51]. In our study, confocal microscopy analyses revealed that C5b-9 expression on PMP released following collagen-induced platelet aggregation was abolished by a 6-week atorvastatin treatment.

In summary, the results of this study demonstrate that platelet-mediated complement activation is agonist-dependent and enhanced by hypercholesterolemia. Atorvastatin treatment reduced the expression of many complement components such as C5b-9, PMP and C5a but had little effect on the proximal anaphylatoxins C3a and C4a production. Consequently, we suggest that atorvastatin could reduce the deleterious effects of platelet-mediated complement activation.

REFERENCES

1. Torzewski, J., et al., Processes in atherogenesis: complement activation. *Atherosclerosis*, 1997. 132(2): p. 131-8.
2. Yasojima, K., et al., Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 2001. 158(3): p. 1039-51.
3. Bhakdi, S., Complement and atherogenesis: the unknown connection. *Ann Med*, 1998. 30(6): p. 503-7.
4. Kastl, S.P., et al., In human macrophages the complement component C5a induces the expression of oncostatin M via AP-1 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(3): p. 498-503.
5. Kastl, S.P., et al., The complement component C5a induces the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human macrophages via NF-kappaB activation. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(8): p. 1790-7.
6. Ylitalo, K., et al., Serum complement and familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, 1997. 129(2): p. 271-7.
7. Sampietro, T., et al., Upregulation of the immune system in primary hypercholesterolaemia: effect of atorvastatin therapy. *J Intern Med*, 2005. 257(6): p. 523-30.
8. Pasqui, A.L., et al., Complement activation in hypercholesterolemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2000. 10(3): p. 137-42.
9. Pasqui, A.L., et al., Relationship between serum complement and different lipid disorders. *Clin Exp Med*, 2002. 2(1): p. 33-8.
10. Bhakdi, S., et al., On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med*, 1995. 182(6): p. 1959-71.
11. Bhakdi, S., et al., Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence. *Circulation*, 2004. 109(15): p. 1870-6.
12. Wieland, E., et al., Complement activation by oxidatively modified low-density lipoproteins. *Eur J Clin Invest*, 1999. 29(10): p. 835-41.
13. Biro, A., et al., Modified low density lipoproteins differentially bind and activate the C1 complex of complement. *Mol Immunol*, 2007. 44(6): p. 1169-77.
14. Steinberg, D., Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, 1997. 95(4): p. 1062-71.
15. Qu, H.Y., et al., Effect of Atorvastatin Versus Rosuvastatin on Levels of Serum Lipids, Inflammatory Markers and Adiponectin in Patients with Hypercholesterolemia. *Pharm Res*, 2008.
16. Franchini, M., D. Veneri, and G. Lippi, Inflammation and hemostasis: a bidirectional interaction. *Clin Lab*, 2007. 53(1-2): p. 63-7.
17. Esmon, C.T., Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2003. 1(7): p. 1343-8.

18. Wiedmer, T., C.T. Esmon, and P.J. Sims, On the mechanism by which complement proteins C5b-9 increase platelet prothrombinase activity. *J Biol Chem*, 1986. 261(31): p. 14587-92.
19. Wiedmer, T., C.T. Esmon, and P.J. Sims, Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase. *Blood*, 1986. 68(4): p. 875-80.
20. Peerschke, E.I., et al., Blood platelets activate the classical pathway of human complement. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(9): p. 2035-42.
21. Del Conde, I., et al., Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J Exp Med*, 2005. 201(6): p. 871-9.
22. Horstman, L.L. and Y.S. Ahn, Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1999. 30(2): p. 111-42.
23. Lee, Y.J., et al., Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res*, 1993. 72(4): p. 295-304.
24. Mallat, Z., et al., Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2000. 101(8): p. 841-3.
25. Kim, H.K., et al., Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol*, 2004. 124(3): p. 376-84.
26. Tan, K.T. and G.Y. Lip, The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 2005. 94(3): p. 488-92.
27. Yin, W., B. Ghebrehiwet, and E.I. Peerschke, Expression of complement components and inhibitors on platelet microparticles. *Platelets*, 2008. 19(3): p. 225-33.
28. Viedt, C., et al., HMG-CoA reductase inhibition reduces the proinflammatory activation of human vascular smooth muscle cells by the terminal complement factor C5b-9. *Basic Res Cardiol*, 2003. 98(6): p. 353-61.
29. Bevers, E.M., et al., Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1439(3): p. 317-30.
30. Sims, P.J., S.A. Rollins, and T. Wiedmer, Regulatory control of complement on blood platelets. Modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b-9 complex. *J Biol Chem*, 1989. 264(32): p. 19228-35.
31. Ruef, J., et al., The complement factor properdin induces formation of platelet-leukocyte aggregates via leukocyte activation. *Platelets*, 2008. 19(5): p. 359-64.
32. Sims, P.J. and T. Wiedmer, Repolarization of the membrane potential of blood platelets after complement damage: evidence for a Ca⁺⁺ -dependent exocytotic elimination of C5b-9 pores. *Blood*, 1986. 68(2): p. 556-61.
33. Sims, P.J., et al., Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem*, 1988. 263(34): p. 18205-12.
34. Gilbert, G.E., et al., Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J Biol Chem*, 1991. 266(26): p. 17261-8.
35. Hodis, H.N., Triglyceride-rich lipoprotein remnant particles and risk of atherosclerosis. *Circulation*, 1999. 99(22): p. 2852-4.

36. Nomura, S., et al., Enzyme immunoassay detection of platelet-derived microparticles and RANTES in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*, 2003. 89(3): p. 506-12.
37. Namba, M., et al., Circulating platelet-derived microparticles are associated with atherothrombotic events: a marker for vulnerable blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(1): p. 255-6.
38. Biro, E., et al., The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(12): p. 2754-63.
39. Biro, E., et al., Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann Rheum Dis*, 2007. 66(8): p. 1085-92.
40. Speidl, W.S., et al., Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis. *Eur Heart J*, 2005. 26(21): p. 2294-9.
41. Vlaicu, R., et al., Immunohistochemical localization of the terminal C5b-9 complement complex in human aortic fibrous plaque. *Atherosclerosis*, 1985. 57(2-3): p. 163-77.
42. Hamilton, K.K., J. Zhao, and P.J. Sims, Interaction between apolipoproteins A-I and A-II and the membrane attack complex of complement. Affinity of the apoproteins for polymeric C9. *J Biol Chem*, 1993. 268(5): p. 3632-8.
43. Rezaee, F., et al., Proteomic analysis of high-density lipoprotein. *Proteomics*, 2006. 6(2): p. 721-30.
44. Vaisar, T., et al., Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest*, 2007. 117(3): p. 746-56.
45. Puccetti, L., et al., Platelet hyperactivity after statin treatment discontinuation. *Thromb Haemost*, 2003. 90(3): p. 476-82.
46. Undas, A., K.E. Brummel-Ziedins, and K.G. Mann, Statins and blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(2): p. 287-94.
47. Piorkowski, M., et al., Treatment with ezetimibe plus low-dose atorvastatin compared with higher-dose atorvastatin alone: is sufficient cholesterol-lowering enough to inhibit platelets? *J Am Coll Cardiol*, 2007. 49(10): p. 1035-42.
48. Lappégard, K.T., T. Hvassing, and T.E. Mollnes, Statin drugs do not affect serum complement activation in vitro. *Scand J Immunol*, 2004. 60(1-2): p. 178-83.
49. Mason, J.C., et al., Statin-induced expression of decay-accelerating factor protects vascular endothelium against complement-mediated injury. *Circ Res*, 2002. 91(8): p. 696-703.
50. Kinderlerer, A.R., et al., Statin-induced expression of CD59 on vascular endothelium in hypoxia: a potential mechanism for the anti-inflammatory actions of statins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2006. 8(4): p. R130.
51. Muscari, A., et al., Short term effect of atorvastatin and vitamin E on serum levels of C3, a sensitive marker of the risk of myocardial infarction in men. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2001. 15(5): p. 453-8.

Figure 1. Kinetic of C5b-9 formation of agonists-aggregated platelets at 30 seconds, 5 minutes and 10 minutes in healthy volunteers.

Figure 2. Kinetic of C5b-9 expression on collagen-aggregated platelets after 30 seconds, 5 minutes and 10 minutes. Figures in the upper row illustrate collagen fibres (blue arrows) whereas an isotype was used to point-out non-specific binding. Figures in the bottom row show both collagen fibres (blue arrows) and C5b-9 complex formation (red arrows).

Figure 3. Correlation between C5b-9 formation on platelet aggregates and P-selectin expression (a) and C5b-9 formation on platelets aggregates and the % of platelet aggregation (b) in healthy volunteers, before aggregation and at 30 seconds, 5 minutes and 10 minutes of aggregation.

Figure 4. C5b-9 formation on platelet aggregates does not co-localize with P-selectin expression (a) or annexin-V labelling (b). Red arrows point to C5b-9 and lavender arrow point to annexin-V. The red structures on figure «a» represent p-selectin expression.

Figure 5. C5b-9 formation (a and c) and % of aggregation (b) in all patients categories following collagen-mediated platelet aggregation. C5b-9 density on platelets aggregated by Collagen 2.5 μ M during 10 minutes analysed in all patients by flow cytometry (a) and in hypercholesterolemic patients before and after Atorvastatin therapy by confocal microscopy (c).

Figure 6. C3a (a), C4a (b) and C5a (c) measurement following platelet aggregation in healthy volunteers. *P-values are significant at 0.05.

Figure 7. Effect of Atorvastatin 40 mg on C3a (a), C4a (b) and C5a (c) secretion following platelet aggregation by agonists. *P-values are significant at 0.05.

Figure 8. Effect of Atorvastatin 40 mg on PMP production following platelets aggregation assessed by flow cytometry (a), and on C5b-9 formation on PMP as detected by western blot analysis (b). Grey level analyses of the western blot (c.). Detected C9 neoepitope ~ 66 kDa. *P-values are significant at 0.05.

Figure 1.

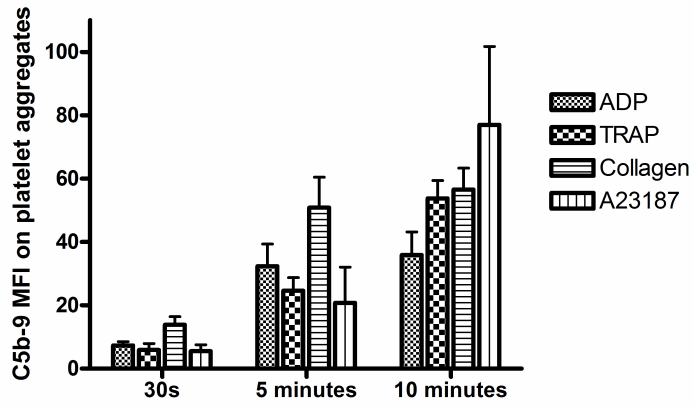


Figure 2.

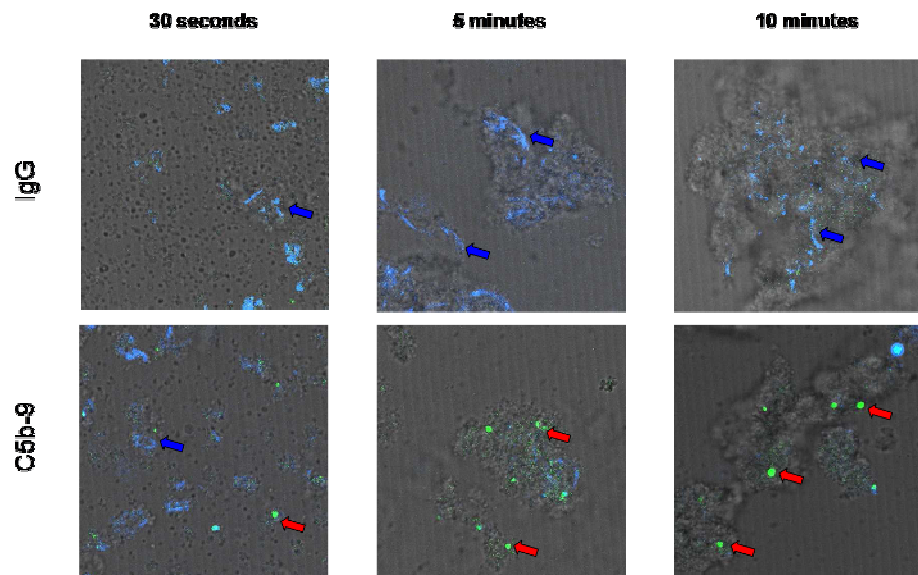
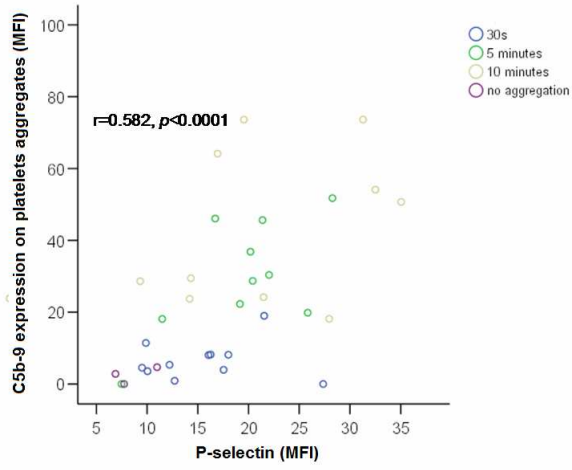


Figure 3.

a.



b.

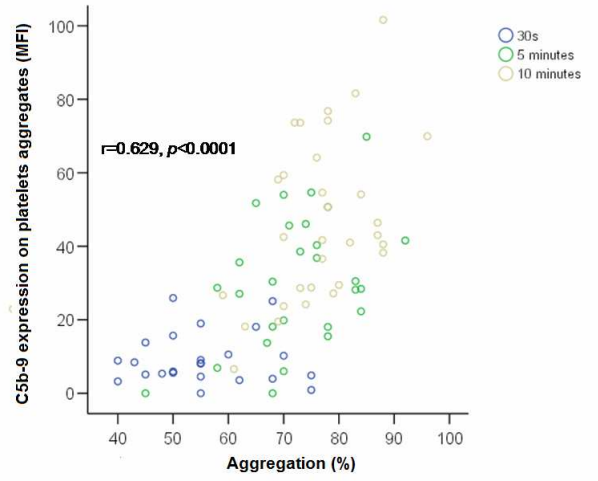
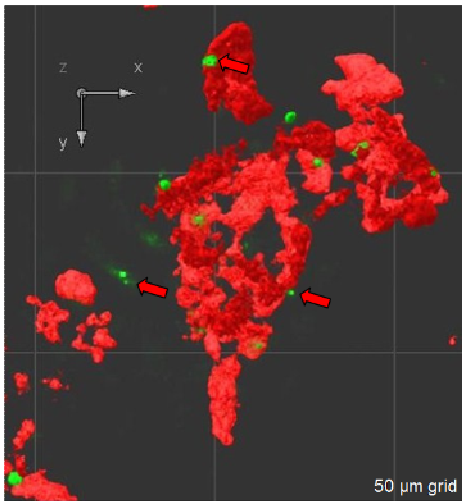


Figure 4.

a.



b.

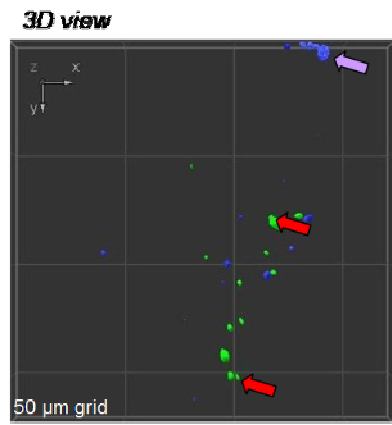
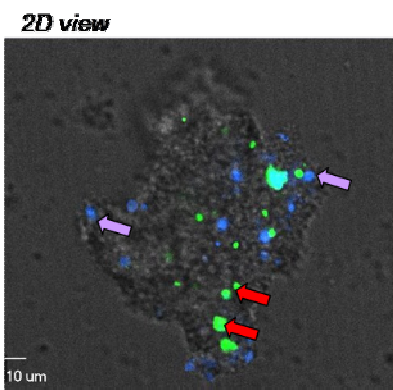
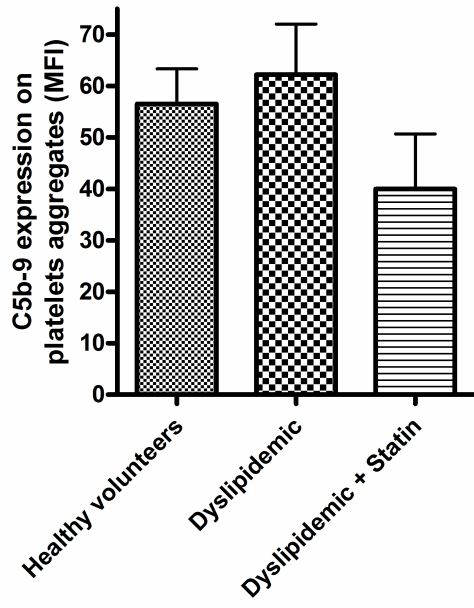
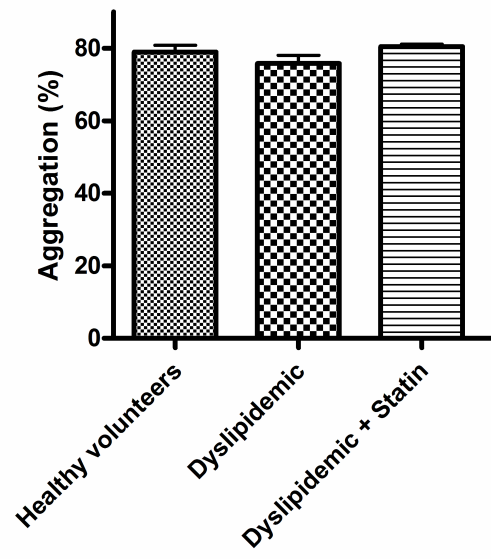


Figure 5.

a.



b.



c.

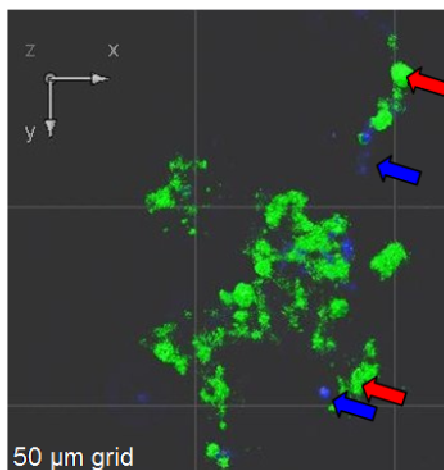
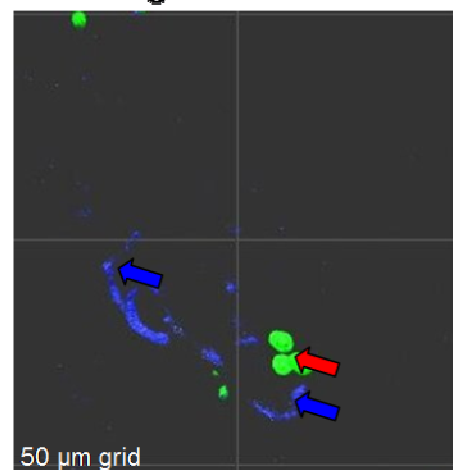
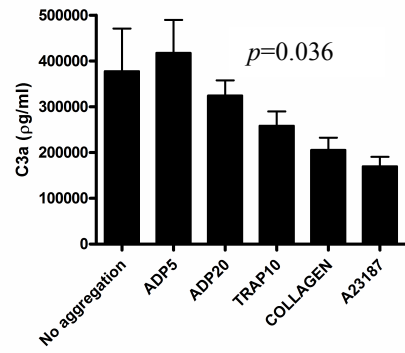
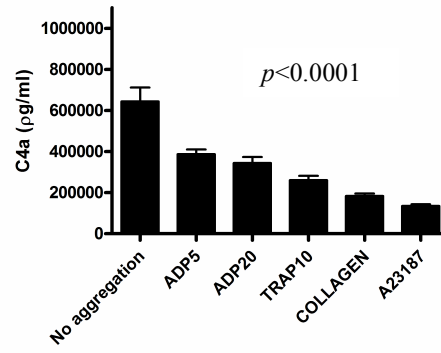
Before statin treatment**Following 6 weeks statin treatment**

Figure 6.

a.



b.



c.

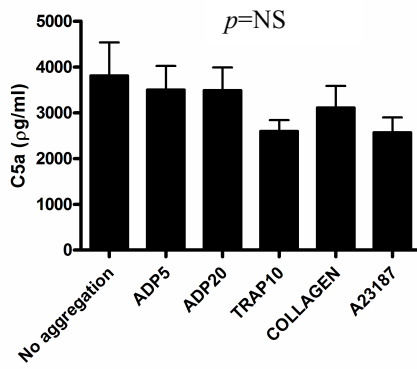


Figure 7.

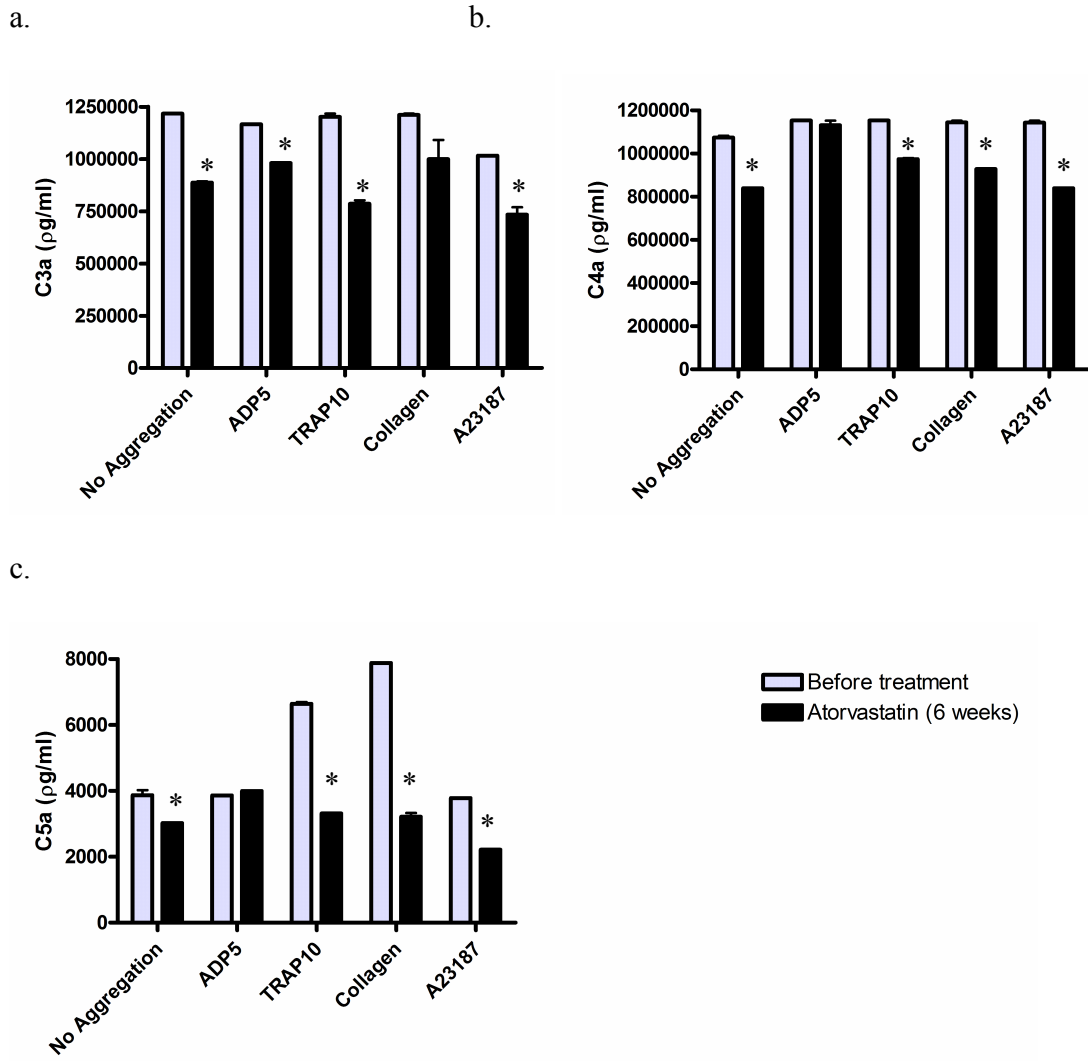
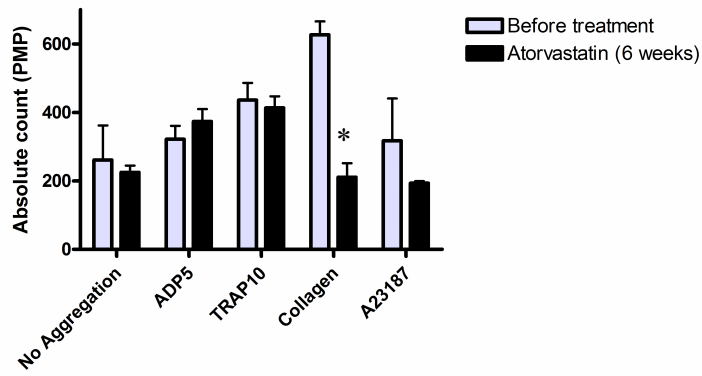
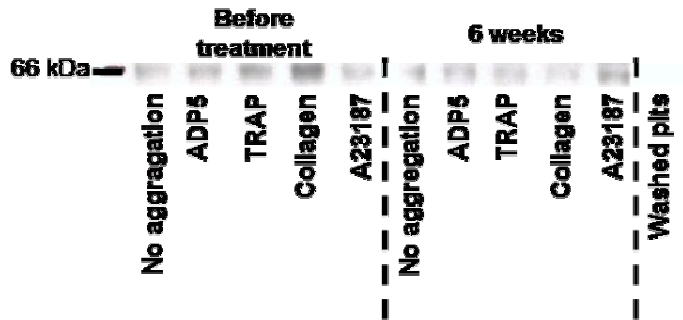


Figure 8.

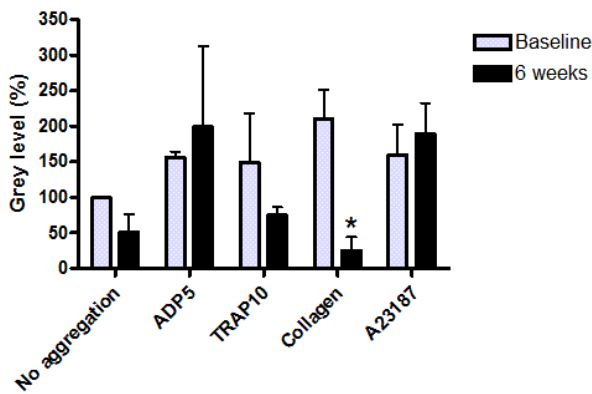
a.



b.



c.



6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le but ultime de mon programme de doctorat fut de trouver les cibles potentielles d'un traitement qui viserait à diminuer l'incidence des SCA. Dans l'objectif de faire ressortir les caractères particuliers qui émanent d'une activation du complément dans les SCA, j'ai travaillé avec plusieurs pathologies relatives à une occlusion totale ou partielle des artères coronaires.

Un premier groupe sur lequel j'ai travaillé fut composé de donneurs sains, sans maladie coronarienne connue. Le recrutement de donneurs sains consentants m'a permis d'effectuer les mises au point techniques de mes projets. Cette banque de patients sert évidemment d'outils de référence et de comparaison pour divers phénomènes biologiques dont, entre autre, l'activation du complément, l'effet des composantes sériques sur l'apoptose des cellules endothéliales en culture, l'activation plaquettaire, la formation des microparticules et la propension à l'agrégation plaquettaire. Le deuxième groupe nécessaire à l'étude du rôle physiopathologique du complément dans la maladie athérotrombotique incluait des sujets hypercholestérolémiques stables (>3.5 mmol/L à jeun), sans antécédents de maladie cardiovasculaire, non traités, mais chez qui un traitement par statine est indiqué. Au moment de l'étude, ces patients n'étaient pas sous l'effet de médicaments pouvant interférer avec la fonction plaquettaire, la coagulation ou le métabolisme des lipides. Nous avons administré à ces patients un traitement quotidien de 40 mg d'atorvastatine durant 6 semaines.

Un troisième groupe à l'étude était formé de patients avec angine stable documentée, généralement quotidiennement traités par statines, aspirine et/ou clopidogrel. Ces patients nous ont aussi servi de point comparatif à plusieurs niveaux (mêmes caractéristiques mentionnées précédemment) avec les SCA, compte tenu du degré inférieur d'acuité de la maladie. Une quatrième groupe à l'étude consistait en un regroupement d'individus ayant subis un infarctus du myocarde et ne présentant pas d'élévation du

segment ST (segment associé à la repolarisation du ventricule gauche) à l'électrocardiogramme (ECG) (chapitre 1, figure 4). Tout au long de cette discussion, ces patients seront présentés comme des patients avec NSTEMI (*non-ST segment elevation myocardial infarction*). Ces patients ont été recrutés dans nos études car ils avaient été admis à l'hôpital pour cause de douleurs thoraciques persistantes (plus de 10 minutes) ou répétitives survenues dans les 12 heures précédant leur admission. Les patients devaient présenter des niveaux de troponines T au-dessus des valeurs physiologiques normales (0.03 µg/L). Habituellement, ces patients sont traités dès leur arrivée par une thérapie anti-plaquettaire (aspirin, clopidogrel) et anti-coagulante (héparine, héparine non-fractionnée) [28].

Par opposition à ce groupe, le cinquième groupe de patients recrutés comportait des individus ayant eu des douleurs thoraciques moins de 6 heures avant de s'être présentés à l'urgence. Contrairement au groupe précédent, ces patients présentaient un sus-décalage du segment ST à l'ECG. Ils seront nommés tout au long de la discussion STEMI (*ST-segment elevation myocardial infarction*). Comme dans le groupe des patients avec NSTEMI précédent, ces patients atteints comportent une ischémie myocardique aiguë, c'est-à-dire qu'une partie du cœur est subitement privée d'oxygène. Bien que ces deux sous-groupes de SCA soient tous deux issus de l'érosion ou de la rupture de la plaque athérosclérotique, ils sont pris en charge différemment, selon qu'ils s'accompagnent ou non d'un sus-décalage persistant du segment ST. L'élévation persistante du segment ST nécessite une recanalisation rapide, complète et prolongée par un traitement thrombolytique ou une angioplastie primaire, puisqu'elle représente généralement une occlusion coronarienne aiguë totale. À l'ECG, le segment ST représente une phase de repolarisation ventriculaire complète. Conséquemment, un sus-décalage persistant du segment ST indique que la propagation électrique dans le muscle cardiaque au niveau ventriculaire est interrompue. Or, une prolongation de ce segment isoélectrique reflète l'infarctus d'une zone étendue du cœur.

Un autre trait particulier à ce groupe de patients est qu'il a été recruté dans le cadre de l'étude multicentrique APEX-AMI (*Assessment of PEXelizumab in Acute Myocardial Infarction*) [377]. Pour faire partie de l'étude, les patients sélectionnés étaient seulement ceux pour qui une angioplastie primaire était planifiée. Dans le protocole de l'étude, deux prélèvements étaient prévus : l'un avant l'angioplastie, l'autre 24 heures après l'intervention. Voyons plus en détails les précisions concernant cette étude marquante.

6.1 Assessment of PEXelizumab in Acute Myocardial Infarction (APEX-AMI)

Au cours de mon cursus, j'ai eu la chance de participer à la réalisation de la plus grande étude mondiale effectuée chez des patients avec infarctus aigus du myocarde (STEMI) traités par angioplastie coronarienne percutanée primaire (PCI) : l'étude APEX-AMI (*Assessment of PEXelizumab in Acute Myocardial Infarction*). Puisque cette population de patients nous a permis d'effectuer plusieurs sous-études relatives à l'état inflammatoire attribué aux SCA, il s'avère important de comprendre le contexte d'investigation qui a conduit à la mise en place de cette étude de phase III. La figure 11 représente les sous-études et leurs hypothèses sous-jacentes que nous avons réalisées dans le laboratoire du Dr Pierre Théroux.

Le contexte de la nécessité de développer un traitement apte à réduire la taille de l'infarctus et, ultimement, à diminuer la mortalité post-infarctus chez les patients à haut-risque a été décrit en détail dans la présentation des articles 2 et 3 (section 5.3 et 5.4). En résumé, nous retiendrons que le développement d'un inhibiteur de l'activation de la protéine C5 du complément vise à contrôler l'apparition et conséquemment les effets d'un «no-reflow» chez les patients avec STEMI à haut risque.

Tel que nous l'avons décrit dans l'introduction de cette thèse, l'inflammation est un processus impliqué dans le développement de l'athérosclérose [5, 15, 381, 382] comme dans les complications aiguës qui découlent de la rupture de la plaque [8, 180, 383]. De plus, elle est l'élément central des dysfonctions microcirculatoires subséquentes et des complications relatives aux techniques de reperfusion de tissus lésés [384].

En plus d'être lui-même activé par le processus inflammatoire, nous avons vu précédemment que le complément joue un rôle primordial dans la propagation de l'inflammation [201, 385, 386], de la cascade de la coagulation [251, 317] et dans l'apoptose [285]. Les effets délétères de l'activation du complément dans les infarctus du myocarde peuvent se présenter sous plusieurs formes : régulation positive des gènes impliqués dans la production de cytokines, l'interruption de l'activité de l'oxyde nitrique synthase, l'activation des leucocytes et des cellules endothéliales et l'augmentation de l'apoptose [257]. Les études ont démontré que les effets potentiellement délétères du complément dans les maladies inflammatoires étaient engendrés majoritairement par la

phase terminale de la cascade (chapitre 4), les investigations portant sur l'inhibition de l'activation de la protéine C5 du complément.

En 1996, un anticorps monoclonal humanisé qui reconnaît le C5 a été développé : le h5G1.1 scFv, qui plus tard prendrait le nom de pexelizumab [387]. Dans son étude, la compagnie *Alexion Pharmaceuticals (Alexion Pharmaceuticals, Inc, Cheshire, CT)* a conclu que cette molécule consistait en un inhibiteur potentiel des effets néfastes d'une suractivation du complément dans les maladies inflammatoires. Cette étude, jumelée avec celle de Vakeva en 1998, a clairement démontré à travers des modèles expérimentaux que l'inhibition de l'activation de la protéine C5 diminuait la taille de l'infarctus par sa capacité à inhiber l'apoptose et l'infiltration des leucocytes au site de la lésion [384].

Évidemment, par la suite, les chercheurs travaillant de concert avec la compagnie pharmaceutique ont tenté de reproduire ces résultats dans une série d'études de phase II effectuées à la fois dans les STEMI et les pontages aorto-coronariens (PAC, *on-pump coronary artery bypass grafting*). Le but premier de ces études était donc de déterminer si une inhibition de l'activation du C5 par le pexelizumab pouvait contribuer à diminuer la taille de l'infarctus, observable par une diminution des niveaux de créatine kinase MB dans ces états physiopathologiques inflammatoires. Que ce soit lors de son utilisation dans les pontages aorto-coronariens [388] ou dans les STEMI traités par des agents fibrinolytiques [389] ou par PCI [97], le pexelizumab s'est avéré inefficace dans son objectif principal de diminuer la taille de l'infarctus. De manière surprenante, la mortalité s'est avéré significativement modifié par l'utilisation de l'anticorps monoclonal : la mortalité. Dans les études effectuées chez les patients subissant un PAC ou un PCI, la même constante a été retrouvée, soit la diminution du taux de mortalité dans les 30 jours suivant les interventions. Une méta-analyse incluant un total de 5916 patients provenant de quatre études randomisées (pexelizumab vs. placebo) suggère que le pexelizumab serait un réducteur significatif de la mortalité [390].

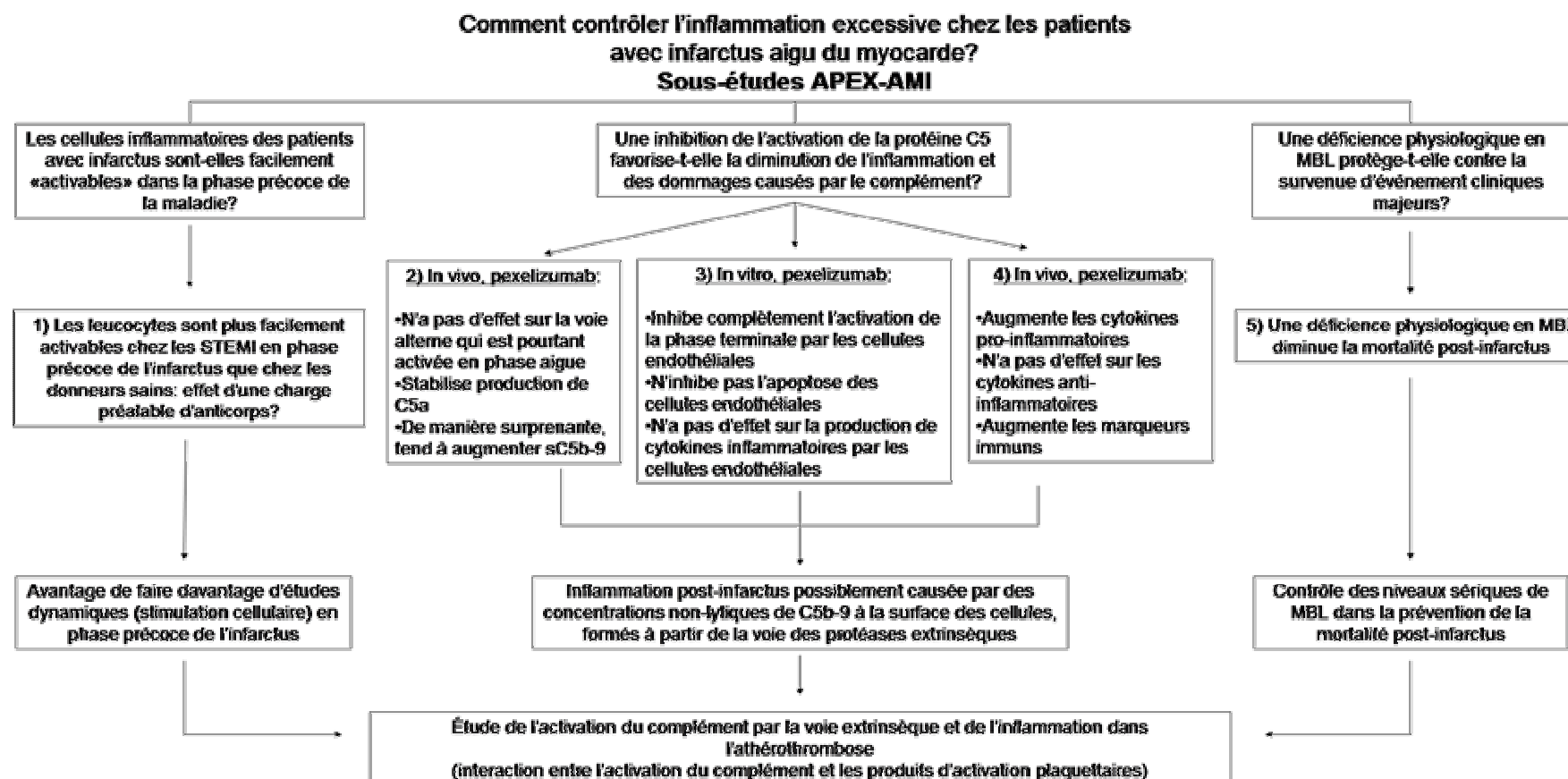


Figure 11. APEX-AMI : outil pour une meilleure compréhension des mécanismes d'activation du complément dans les SCA.

Enthousiastes de détenir peut-être la clé qui permettrait de réduire la mortalité post-PCI, les investigateurs de cette série d'études ont lancé les études de phase III munies du pexelizumab comme élément central. À la surprise générale, les études subséquentes n'ont pas répondu adéquatement aux attentes : aucun bénéfice quant à la mortalité n'a été attribué au pexelizumab. Que ce soit chez les 5745 patients avec STEMI recrutés dans l'étude APEX-AMI (*Assessment of PEXelizumab in Acute Myocardial Infarction*) [377] ou chez les 2746 patients de l'étude PRIMO-CABG (*Pexelizumab for Reduction in Myocardial Infarction and MOrtality in Coronary Artery Bypass Graft surgery*) [391], aucune différence significative n'a été observée entre l'utilisation du pexelizumab ou du placebo. Bien que les résultats des études de phase III en PAC aient aussi suscité une grande controverse, notre attention sera évidemment portée ici sur l'étude APEX-AMI. La figure 12 représente le protocole suivi par les 296 centres des 17 pays participants à l'étude APEX-AMI. À l'institut de cardiologie, nous avons recruté un total de 58 patients.

Avant de voir les effets d'une inhibition de l'activation de la protéine C5 du complément, voyons d'abord l'activation «naturelle» du complément dans la maladie coronarienne. Nous reviendrons un peu plus loin sur les résultats de l'inhibition avec Pexelizumab.

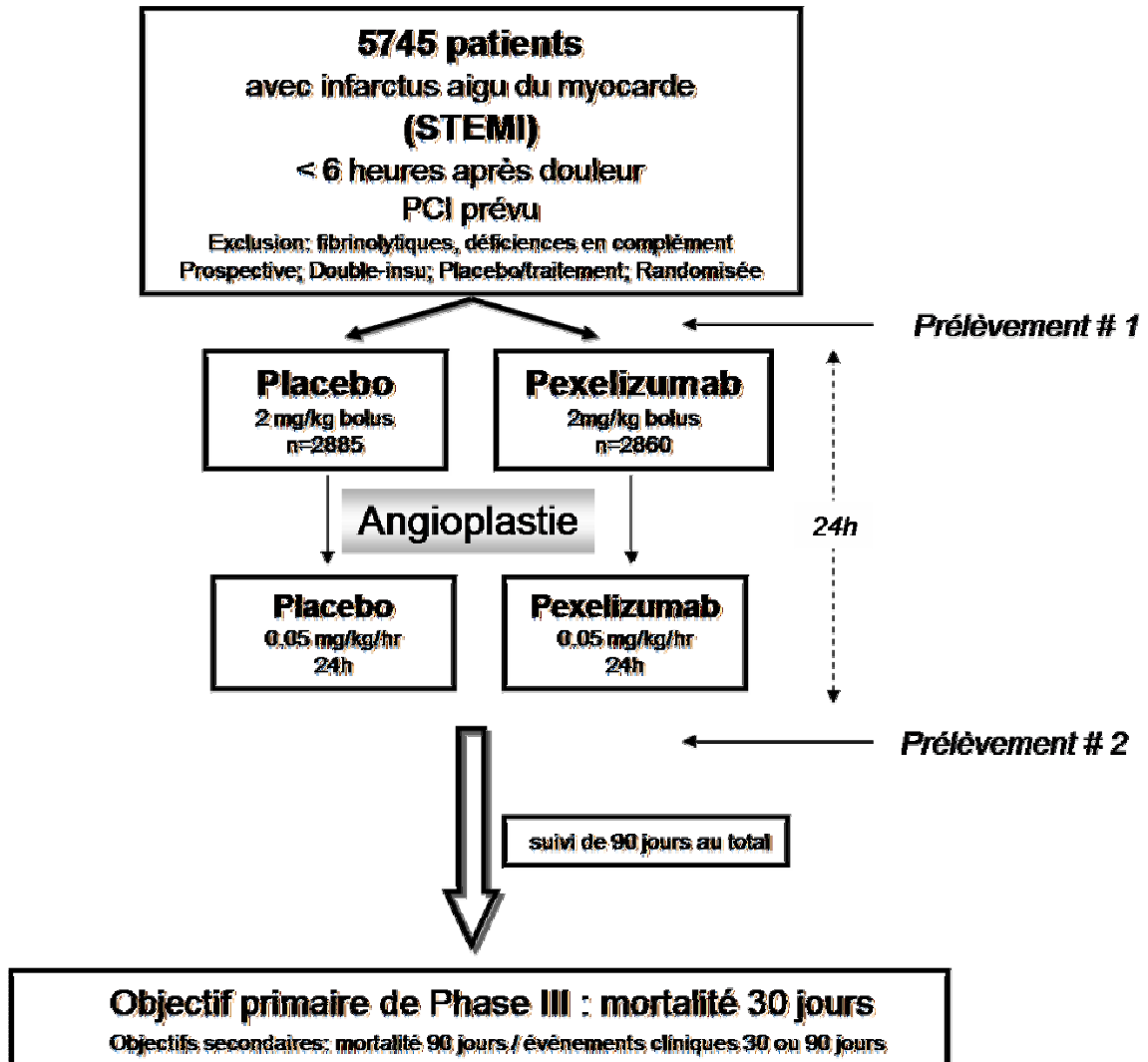


Figure 12. Étude APEX-AMI

6.2 Le complément a-t-il un rôle dans les phases chroniques et aiguës de la maladie coronarienne ?

Des recherches ont démontré que les patients subissant un infarctus aigu du myocarde devenaient plus à risque de souffrir d'un syndrome coronarien aigu subséquent [392, 393]. Qu'elles sont les caractéristiques qui rendent ces patients «à risque» de subir un infarctus ou des SCA post-infarctus récurrent ?

Les efforts investis pour diminuer les risques de développer un infarctus du myocarde sont nombreux. Aujourd'hui les médecins prennent connaissance des divers facteurs de risques connus prédisposant à des maladies coronariennes aiguës dans le but de prendre en charge les patients «à risque» [1]. Bien que le suivi rigoureux et le contrôle de certains facteurs de risque modifiables ont permis une meilleure gestion des cas de SCA, les cas d'infarctus persistent de manière encore trop fréquente dans le monde. Puisque d'importantes études ont démontré que les SCA pouvaient survenir sans même la présence des facteurs de risque conventionnels [3, 4], les chercheurs se sont penchés sur un autre mécanisme potentiellement responsable de l'avènement des SCA : l'inflammation.

Nous avons décrit précédemment que l'inflammation joue un rôle prépondérant dans l'initiation, la progression et les complications de l'athérosclérose [5, 6]. Le contrôle du processus inflammatoire devient donc une cible de choix dans le traitement des maladies coronariennes aiguës. Les chercheurs tendent conséquemment d'identifier des marqueurs inflammatoires potentiels responsables de l'inflammation et des conséquences connues des SCA. Le TNF- α , le CD40-ligand, le SAA, le ICAM-1, l'IL-6, l'IL-18, la myéloperoxydase sont quelques uns des éléments qui ont été identifiés comme marqueurs inflammatoires prédictifs des maladies coronariennes aiguës [17, 394-401]. Plusieurs études ont aussi visé à caractériser les protéines du complément susceptibles de potentialiser ou d'inhiber la survenue des SCA : les protéines totales (C1q, C3, C4, MBL) [402-404], des ratios de protéines totales (C3/C4) [405], certains peptides activés (C5a, sC5b-9) [319, 404], des protéines régulatrices (inhibiteur de la C1-estérase, facteur H) [406] ou des récepteurs du complément (CD11b/CD18, gC1qR) [407] ont été identifiés

comme éléments potentiels prédisposant à l'apparition de SCA. Les études ont conduit à la mise en place de traitements visant à contrôler les niveaux sanguins de ces protéines (inhibiteurs de protéases, régulateurs solubles du complément, anticorps thérapeutiques, inhibiteurs des composantes du complément, antagonistes des récepteurs, protéines recombinantes) [408]. Malheureusement, aucun de ces traitements ne s'est avéré pleinement efficace dans la diminution de la prévalence des SCA ou des événements post-infarctus. Publiée en 2008, l'étude JUPITER [32], dirigée par le Dr Paul Ridker, a révélé qu'une diminution des taux plasmatiques de CRP par le rosuvastatin diminuait la mortalité indépendamment des niveaux de cholestérol sanguin. L'auteur suggère que la mesure de la CRP plasmatique chez tous les patients à risques d'infarctus s'impose. Malgré des résultats suprenants, cette étude qui a fait et qui fera encore verser beaucoup d'encre reste controversée : les uns soulèvent le manque de sujets- contrôles adéquats (sujets avec niveaux de CRP normaux ou sujets avec cholestérol élevé), et les autres estiment que les chances de succès et de bénéfices relatifs à la détection d'une CRP élevée et d'un traitement éventuel sont trop minces pour effectuer de telles procédures (déséquilibre coût/bénéfice)⁵.

Dans une étude qui sera publiée au début de l'année 2009⁶, nous avons investigué le phénomène d'inflammation des SCA de manière originale. Nous avons caractérisé le statut d'activation des leucocytes circulants dans la phase aiguë de l'infarctus du myocarde chez des patients à haut risque (STEMI). Nos résultats ont démontré que, après stimulation par divers agonistes (thrombin receptor agonist peptide (TRAP, 10 μ M) and phorbol myristate acetate (PMA, 240 μ g/L), les leucocytes était «hyper-répondeurs» dans les premières heures

⁵ Ces informations très pertinentes ont été soulevées par des cardiologues lors d'une conférence portant sur l'étude JUPITER présentée par le Dr Pierre Thérioux à l'Institut de Cardiologie de Montréal vendredi le 16 janvier 2009.

⁶ Article non-inclus dans cette thèse dont je serai co-auteure. Cet article réfère à la première sous-question posée dans le plan présenté à la figure 8). (Xiao Z, Martel C, Thérioux P. The dynamic state of leukocytes activation during the acute phase of ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI). En preparation).

suivant l'infarctus par rapport aux donneurs sans maladie coronarienne. Ceci était caractérisé par une expression accrue de CD11b/CD18 (MAC-1 ou C3R) et du facteur tissulaire à la surface des monocytes et des neutrophiles, et du HLA-DR (*human leukocyte antigen DR*) à la surface des lymphocytes T chez les patients avec STEMI. Ces résultats démontrent que les cellules inflammatoires des patients avec STEMI sont facilement activables dans la phase précoce de l'infarctus du myocarde. Conséquemment, l'activation des cellules inflammatoires pourrait déstabiliser la balance de production de cytokines pro- et anti-inflammatoires et contribuer à la susceptibilité du sang circulant à rendre les plaques athéromateuses jusqu'alors stables en plaques vulnérables ou à participer au phénomène de «no reflow» (mauvaise irrigation de l'artère lésée) observé suite à l'angioplastie primaire. À quoi ce phénomène est-il dû ? Bien qu'il soit difficile d'y répondre pour l'instant, nous supposons qu'une quantité importante d'anticorps causée par une inflammation ou une infection chronique persistante pourrait être à l'origine de «l'hyper-réactivité» des leucocytes circulants chez les patients à haut risque. Nous suggérons que l'hyper-réactivité des cellules inflammatoires (leucocytes), c'est-à-dire la capacité des leucocytes à s'activer, serait un élément important à considérer lors de la mesure d'activation leucocytaire chez les patients avec SCA.

Une étude publiée en janvier 2009 rapporte des conclusions similaires impliquant cette fois l'hyper-réactivité de plaquettes [409]. De manière complémentaire à notre étude, ces travaux mettent en évidence que la balance de sécrétion des cytokines pro- et anti-inflammatoires influence la fonction plaquettaire chez les patients avec SCA pour qui une angioplastie est planifiée. Ainsi, un déséquilibre de la balance vers une production de cytokines pro-inflammatoires rend les plaquettes plus facilement «agrégables» chez les patients à haut risque.

Les effets délétères de l'activation du complément dans les infarctus du myocarde peuvent se présenter sous plusieurs formes : régulation positive des gènes impliqués dans la production de cytokines, l'interruption de l'activité de l'oxyde nitrique synthase, l'activation des leucocytes et des cellules endothéliales et l'augmentation de l'apoptose

[257]. Par conséquent, les succès et les échecs connus par nous ou par des groupes différents nous amènent à nous intéresser davantage à l'implication de chacune des voies d'activation du complément dans la production de ces effets indésirables. En ayant une meilleure connaissance des mécanismes qui régulent l'activation de la cascade, de son initiation à la formation de complexes terminaux membranaires ou solubles, nous comprendront mieux le rôle, peut-être central, du complément dans les interactions entre l'inflammation et la thrombose au cours de l'apparition des SCA. Ultiment, nous pourrions identifier des cibles thérapeutiques spécifiques qui permettraient un meilleur contrôle de la maladie coronarienne et des SCA.

6.2.1 Quelle est l'implication de chacune des voies d'activation du complément dans les maladies coronariennes chroniques et aiguës ?

L'apoptose a été décrite comme un phénomène étroitement relié à la dénudation de l'endothélium et la capacité de la plaque à devenir plus «vulnérable» [410-412]. La destruction des cellules endothéliales est en grande partie responsable de l'obstruction microvasculaire observée dans les phénomènes de «no-reflow» [375]. L'apoptose cellulaire est un phénomène de grand intérêt dans le domaine des maladies coronariennes, principalement dans la transition de la plaque stable en plaque vulnérable. Une hypothèse et une méthode de travail originale ont été proposées par Valgimigli il y a quelques années. Les hypothèses abondent dans le sens que certains facteurs circulants produits suite à un infarctus pourraient endommager les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales [392, 393]. Or, le chercheur a voulu prolonger ce raisonnement en tentant d'y établir un lien avec la présence de cellules apoptotiques dans la plaque athérosclérotique [413]. Valgimigli a tenté de prouver le rôle de l'apoptose des cellules endothéliales dans la production des facteurs circulants responsables de l'activation de la plaque. Pour ce faire, l'auteur a utilisé un modèle lui permettant de déterminer l'activité pro-apoptotique du sérum des patients ayant subi un infarctus du myocarde. En incubant le sérum des patients sur une monocouche d'HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), Valgimigli a découvert que le sérum des patients avec SCA engendrait davantage l'apoptose des cellules

endothéliales que celui des patients avec angine stable ou sans maladies coronariennes connues. Après avoir pris connaissance de cette étude, nous avons soulevé la question suivante : Quels facteurs en circulation pourraient être susceptibles d'engendrer l'apoptose des cellules endothéliales ?

L'athérosclérose et les SCA sont des pathologies multifactorielles et il est connu que le complément y soit activé [319, 414, 415]. Une des premières étapes de notre réflexion nous a amené à comparer les rôles relatifs de chacune des voies d'activation du complément dans l'angine stable et les infarctus du myocarde avec et sans élévation du segment ST et, conséquemment, l'implication de l'activation de ces différentes voies dans l'activation, la lyse et l'apoptose des cellules endothéliales.

6.2.1.1 Régulation du complexe lytique dans l'angine stable

Une première constatation originale et étonnante réside dans le fait que nous avons observé des niveaux sériques relativement bas de MBL chez les patients avec angine stable. Cependant, la progression de la cascade a quand même eu lieu, puisque nous avons retrouvé des niveaux sériques élevés de sC5b-9, soit le complexe terminal sous sa forme soluble. De plus, une formation importante de C5b-9 a eu lieu à la membranaire des cellules endothéliales exposées au sérum de ces patients. Les pourcentages de positivité en C5b-9 observés en angine stable étaient proportionnels à ceux observés en SCA. Cependant, à la différence des patients avec SCA, la formation de C5b-9 à la surface des fragments cellulaires était limitée pour les patients avec angine stable, tout comme les niveaux d'apoptose engendrés. Qu'est-ce qui peut expliquer ces résultats qui semblent à priori si controversés ?

Tout d'abord, rappelons que les études concernant l'activation du complément dans l'angine stable sont controversées. En comparant l'activation du complément dans l'angine stable et les complications aiguës, certaines études ont soulevé que l'activation du complément avait lieu seulement dans les infarctus du myocarde, et non dans l'angine stable [282, 386]. À l'inverse, Iltumur a démontré que les niveaux des protéines C3 et C4 du complément seraient significativement élevés en circulation chez les patients avec angine

stable par rapport aux niveaux retrouvés chez des sujets sans maladie coronarienne connue [416]. L'auteur suggère conséquemment que ceci reflète une activation du complément dans ce type de pathologie. Personnellement, nous considérons cette étude incomplète puisqu'elle fait état des protéines totales du complément, sans considérer les peptides d'activation du complément. À la simple lueur de ces résultats, on ne peut déterminer si l'activation subséquente du complément se traduira en une activation de la voie classique ou lectine. Cette distinction s'avère très importante à faire, puisque, tel que décrit dans la section 3.3 de cette thèse, il y aurait des différences quant à l'efficacité des composantes formées par chacune des voies à générer les C5 convertases. Rawal a démontré en 2008 que les peptides C4b produits à partir de l'initiation de la voie lectine sont quatre fois plus efficaces à former les C5 convertases que le sont ceux produits à partir de l'initiation de la voie classique [84]. Ainsi, l'auteur suggère que la cascade du complément par la voie lectine serait de l'ordre de quatre fois plus contributive à l'avènement des pathologies impliquant des réactions inflammatoires que pourrait l'être la voie classique. Les résultats de notre étude sont complémentaires à ceux de Rawal puisque les niveaux relativement faibles de MBL sériques que nous avons observés sont accompagnés de concentrations aussi relativement faibles de C5a. En ayant de faibles concentrations de cette anaphylatoxine majeure, nous pouvons nous attendre conséquemment à être en présence d'une pathologie dont l'inflammation est relativement bien contrôlée, comme dans l'angine stable, par rapport à des pathologies aiguës comme l'infarctus du myocarde.

En faisant la synthèse de ces résultats, on peut s'apercevoir que, dans l'angine stable, l'activation terminale du complément est étroitement régulée puisque le complexe terminal est retrouvé sous sa forme soluble et que les concentrations de C5b-9 à la membrane des cellules endothéliales est en concentration insuffisante pour engendrer la lyse. Si l'on se remet dans le contexte de la pathologie, il est connu que l'inflammation est moins importante dans l'angine stable que dans l'angine instable [417]. Or, nous avons vu dans le chapitre 2 que divers mécanismes de régulation étaient mis en branle dans le but de limiter la lyse cellulaire engendrée par le C5b-9. Nous suggérons que dans l'angine stable,

la liaison de la vitronectine [119] au complexe terminal limiterait la formation du complexe terminal à la surface des cellules, d'où les faibles niveaux d'apoptose et de fragments cellulaires positifs en C5b-9. Conséquemment, il y aurait moins de débris cellulaires et apoptotiques en circulation dans l'angine stable, par rapport au niveau retrouvé lors d'infarctus du myocarde, par exemple. Les complexes terminaux solubles (sC5b-9), et des concentrations non-lytiques de C5b-9 à la surface des cellules engendrent l'activation de certains types cellulaires et augmente la perméabilité vasculaire, mais ne produisent pas les effets délétères encourus par une lyse cellulaire [95, 322, 418]. À notre connaissance, aucune étude ne rapporte directement une telle observation si complète.

6.2.1.2 Activation de la voie alterne, lyse et apoptose cellulaire dans les SCA

En plus de comparer le rôle relatif des voies proximales d'activation du complément dans l'angine stable et le SCA, nous avons tenté de déterminer les éléments distinctifs relatifs à l'activation de la phase terminale du complément dans les deux sous-types de SCA : les NSTEMI et les STEMI. Chez les patients avec SCA, une forte corrélation s'est dessinée entre les niveaux de Bb sériques et les composantes C5a et sC5b-9 issues de l'activation de la voie terminale du complément. À la différence des donneurs sains ou des patients avec angine stable, l'incubation du sérum des patients avec les HUVEC a engendré la lyse et l'apoptose de ceux-ci.

Les caractéristiques distinguant les NSTEMI et les STEMI ont été abordées dans le chapitre 1 et la section 6.1.1. Nous avons vu que, bien que physiologiquement et cliniquement similaires puisqu'ils relèvent tous deux de l'érosion ou de la rupture d'une plaque athéromateuse, ces deux SCA possèdent aussi des propriétés différentes [65]. Dans nos études, l'activation du complément au niveau proximal semble évoluer de manière analogue dans les NSTEMI et les STEMI puisque les niveaux sériques du peptide Bb corrélaient avec les niveaux sériques de C5a et sC5b-9 dans les deux populations. Ces corrélations ne sont pas observables chez les donneurs sains ni chez les patients avec angine stable, ce qui suggère un rôle important pour la voie alterne dans l'activation du complément dans les SCA.

La CRP est une protéine de phase aiguë synthétisée par le foie en réponse à une stimulation par l'interleukine-6. En plus d'avoir démontré que la CRP participait tant à la formation de la plaque athéromateuse qu'à la rupture de la plaque [419], les recherches suggèrent que les niveaux de CRP corrèlent avec le nombre de plaques athérosclérotiques vulnérable [420] et la sévérité de la maladie coronarienne [421]. Or, nous aurions pu nous attendre à avoir des niveaux plus élevés dans les STEMI que dans les NSTEMI, mais ce ne fut pas le cas : bien que les niveaux de CRP sériques fussent élevés par rapport à celui des donneurs sains, aucune différence significative ne fut observée quand aux niveaux de CRP mesurés. L'inflammation systémique, telle que décrite par les niveaux sériques de CRP, est même en moyenne 25% plus élevés chez les patients avec NSTEMI que chez les patients avec STEMI. En phase aiguë, l'élévation des niveaux de CRP est détectable en moyenne 12 heures après le début des douleurs thoraciques chez la majorité des patients avec infarctus du myocarde. De plus, les études démontrent que les niveaux de CRP mesurés chez des patients avec STEMI dans les 24 à 72 heures suivant le début des douleurs thoraciques seraient prédictifs d'événements cliniques dans l'année suivant l'événement [422]. Si nous reprenons les protocoles des articles ci-inclus, nous voyons que les patients avec NSTEMI ont été recrutés dans les 12 heures suivant le début des douleurs thoraciques. Or, chez les patients avec STEMI, les douleurs devaient avoir eu lieu dans les 6 heures suivant l'admission. Cette discordance de temps de prélèvement joue certainement un rôle dans les résultats obtenus.

Dans nos études, les niveaux de CRP corrèlent avec les niveaux sériques du sC5b-9 seulement chez les patients avec sus-décalage du segment ST, là où la nécrose est moins importante que chez les patients avec ST à haut risque. Ce dernier phénomène n'est pas surprenant si l'on considère la littérature qui indique que les niveaux de sC5b-9 dans l'angine instable ne seraient pas proportionnels aux niveaux de troponine-T, une enzyme cardiaque spécifique à la nécrose myocardique [423].

Un autre rapprochement à faire entre les deux types de SCA est la quantité de C5b-9 généré à la surface de fragments de cellules endothéliales. Comme nous l'avons vu

précédemment, la formation de C5b-9 à la surface des cellules endothéliales «intactes» ou non-fragmentées est relativement la même d'un groupe pathologique à l'autre, et environ deux fois plus que chez les donneurs sains. Ceci reflète une activation du complément qui aboutit à la formation de C5b-9 membranaire. Ce qui détermine si le C5b-9 est présent en concentration lytique ou non est la présence de ce complexe à la surface des fragments de cellules, combiné à la détection d'apoptose. Pourquoi les deux phénomènes sont-ils nécessaires simultanément ? Comme nous avons vu dans le chapitre 2 de cette thèse, plusieurs mécanismes de régulations ont pour but de protéger les cellules contre une lyse éventuelle par le complément. L'un d'eux, tel que décrit dans le cas de l'angine stable, l'interaction avec la vitronectine, rend le complexe fluide (sC5b-9). Un second mécanisme, aussi décrit au chapitre 2, est la vésiculation des membranes des cellules cibles [309-311]. Ce mécanisme est utilisé pour éviter les effets pro-inflammatoires et pro-apoptotiques du complexe terminal lytique ou non-lytique du complément [114, 118]. Ainsi, comme c'est le cas dans nos études pour les donneurs sains, si la formation de C5b-9 à la surface des fragments de cellules ne s'accompagne pas d'une augmentation des niveaux d'apoptose cellulaire, ce phénomène ne fait que refléter le mécanisme de régulation par lequel les cellules évitent les effets délétères du C5b-9 membranaire. Par contre, nous pouvons observer que la présence de C5b-9 à la membrane des cellules fragmentées s'accompagne d'un niveau plus élevé d'apoptose chez les patients avec NSTEMI et STEMI. Ceci reflète donc que le C5b-9 membranaire est parvenu, dans ces pathologies, à engendrer la lyse cellulaire.

Ce dernier point soulevé nous ramène au début de cette section, où nous abordions la question à savoir si le SCA était un phénomène systémique, comme le supposait Valgimigli [413]. En utilisant notre modèle *in vitro*, notre objectif était de déterminer si le complément activé pouvait faire partie des éléments contenus dans le sérum, lesquels éléments seraient susceptibles de contribuer à transformer une plaque à priori stable en plaque vulnérable, générant ainsi d'éventuels SCA. Nos résultats démontrent que l'activation du complément dans les SCA est relative à l'apoptose des cellules

endothéliales. Ainsi, bien que les voies proximales du complément soient nécessaires dans l'élimination des cellules et débris apoptotiques et nécrotiques créés entre autre lors de la rupture de la plaque, il faut savoir que le complément lui-même, s'il est suractivé, peut engendrer l'apoptose ou la nécrose des cellules avoisinantes [285]. Bien sûr, l'apoptose des cellules aussi est en soi un mécanisme de protection essentiel pour l'intégrité des tissus [164]. Malgré cela, un nombre grandissant d'études tend à démontrer les effets délétères de l'apoptose dans la dénudation de la plaque athérosclérotique et de sa transition vers une plaque vulnérable [62, 410, 424, 425]. Par conséquent, puisque la voie alterne semble être responsable de l'activation du complément dans les infarctus aigus du myocarde, nous suggérons que les thérapies visant à contrôler l'activation de cette voie dans les SCA pourraient être bénéfiques pour contrôler la survenue récurrente d'éventuels troubles coronariens aigus.

6.2.1.3 Les déficiences en MBL

Nous avons constaté que la voie alterne est davantage contributive à l'activation du complément que la voie classique ou lectine dans l'infarctus aigu du myocarde. Pourquoi observe-t-on une activité du complément principalement engendrée par la voie alterne dans l'infarctus du myocarde, mais pas dans l'angine stable ? Selon nous, cette caractéristique pourrait possiblement être attribuable aux faibles niveaux de MBL observés chez les patients avec angine stable. Pour soutenir cette hypothèse, voyons à titre indicatif, quelques expériences effectuées dans le but de caractériser l'activité relative de la voie classique et de la voie alterne en présence et en absence de MBL (résultats non publiés). Nous avons donc mesuré l'activité relative de chacune des voies proximales d'activation du complément chez des sujets sans maladies coronariennes connues (3) et chez un sujet chez qui une déficience en MBL avait été détectée (1). Nous avons utilisé le test COMPL300 (Wielisa®-kit, Suède), un test qui juxtapose le test biochimique ELISA au test conventionnel d'activité hémolytique du complément. Globalement, le principe est simple (figure 12). Une plaque de 96 puits est divisée en 3 sections, chacune recouverte d'un activateur spécifique de chacune des voies proximales du complément. Le sérum ou le

plasma des patients est ensuite dilué avec un tampon contenant des bloqueurs spécifiques de chacune des autres voies pour lesquelles l'activité peut être abolie et ensuite incubée dans les puits contenant les activateurs spécifiques d'intérêt. Ainsi, le complément s'active spécifiquement par l'une ou l'autre des voies proximales. L'activation relative spécifique à chacune des voies est alors déterminée par la détection de complexes terminaux formés, mesurés en termes d'absorbance (densité optique).

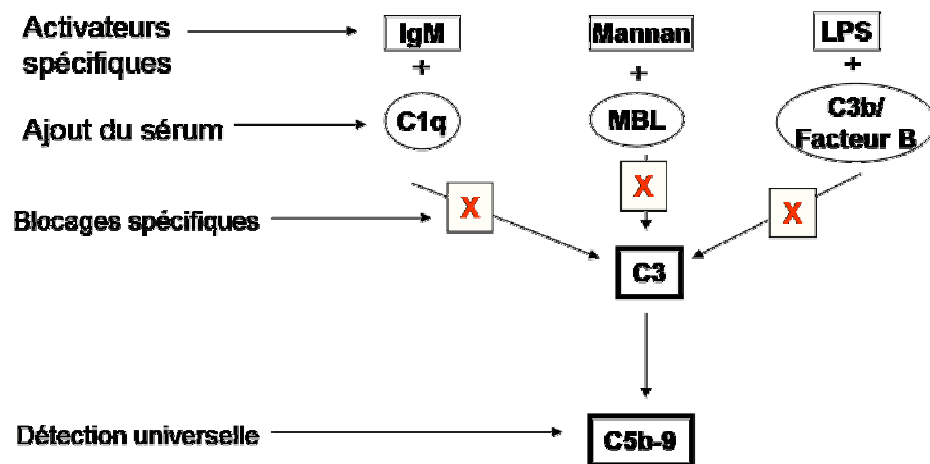


Figure 13. Détection de l'activité relative des voies proximales du complément par le COMPL300

La figure 14 représente les résultats obtenus. Les prélèvements avaient été effectués en présence d'EDTA ou de citrate. L'un de ces patients (carré) était déficient en MBL, comme le témoigne la première colonne des deux schémas de la figure 14, où aucune activation du complément n'a été attribuable à l'activité de la voie lectine. De plus, nous avons pu observer que la déficience en MBL ne semblait pas avoir d'effet sur l'activité de la voie classique du complément (colonne du centre), mais bien sur l'activité de la voie alterne, où une diminution de l'activité a été observée chez le patient déficient en MBL.

(colonne de droite). Bien qu'ils n'aient été récoltés qu'à partir d'un petit échantillon de donneurs sains, ces résultats permettent de consolider notre hypothèse qui stipule que les patients avec angine stable ont des niveaux relativement bas de MBL en comparaison avec les infarctus, ce qui aurait possiblement pour effet de diminuer l'activation de la voie alterne du complément dans cette maladie coronarienne stable. Bien sûr, ces expériences ont été faites chez des donneurs sains, sans maladie coronarienne connue, ce qui pose une limite à l'interprétation de nos résultats.

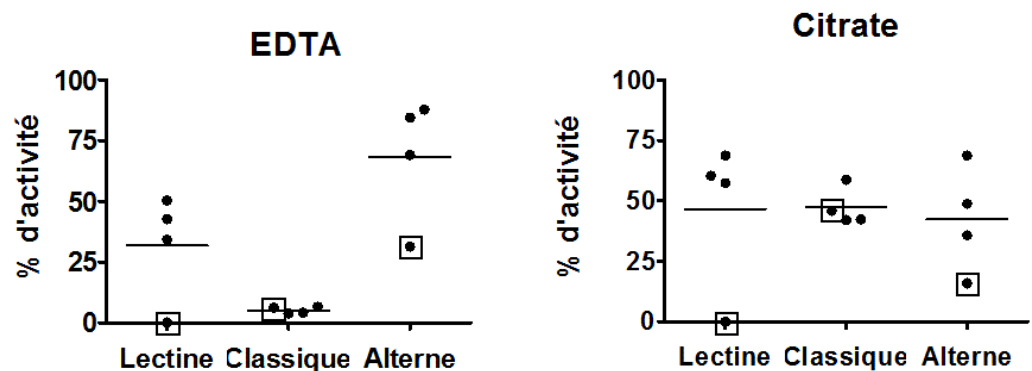


Figure 14. Activité relative (%) de la voie lectine, classique et alterne dans l'activation totale du complément.

6.2.2 Une déficience en MBL protège-t-elle contre la survenue d'événements cliniques majeurs post-infarctus ?

De manière intéressante, j'ai pu participer à l'analyse des effets d'une déficience en MBL sur la survenue d'événements cliniques dans une grande cohorte de patients (890 patients au total) avec STEMI à haut risque, recrutés dans l'étude APEX-AMI. Cette sous-étude «Influence of functional deficiency of complement mannose-binding lectin on

outcome of patients with acute ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention» dirigée par le Dr Mark Trendelenburg est soumis pour publication dans *Circulation*.

Le *mannan-binding lectin* (MBL) est une lectine impliquée dans l'immunité innée et initie l'activation de la voie lectine activation (section 3.3). Bien qu'elles soient stables au cours de la vie des individus [426], les concentrations sériques de MBL peuvent grandement varier d'un individu à l'autre, variant de 0 à 10 000 $\eta\text{g/mL}$ [426]. Il a été démontré qu'une déficience physiologique (concentration sériques $\leq 100 \eta\text{g/mL}$) en MBL pouvait être associée à des complications cardiovasculaires. Des études avancent qu'une déficience en MBL est associée avec une athérosclérose sévère chez l'humain [427]. D'autres investigations stipulent que les patients déficients en MBL ont tendance à développer les premiers signes apparents de l'athérosclérose plus tôt et encoureraient une progression plus rapide de la maladie [427, 428]. En phase aiguë de l'infarctus, cependant, les résultats sont surprenant.

Dans cette étude, le Dr Trendelenburg a voulu démontrer l'influence de concentrations sériques basses de MBL sur la mortalité post-infarctus (90 jours) des patients avec STEMI traités par angioplastie primaire. Pour se faire, des patients déficients en MBL ($\leq 100 \eta\text{g/mL}$) avec les patients avec des valeurs normales en MBL ($> 100 \eta\text{g/mL}$) ont été répertoriés et comparés. Dans la population APEX-AMI, 127 patients sur 890 avaient des niveaux de MBL $\leq 100 \eta\text{g/mL}$ (14.3%), ce qui concorde avec les données actuelles de la littérature [429-431]. Le tableau 5 compare les caractéristiques de base des deux groupes de patients, selon que les patients soient déficients ou non en MBL. Nous pouvons observer qu'une déficience en MBL n'affecte pas les caractéristiques de base des patients. Les résultats sur la mortalité, quant à eux, furent très clairs et concluants : pour la première fois, il est démontré qu'une des protéines impliquée dans la cascade d'activation du complément est directement liée à la mortalité post- infarctus. Ainsi, dans le groupe de patients déficients en MBL ($\leq 100 \eta\text{g/mL}$), un seul cas de décès à 90 jours (0.79%), comparativement à 42 (5.51%) dans le groupes de patients avec MBL normaux (>100

ng/mL) a été observé. Cette réduction globale de 85% de mortalité confirme bien l'hypothèse initiale.

Paramètres	MBL sérique à l'admission		<i>P value</i>
	MBL>100 ng/ml	MBL≤100ng/ml	
N	763	127	
Age, années, médiane (25e, 75e percentile)	60 (51, 70)	60 (53, 73)	0.52
Femmes, %	21.4	23.6	0.57
MI inférieur à haut risque, %	42.1	44.9	0.55
Pression systémique, mmHg, médiane (25e, 75e percentile)	133 (116, 150)	132 (114, 148)	0.87
Indice de masse corporelle, médiane (25e, 75e percentile)	27.6 (24.8, 31.1)	27.1 (24.4, 31.0)	0.64
Temps entre les premiers symptômes et l'angiographie (temps ischémique) heures, médiane (25e, 75e percentile)	2.7 (1.9, 3.8)	2.4 (1.8, 3.7)	0.22
PAC antérieur, %	3.9	1.6	0.30
PCI antérieur, %	11.8	11.8	1.00
MI antérieur, %	13.2	15.7	0.44
CHF antérieur, %	2.9	3.9	0.57
Diabète, %	16.9	12.6	0.22
Dyslipidémie, %	49.7	53.3	0.49
Hypertension, %	52.8	54.3	0.75
Inflammation chronique, %	2.1	0.8	0.49

Tableau V. Caractéristiques cliniques des patients à l'admission selon leurs niveaux de base de MBL.

La principale conclusion soulevée par le Dr Trendelenberg suggère que le MBL joue un rôle important dans les dommages de reperfusion post-infarctus, puisqu'une déficience en cette lectine est associée avec une baisse significative de la mortalité dans les 90 jours suivant l'infarctus. Par extrapolation, nous pouvons avancer que chez les patients déficients en MBL, la voie lectine n'est pas fonctionnelle (voir figure 14 de la section 6.2.1.3). Cette conclusion abonde dans le même sens que celle de Rawal décrite précédemment puisque Trendelenberg suggère que des niveaux élevés de MBL contribueraient à des dommages inflammatoires, dans ce cas-ci, secondaires post-PCI. De plus, d'autres études qui suggèrent que les dommages de reperfusion engendrent une activation du complément principalement par la voie lectine [432, 433]. À notre connaissance, Trendelenberg démontre pour la première fois un lien direct en une protéine de la cascade du complément et la mortalité post-infarctus. Conséquemment, l'auteur suggère que la régulation des niveaux circulants de MBL puisse être une cible thérapeutique possible pour diminuer les dommages reliés aux SCA récurrents.

Dans un autre ordre d'idées, la même étude s'est intéressée à savoir si une déficience en MBL pouvait influencer l'activation des autres protéines de la cascade du complément (tableau 6). De manière surprenante, on observe qu'une déficience en MBL n'a pas d'effet sur l'activation des autres peptides du complément dans les 24 heures suivant l'infarctus. Cependant, il faut souligner que les paramètres choisis par les investigateurs de l'étude sont ceux qui sont directement reliés à l'activation de la voie lectine (C3a, C4a et sC5b-9). De plus, dans la section 6.2.1.1, nous avons souligné que des MBL bas étaient associés à l'angine stable et qu'une activation de la voie terminale soluble persistait quand même. Or, ces résultats concordent avec ceux de l'étude actuelle puisque Trendelenberg ne remarque pas de diminution du complexe terminal soluble dans le sérum des patients déficients dans les 24 heures suivant l'infarctus par rapport aux non-déficients. Ceci suggère que le complément persiste à être activé par l'entremise des autres voies proximales d'activation ou par la voie des protéases extrinsèques (section 3.4 du chapitre 3). Dans le même ordre d'idée que cette hypothèse, nous avons souligné dans une

expérimentation précédente (figure 14) qu'une déficience en MBL avait au contraire un effet sur l'activité de la voie alterne. Bien que cette hypothèse soit fondée sur un échantillon plutôt limité de donneurs sains, l'étude actuelle ne la contredit pas, bien au contraire. Cependant, une limite à la présente étude du Dr Trendelenburg est que les auteurs ont décidé de ne pas prendre en considération les variations du peptide Bb, descriptif d'une activation par la voie alterne. Or, avec cette information supplémentaire, nous aurions pu constater si notre hypothèse suggérant qu'une déficience en MBL réduit l'activité de la voie alterne est aussi applicable aux syndromes coronariens aigus.

Paramètre, médiane (25e, 75e percentile)	patients	MBL sérique à l'admission		<i>P value</i>
		MBL>100 ng/ml	MBL≤100ng/ml	
CK supérieur	(n) 625	1700 (772, 3134)	1452 (798, 3156)	0.614
CK-MB supérieur	575	156.5 (66.1, 239.2)	148 (71.0, 286.0)	0.850
24-heures C3a µg/ml	105	266147 (198913, 381447)	332385 (240026, 403601)	0.431
Changement absolu de C3a	105	8980.2 (-59364, 83849)	-7815 (-43816, 82705)	0.823
24-heures C4a µg/ml	108	214627 (146980, 302809)	170970 (144000, 202238)	0.140
Changement absolu de C4a	108	20708 (-12943, 73182)	-8755 (-30994, 26556)	0.088
24-heures sC5b-9 ηg/ml	96	844.9 (525.2, 1448.4)	736.2 (382.4, 1446.9)	0.489
Changement absolu de sC5b-9	89	345.7 (20.6, 958.7)	258.1 (7.5, 1043.9)	0.833

Tableau VI. CK, CK-MB et paramètres d'activation du complément dépendamment des niveaux de base de MBL.

6.3 APEX-AMI : une meilleure compréhension des mécanismes d'activation du complément dans les infarctus du myocarde et dans les complications post-infarctus

Malgré son échec face à l'atteinte de son objectif principal, l'étude APEX-AMI nous a permis de mieux connaître les mécanismes qui dirigent l'activation de la cascade, de son initiation jusqu'à la génération de ses effets délétères dans l'infarctus aigu du myocarde et des complications post-PCI. La figure 11 représente les 5 sous-études auxquelles j'ai contribué. Les sous-études #2 et #3 de cette illustration sont celles qui ont fait ou qui feront l'objet d'articles pour lesquels je suis première auteure et qui sont inclus dans cette thèse. Les autres sous-études ont été décrites dans les pages antérieures ou seront intégrées dans les sections suivantes.

Nous étions en fait en cours d'analyses de nos sous-études lorsque nous avons appris les conclusions cliniques de l'étude principale. Dans l'adversité, nous n'avons pas utilisé l'inhibition de l'activation du C5 par le pexelizumab comme une fin en soi, mais plutôt comme un outil de travail (voir figure 11). En partant dans cette optique, notre objectif a été de mieux comprendre les mécanismes qui soutendent une inflammation excessive dans la phase précoce des infarctus aigus du myocarde et dans les mois suivant l'infarctus traité par angioplastie. Plus précisément, nous avons pu consolider des hypothèses permettant d'expliquer pourquoi et comment une inhibition du clivage du C5 engendre la persistance du processus inflammatoire observable dans ces conditions physiopathologiques et ce, malgré la capacité du pexelizumab à inhiber à 70% l'activité hémolytique chez 90% des patients traités [377].

Les études cliniques de phase III étaient claires : aucun bénéfice du pexelizumab sur la mortalité. Mais pourquoi une si grande dissimilarité entre les résultats de phase II et III ? Les investigateurs de l'étude APEX-AMI ont proposé plusieurs avenues tentant d'expliquer ce phénomène, sans toutefois s'entendre pour une raison unanime [377, 434-438]. Le succès des études clinique repose en grande partie sur le respect des critères d'éligibilité de la part des cliniciens. Or, dans l'étude APEX-AMI, il a été démontré que, contrairement aux résultats de l'étude de phase II (COMMA) [97], le pexelizumab n'était pas efficace

dans la diminution du taux de mortalité dans les 30 jours suivant l'infarctus. Alors que le taux de mortalité post-infarctus aurait dû être de 6.5% à 90 jours avec le placebo, il a été démontré que le taux de mortalité post-infarctus dans la population APEX-AMI était seulement de 4.5% [377, 435]. Or, les investigateurs de l'étude ont tenté de savoir si un recrutement inadéquat des patients aurait pu expliquer ce taux de mortalité anormalement bas chez ce type de patients [438]. En 2008, après analyse des dossiers, une étude démontre que plus du quart (28.8%) des patients recrutés ne répondaient pas aux critères d'inclusion des ECG établis dans l'étude APEX-AMI⁷ [439, 440]. Le point important est que ces patients avaient effectivement par la suite un meilleur bilan d'événements cliniques post-infarctus que les patients répondant parfaitement aux critères d'inclusions. Cependant, les auteurs spécifient que les effets du pexelizumab quant à la mortalité à 30 jours post-infarctus étaient les mêmes, indépendamment de l'inclusion adéquate ou pas ($p=0.57$ entre les deux groupes par rapport au placebo). Par conséquent, les hypothèses suggérées pour expliquer l'échec du pexelizumab dans son atteinte de l'objectif primaire (diminution de la mortalité à 30 jours) ne réussissent pas à démontrer les raisons physiologiques de l'échec, mais tendent ensemble à démontrer que le problème relève davantage d'une mauvaise connaissance de mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'activation de la protéine C5 du complément.

Nous avons déjà discuté dans les sections précédentes des mécanismes d'activation du complément dans l'angine stable et les NSTEMI, mais aussi dans les STEMI à haut risque, déficient ou non en MBL. Dans la présente section, nous nous servons de l'opportunité d'avoir participé à l'étude APEX-AMI pour mieux comprendre les événements conduisant à l'apparition des effets délétères d'une activation excessive du complément dans la maladie coronarienne aiguë : régulation positive des gènes impliqués dans la production de cytokines, l'interruption de l'activité de l'oxyde nitrique synthase,

⁷ L'étude APEX-AMI employait des critères d'inclusion récemment établis qui permettent de reconnaître des patients avec infarctus du myocarde inférieur à haut risque (dépression concomitante du segment ST et une déviation minimum totale de 8 mm).

l'activation des leucocytes et des cellules endothéliales et l'augmentation de l'apoptose [257].

6.3.1 Les effets d'une inhibition de l'activation de C5

6.3.1.1 Pexelizumab : délétère ou bénéfique ?

Dans le but d'étudier les effets d'une inhibition de l'activation de la composante C5 du complément et de redéfinir une meilleure cible thérapeutique, nous avons conceptualisé deux approches différentes, mais complémentaires. Étonnamment, nous avons observé une stabilisation des niveaux sériques mesurés après perfusion par rapport à ceux mesurés à l'admission, avant administration du traitement. Le pexelizumab a donc permis de limiter l'augmentation du C5 attendue dans les 24 heures suivant le début des douleurs thoraciques (placebo) mais n'a pas diminué les niveaux sériques par rapport à la ligne de base. De plus, le traitement par pexelizumab ne réussit pas à diminuer l'augmentation importante (200% d'augmentation) des niveaux sériques de CRP à 24 heures. Cependant, nous pouvons remarquer qu'une forte corrélation existe en présence de pexelizumab entre les niveaux sériques CRP et des peptides Bb.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la CRP colocalise avec les protéines du complément dans les lésions athérosclérotiques et les zones infarctées du cœur [142, 143]. Sous forme pentamérique native, cette protéine peut se dissocier en unités monomériques individuelles pour former des CRP modifiés qui possèdent de nouveaux épitopes et donc une réactivité antigénique différente de celle de sa forme native [441]. Nous savons depuis quelques années que la CRP, sous sa forme monomérique (mCRP), peut à la fois inhiber et activer la voie classique du complément par sa liaison directe à la protéine C1q [145]. La mCRP peut lier le C1q selon deux mécanismes distincts, selon qu'elle soit liée ou non à une surface quelconque. Ainsi, lorsque la mCRP n'est pas rattachée à un ligand spécifique (donc non-liée), elle se lie au C1q en engendrant conséquemment l'inhibition de l'activation de la cascade du complément. Une hypothèse qui pourrait servir à expliquer ce mécanisme pourrait être que la mCRP non-liée interagisse

qu'avec une seule sous-unité du gC1q, ce qui serait insuffisant pour initier l'activation du complexe C1. Par contre, la liaison par la mCRP viendrait restreindre la capacité des autres activateurs de la voie classique du complément à lier le gC1q. Ce mécanisme d'action est probablement une bonne piste pour expliquer le manque de corrélation entre les niveaux des peptides descriptifs d'une activation de la voie classique et la CRP sérique.

Mais comment expliquer le fait que les niveaux sériques de CRP corrélaient avec les niveaux sériques du peptide Bb, suivant une perfusion avec le pexelizumab ? Il faut comprendre que même si la CRP qui est immobilisé à une surface quelconque se lie au C1q dans le but d'activer la voie classique, cette activation est limitée aux voies proximales [442]. Dans notre étude, nous avons constaté qu'à 24 heures suivant le début des douleurs, les niveaux sériques de CRP et du peptide Bb corrélaient. Cette observation s'explique par le fait que la CRP s'est probablement liée au facteur H et a favorisé la dissociation des C3 convertases, libérant ainsi le peptide Bb. Rappelons nous que nous avons aussi noté que le complément semblait s'activer davantage par la voie alterne dans les STEMI à haut risque. Or, dans les 24 heures suivant l'infarctus, la CRP pourrait jouer un rôle d'élément protecteur dans l'activation de la voie terminale du complément. Par contre, nous n'avons observé ce phénomène qu'en présence du pexelizumab. La question se pose : le pexelizumab, qui n'a pas d'effet sur la production de la CRP, pourrait-il potentialiser la liaison entre le mCRP et le facteur H ?

Autre constatation d'autant plus surprenante, le pexelizumab n'a pas provoqué la diminution de la formation du complexe terminal soluble par rapport au placebo. Bien au contraire, une inhibition de l'activation de la protéine C5a a même favorisé une tendance à l'augmentation des niveaux sériques de sC5b-9. Comment expliquer la controverse apparente entourant les effets du pexelizumab sur les niveaux sériques des composantes activées du complément ?

Dans un premier temps, nos résultats pourraient être en accord avec ceux des études cliniques décrites précédemment, où le pexelizumab n'avait pas d'effet sur la réduction de la taille de l'infarctus [97], ni sur la réduction de la mortalité dans les 30 jours suivants

l'infarctus chez les patients traités par angioplastie [377]. Trouvant l'idée trop simpliste, nous avons poussé le raisonnement un peu plus loin en proposant plusieurs hypothèses. Par exemple, les résultats de l'étude clinique APEX-AMI démontrent pourtant que le pexelizumab réussi à inhiber à 70% l'activité hémolytique chez 90% des patients traités [377]. En d'autres mots, le pexelizumab aurait réussi à diminuer de 70% l'activité lytique du C5b-9 membranaire chez 90% des sujets traités. Ceci laisse supposer qu'il y aurait une diminution de la formation du complexe terminal, puisque l'anticorps est conçu pour bloquer la production de la première composante du complexe, le C5b. Or, dans nos résultats, nous observons une augmentation considérable des niveaux du sC5b-9, soit le complexe terminal sous sa forme soluble, dans les 24 heures suivant le début de la perfusion du pexelizumab. Bien qu'ils puissent paraître contradictoires, ces résultats ne le sont qu'en partie. Tel que décrit dans le chapitre 2 ainsi que dans la section de la discussion 6.2.2.1, la vitronectine (protéine s) est une protéine qui régule l'insertion du complexe terminal du complément dans les membranes cellulaires. Par conséquent, il n'est pas nécessairement vrai de stipuler qu'une augmentation du sC5b-9 reflète une augmentation du complexe terminal membranaire. Dans la situation actuelle, la vitronectine serait justement plutôt intervenue dans la cascade d'activation pour protéger les cellules contre une lyse excessive. Par contre, nous devons souligner qu'une formation accrue du complexe terminal soluble ne désigne pas nécessairement une inhibition de l'inflammation. Comme nous l'avons souligné à plusieurs reprises dans cette thèse, des concentrations non-lytiques de C5b-9 à la surface des cellules et la formation du complexe terminal soluble (sC5b-9) peuvent engendrer des effets inflammatoires puissants, tels favoriser l'activation cellulaire et la surexpression de cytokines pro-inflammatoires.

Mises ensemble, les constatations effectuées grâce à cette sous-étude nous permettent d'avancer l'hypothèse qu'une inhibition de l'activation du C5 par le pexelizumab favoriserait la mise en place de mécanismes de protection contre la lyse cellulaire. Bien évidemment, puisque le modèle d'étude actuel ne peut nous laisser supposer ce mécanisme

protecteur, un modèle *in vitro* attestant les effets du pexelizumab sur l'activité lytique du complément s'est avéré nécessaire.

6.3.1.2 De la clinique au fondamental

La destruction endothéliale est associée à l'obstruction microvasculaire retrouvée dans les phénomènes de «no-reflow» [375]. Dans le contexte actuel, nous avons suspecté l'activation du complément comme étant l'un des phénomènes pouvant conduire à l'endommagement de ces vaisseaux qui causent une mauvaise irrigation du tissu cardiaque durant les premières semaines de l'infarctus. Suite aux résultats obtenus dans notre première sous-étude de APEX-AMI, nous avons mis en place un modèle d'étude *in vitro* qui allait nous permettre de caractériser l'effet d'une inhibition de l'activation du C5 par le pexelizumab sur la formation de complexes membranaires lytiques ou non lytiques, et sur la survie des cellules endothéliales.

Dans cette approche complémentaire à la première, nous avons caractérisé les effets de l'activation des différentes voies du complément sur la destruction des cellules endothéliales, phénomène grandement responsable de l'obstruction microvasculaire retrouvée dans le cas de «no reflow», tel que décrit à la section 5.3 [375]. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode décrite à la section 6.2.1. Brièvement, nous avons incubé le sérum des patients post-angioplastie traité par placebo ou par pexelizumab sur une monocouche de cellules endothéliales durant 72 heures. Nous avons par la suite analysé l'activité de chacune des voies en mesurant les niveaux de leurs composantes spécifiques et en attestant la présence d'une activation de la voie terminale du complément, que ce soit sous sa forme soluble ou membranaire à la surface des cellules elles-mêmes ou à la surface des fragments cellulaires. Par la suite, nous avons mesuré l'apoptose des cellules HUVEC par différentes méthodes. Les analyses ont été effectuées en microscopie (fluorescence/confocal) puis en cytométrie, soit dans le surnageant de culture ou après avoir minutieusement détaché les cellules adhérentes (pour plus de détails sur le protocole, se référer aux articles #1 et #3 de cette thèse).

Comme nous l'avons vu dans la section 6.2.1, la phase aiguë de l'infarctus est associée avec la présence accrue de C5b-9 sur les membranes des cellules et fragments cellulaires et avec l'apoptose des cellules endothéliales. Cette observation suggère que l'activation du complément en phase aiguë de l'infarctus se caractérise par une activation excessive du complément qui résulte en la formation du complexe lytique à la surface des cellules endothéliales, aboutissant finalement à la lyse des cellules. Nous pouvons affirmer que la fragmentation des cellules est due à un phénomène de destruction par le C5b-9, et non à un mécanisme de protection contre une lyse cellulaire du complément, puisque la présence de C5b-9 à la surface des fragments cellulaires est associée à l'apoptose des HUVEC. Le chapitre 6.2.1 explique plus en détails les fondements d'un tel mécanisme dans les STEMI à haut risque. Il est important aussi de noter que les niveaux de ces paramètres sont déjà élevés à la ligne de base et n'augmentent que peu ou pas dans les 24 heures suivant l'admission. Nous avons aussi observé que ni les niveaux d'apoptose, ni les niveaux de cytokines inflammatoires produites par les cellules endothéliales ne sont augmentés dans ce laps de temps.

Est-ce que l'inhibition de l'activation de la composante C5 du complément permet de limiter l'inflammation déjà présente et surtout de contrôler la destruction des cellules endothéliales ? Dans le but de répondre à cette question, reprenons un peu le même raisonnement que celui précédemment décrit. Tout d'abord, nous avons observé que, par rapport au sérum des patients traités par le placebo, le sérum des patients traités par le pexelizumab diminuait efficacement la formation de C5b-9 à la surface des cellules endothéliales et aussi à la surface des fragments cellulaires. Une diminution marquée de la production de C5a et de sC5b-9 fut aussi remarquée. Cependant, le pexelizumab n'a pas semblé avoir d'effet sur la production des cytokines inflammatoires par les HUVEC ni, étonnamment, sur leur apoptose, phénomène déjà présent à l'admission.

Les résultats démontrent que la formation de C5b-9 diminue à la surface des cellules «intactes» et que cette diminution se traduit aussi par une diminution de la fragmentation des membranes des HUVEC engendrée par le C5b-9. La baisse des niveaux de C5a, sC5b-9

et C5b-9 non-lytique devrait se traduire par une diminution de la production de cytokines inflammatoires et par une forte diminution de l'apoptose. Or, ce n'est pas le cas. Il faut prendre en considération que le modèle que nous utilisons est un modèle clos dans lequel le sérum mais aussi les cellules endothéliales nous servent de source de composantes du complément. Par conséquent, il ne faut pas exclure le fait que, du complément déjà activé est présent dans le sérum mis en culture avec les HUVEC. Avec les avantages de ses défauts, notre modèle nous permet de constater que l'anticorps anti-C5 semble bloquer les nouveaux événements qui sont survenus en amont de l'admission, soit dans la phase sub-aiguë de l'infarctus. Le complément devait déjà être grandement activé chez ces patients à hauts risques avant leur admission à l'hôpital. Comme nous l'avons suggéré dans une étude précédente (hyper-réactivité des leucocytes), une charge importante d'anticorps déjà présents dans le sang des patients et découlant d'une infection ou d'une inflammation chronique, peut avoir été présente. Par contre, le pexelizumab inhibe efficacement le complément qui se forme entièrement *in vitro*, comme le témoigne la diminution de l'activation de la voie terminale. Puisque le sérum des patients n'est évidemment pas déplété en complément avant de le mettre en présence des HUVEC, nous supposons que du C5b déjà produit par le clivage du C5 est présent dans le modèle. Puisque les HUVEC produisent les protéines C6 à C9, la formation des complexes à la surface des cellules endothéliales peut avoir lieu et donc engendrer la lyse des cellules. Nous pouvons conclure que les complexes ainsi formés à partir du C5b produit avant la mise en culture, seraient responsables de la persistance de l'activité apoptotique des HUVEC. Ainsi, le pexelizumab présent dans le sérum mis en culture se lie efficacement au C5, empêche son clivage et par conséquent la formation de complexes terminaux, mais ne peut cependant pas agir sur les peptides du C5 déjà produits. Les complexes produits par le C5b déjà présent sont nombreux et en concentrations lytiques, ce qui favorise la lyse et l'apoptose cellulaire au détriment d'une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires par l'endothélium. Un autre contrôle qui aurait pu être effectué dans le cadre de cette étude

aurait été de mesurer les cytokines directement dans le milieu de culture contenant 20% de sérum, sans toutefois être en présence de cellules endothéliales.

6.3.1.3 Du fondamental à la clinique

Les résultats obtenus dans notre modèle *in vitro* nous permettent de soulever plusieurs hypothèses pour expliquer l'échec du pexelizumab dans l'atteinte de son but premier, la diminution de la mortalité à 30 jours suivant d'infarctus. Ensemble, nos modèles d'étude nous ont permis d'établir les interactions entre la destruction des cellules endothéliales conduisant au phénomène de «no reflow» et l'activation du complément dans la phase aiguë de l'infarctus du myocarde. Nous avons vu que le pexelizumab semble efficace pour lier le C5 et donc diminuer les événements subséquent, d'où les différences observées entre l'administration du placebo et du pexelizumab. Le pexelizumab semble bloquer l'activation additionnelle retrouvée en phase sub-aiguë (24 heures) par rapport à l'admission mais ne peut agir sur les composantes déjà présentes, aptes à former le complexe lytique. Ceci laisse supposer que, avant l'administration du traitement, ou du moins avant la production de son effet, des concentrations déjà importantes de protéines fragmentée C5b du complément seraient déjà présentes en circulation ou même à la surface des cellules endothéliales. En phase aiguë, nous avons vu précédemment qu'une augmentation des niveaux sériques des protéines totales du complément précède l'augmentation de peptides fragmentés au site de la lésion. Les évidences d'une augmentation de l'activation plaquettaire et de la cascade de la coagulation au site de l'infarctus nous laissent suggérer que les fragments C5 présents pourraient être clivés par les protéases de la voie extrinsèque du complément. Par conséquent, la thrombine et les protéases issues de l'activation des plaquettes pourraient contribuer à l'activation précoce dans la phase aiguë de l'infarctus. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi les niveaux des composantes des voies proximales du complément ne sont pas du tout augmentés dans les 24 heures suivant l'admission.

Cependant, une production du complexe terminal persiste en circulation et tend même à être augmentée par la perfusion avec le pexelizumab. Par un mécanisme qui nous

est pour l'instant inconnu, le pexelizumab semble potentialiser les interactions entre la vitronectine et les complexes terminaux chez les patients en phase aiguë. La vitronectine est une protéine qui est largement sécrétée par les plaquettes activées, comme c'est le cas dans la phase aiguë de l'infarctus. Bien que les cellules, comme les cellules endothéliales, soient alors protégées par une lyse éventuelle par le complément, il n'en demeure pas moins que le sC5b-9 présent en grande quantité participera sûrement à l'origine d'une hausse de l'inflammation systémique et d'un déséquilibre de la balance de production de cytokines pro- et anti-inflammatoires.

La sous-section qui suit fait référence à une sous-étude qui a aussi été effectuée dans le cadre de l'étude APEX-AMI. Elle présente les effets du pexelizumab sur la production sérique de marqueurs inflammatoires.

6.3.1.4 Les effets d'une inhibition de l'activation de C5 sur la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires

Alors que les études précédentes avaient été effectuées à partir de sérum des patients recrutés à l'Insitut de Cardiologie de Montréal, la sous-étude actuelle a été construite à partir d'une cohorte plus grande, incluant des patients provenant de d'autres centres. Dans les paragraphes précédents, nous avons décrit entre autre que le pexelizumab n'a pas d'effets sur la production de cytokines pro et anti-inflammatoires par les HUVEC parce que la lyse cellulaire semblait l'événement majeur suivant l'insertion du C5b-9 dans les membranes cellulaires. Par contre, nous avons supposé en fin de paragraphe que l'augmentation de la production du complexe terminal soluble sC5b-9 participerait à l'augmentation de l'inflammation détectée dans l'infarctus, bien que non exclusif. Pour mieux comprendre les effets du pexelizumab et soutenir notre hypothèse, les niveaux sériques de marqueurs reliés à l'inflammation ont été dosés par ELISA et Multiplex (voir article #3 pour plus d'information sur la technique) chez 291 patients recrutés dans des centres préselectionnés. Les prélèvements ont aussi été effectués avant angioplastie et administration du pexelizumab, puis après 24h, soit à l'arrêt du traitement. Les résultats

obtenus indiquent que les niveaux des cytokines pro-inflammatoires de phase aiguë ont augmenté entre l'admission et 24h (IL-6, 2.5-3 fois, TNF- α , 10% et IL-1-beta, 12%). De plus, les niveaux des récepteurs anti-inflammatoires IL-1ra ont diminué de 45%. Les niveaux des cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 sont demeurés inchangés, tout comme les niveaux d'IL-12 et d'INF- γ . Les niveaux d'IP-10, activateur spécifique des cellules T, ont diminué de 45% alors que les niveaux de RANTES, responsable de la chimiotaxie des leucocytes, ont augmenté de 58%. Contrairement aux observations effectuées *in vitro*, nous avons constaté que le pexelizumab a significativement réduit les niveaux d'IL-6 et d'IL-1 β , mais aussi d'IL-1ra. Il n'a toutefois eu aucun effet sur IL-4 et IL-10, et a montré une tendance à augmenter les niveaux d'IP-10 et RANTES. De plus, le pexelizumab n'a pas semblé influencer les niveaux de CRP, tel que décrit précédemment, ou de NT-proBNP. Le tableau VII offre une vue d'ensemble sur les résultats obtenus.

	Avant traitement	Placebo 24h	PEX 24h	p*
<i>Cytokines pro-inflammatoires</i>				
IL-6 (ng/ml)	13.6 (10-19)	40.6 (27-78)	34 (20-59)	0.003
IL-1-beta (ng/ml)	6.6 (4.9-6.6)	7.2 (7.2-6.8)	6.8 (5.4-7.8)	0.05
<i>Cytokines anti-inflammatoires</i>				
IL-10 (ng/ml)	7.8 (4.0-14.8)	4.4 (2.9-7.7)	4.4 (3.0-8.9)	0.42
IL-1ra (ng/ml)	192 (127-306)	158 (112-234)	128 (98-185)	0.09
<i>Activité lymphocytaire et immunitaire</i>				
INF- γ	118.9 (80.4-143.4)	121 (77.3-142.2)	177.8 (75.7-143.8)	0.56
IP10 (ng/ml)	779 (500-1130)	381 (252-597)	455 (291-646)	0.93
RANTES (ng/ml)	5233 (3335-12161)	7399 (3125-12408)	9680 (2976-15005)	0.21
<i>Autres</i>				
CRP (mg/L)	3.6 (1.5-8.1)	18.4 (9-33)	20.4 (7-38)	0.73
Nt proBNP (ng/L)	222 (84-818)	2388 (1106-4968)	2257 (1002-4996)	0.39

Tableau VII. Effets du pexelizumab sur les variations sériques de différents groupes de marqueurs inflammatoires.

De manière générale, nous pouvons résumer ce tableau en avançant que les niveaux des cytokines pro-inflammatoires et des marqueurs immuns tendent à augmenter alors que les niveaux des cytokines anti-inflammatoires ont plutôt tendance à demeurer stables. Ces résultats illustrent la complexité des interactions entre les mécanismes inflammatoires et immuns au cours de l'infarctus aigu du myocarde. De manière générale, les résultats apportés dans cette sous-étude abondent dans le même sens que les hypothèses suggérées précédemment et suggèrent la présence majeure d'un état inflammatoire/immun complexe entourant la phase aiguë d'un STEMI traité par angioplastie.

6.4 Interactions cholestérol-plaquettes-complément

Depuis quelques décennies, il est mentionné dans la littérature que l'activation du complément permet l'activation des plaquettes [183, 307], accentuant ainsi les conséquences de l'activation plaquettaire dans le développement des SCA. À l'inverse, il a été démontré plus récemment que les plaquettes activées pouvaient elles aussi activer le complément [184, 380].

Dans une des sections de nos travaux, nous avons entrepris de caractériser l'activation du complément par les plaquettes et les microparticules chez des patients hypercholestérolémiques non-traités et d'explorer les effets d'un traitement par l'atorvastatine, un inhibiteur de l'HGM-CoA réductase utilisée dans le traitement de l'hypercholestérolémie.

6.4.1 Activation du complément et activation plaquettaire dans l'hypercholestérolémie

Les articles #1, 2 et 3 se juxtaposent pour souligner le rôle du complément dans l'infarctus aigu du myocarde. Selon le degré de sévérité de la maladie, différentes voies d'activation sont impliquées, aboutissant ou non à la formation du complexe terminal membranaire, et conséquemment à la lyse cellulaire. Nous avons établi nos conclusions à partir de données sériques, mais aussi à partir d'un modèle *in vitro* impliquant des cellules endothéliales (HUVEC). Les interactions entre le complément et l'endothélium dans les SCA sont nombreuses, d'où la pertinence d'étudier ce modèle qui nous a permis de

constater les effets d'une activation du complément sur l'intégrité des cellules endothéliales. Les plaquettes sont des joueurs-clés dans le processus de la thrombose et de la progression vers le thrombus occlusif ou partiellement occlusif ; ils sont associés avec les SCA. En comprenant mieux ce qui régit les interactions entre le complément et les plaquettes, nous saisissons davantage les mécanismes par lesquels le complément déverse ses effets délétères dans la maladie.

6.4.1.1 *Les aspects techniques*

Dans un premier temps, des prélèvements (contenant 0.105 M de citrate de sodium) ont été faits dans deux groupes de patients que nous avons sélectionnés judicieusement : l'un sans maladie coronarienne connues et l'autre, avec des LDL élevés (LDL >3.5 mmol/L à jeun) mais dont l'hypercholestérolémie n'était pas traitée. Ces patients ont été soumis à un traitement par atorvastatin 40 mg pendant 6 semaines, après quoi un second prélèvement a été fait.

Du plasma riche en plaquettes (PRP) a été formé à partir du sang de ces patients et des agrégations ont été effectuées. Immédiatement après les agrégations, du futhan (FUT-175, nefamostat mesilate) a été ajouté aux échantillons dans le but de diminuer l'activation *in vitro* du complément⁸. Une partie des analyses ont été effectuées directement sur les plaquettes agrégées et d'autres ont été faites dans les surnageants des plaquettes agrégées. Sur les plaquettes agrégées⁹, nous avons mesuré la formation de C5b-9 membranaire grâce à la cytométrie en flux et observé la présence de p-sélectine, annexine V et C5b-9 grâce à la microscopie confocale.

⁸ Le futhan est un inhibiteur de serine protéase. Il inhibe la trypsine, la chymotrypsin, la thrombine, la plasmine, les kallikréines plasmatiques et pancréatiques, les protéases du complément (C1r, C1s, facteur B, facteur D), le facteur Xa, le facteur de Hageman, le granzyme A, le complexe facteur tissulaire-facteur VII et la tryptase.

⁹ Les plaquettes non-agrégées contenues dans le PRP ou le surnageant obtenu suite à des centrifugations additionnelles, ont servi de contrôle négatif aux fins de l'étude.

Dans les surnageants, nous avons mesuré la quantité d'anaphylatoxines (C3a, C4a, C5a) et de microparticules plaquettaires formées suite à l'agrégation plaquettaire par cytométrie en flux. Une ultracentrifugation a été nécessaire pour isoler les microparticules plaquettaires dans le but d'effectuer un dosage des protéines (BCA assay kit, Fischer Scientific) et de visualiser la formation de C5b-9 à la surface des PMP. Le dosage de C5b-9 à la surface des microparticules n'a malheureusement pas pu être fait par cytométrie en flux, comme pour les plaquettes, car le marquage du C5b-9 nécessite plusieurs lavages, ce qui cause un problème de logistique lors de l'étude des microparticules. Évidemment, un couplage direct de l'anticorps primaire et secondaire serait à considérer pour d'éventuelles études.

6.4.1.2 L'activation du complément dans l'agrégation plaquettaire

L'analyse des résultats fut fort intéressante. D'abord, en observant la cinétique de formation de C5b-9 à la surface des plaquettes agrégées, nous avons souligné que l'activation du complément par les plaquettes activées est potentialisée très tôt par une agrégation au collagène, par rapport aux autres agonistes utilisés. De plus, nous avons démontré que l'expression en p-sélectine était proportionnelle à la formation de C5b-9 à la surface des membranes des plaquettes activées. Le collagène est l'un des constituants importants de la matrice extracellulaire et un agoniste puissant des plaquettes [443]. Après adhésion, les plaquettes sont activées par le collagène sous-endothélial et par la thrombine présente à leur surface. Les plaquettes interagissent avec le collagène par la GPIa-IIa et le GPVI et ceci déclenchera une augmentation des concentrations de calcium dans le cytosol. Cette augmentation de calcium favorisera l'activation, l'adhésion, la relâche du contenu des granules et l'agrégation des plaquettes. Un contact succinct avec le collagène permet aux plaquettes d'activer rapidement le complément et de générer le complexe C5b-9 à la surface de ses membranes. D'un point de vue physiologique, ce mécanisme est important puisqu'il a été démontré que des concentrations non-lytiques de C5b-9 à la surface des plaquettes potentialisent l'activation des plaquettes, leur sécrétion et l'augmentation de leur

activité pro-coagulante [444]. De quelle manière cette activation du complément peut-elle avoir eu lieu ?

Il a été démontré que les plaquettes peuvent activer le complément par la voie alterne (interaction entre la p-sélectine et le C3b du complément) et par la voie classique (interaction entre le gC1qR et le C1q du complément) [184, 380]. Nos résultats démontrent que l'activation du complément par les plaquettes dépend de l'agoniste utilisé, mais jusqu'à un certain point : la présence de C3a et de C4a dans le surnageant d'agrégation plaquettaire diminue proportionnellement à la puissance de l'activateur utilisé. Ainsi, nous avons observé plus de C3a et de C4a dans le surnageant de plaquettes non-activées (sans agonistes) et une concentration décroissante en présence d'ADP, TRAP, collagène et de l'ionophore calcique A23187, respectivement. Bien qu'il paraisse à première vue contradictoire, ce phénomène est bien explicable. Il a été démontré que les granules- α des plaquettes génèrent le C1inh, protéine régulatrice du complément [445, 446]. Tel que décrit au chapitre 2, le C1inh est un inhibiteur des sérines protéases et prévient le clivage protéolytique de la protéine C4 et C2 par le complexe C1 de la voie classique ou le MBL de la voie lectine. Il est important de noter aussi que le C1inh inhibe aussi des protéinases des autres systèmes, soit du système de la coagulation, de la fibrinolyse et des kinines. Il est un des inhibiteurs les plus importants de la kallikréine plasmatique, et des facteurs XIa et XIIa de la coagulation [446]. Ainsi, nous pouvons supposer que, chez des individus sains et en bonne santé, la production et la sécrétion de C1inh à la surface des plaquettes serait proportionnelle à la puissance de l'agoniste utilisé. Ainsi, chez les donneurs sains, plus les plaquettes sont activées, plus elles sécrètent de C1inh et moins l'activation par la voie classique et lectine a lieu, d'où le pourquoi de concentrations graduellement plus faibles de C4a (voie classique et lectine) et C3a (voie proximale commune) en présence d'agoniste de plus en plus puissants. Par opposition à ce phénomène, la production de C5a semblait peu affectée par le choix de l'agoniste, puisque les niveaux sont demeurés généralement bas et stables d'un agoniste à l'autre par rapport au contrôle (plaquettes non agrégées).

Chez les patients hypercholestérolémiques, les niveaux de C3a et de C4a, retrouvés dans les surnageants d'agrégation sont au moins deux fois plus élevés que chez les donneurs sains, et ce pour tous les agonistes. De plus, contrairement au phénomène précédent où la production de C3a et C4a était dépendante de l'agoniste utilisé, la production de ces cytokines ne varie pas d'un agoniste à l'autre. Ce qui est d'autant plus intéressant dans ce groupe de patients est que les valeurs de C5a suivant une agrégation à l'ADP ou à l'A23185 sont pratiquement les mêmes que celle observées chez les donneurs sains, alors que les niveaux de C5a retrouvés dans le surnageant suite à une agrégation au TRAP et surtout au collagène sont plus du double de celles observées chez les donneurs sains. De plus, l'expression de C5b-9 à la surface des plaquettes activées, a tendance à être plus élevée chez les patients avec hypercholestérolémie. Mis ensemble, ces résultats suggèrent que l'activation du complément par les plaquettes varie selon le contexte physiopathologique et serait plus sensible au collagène dans les deux cas, Ainsi, chez les donneurs sains, on pourrait supposer que le complément n'est pas activé par la voie classique ou par la voie lectine, vu l'action présumée du C1inh expliqué précédemment. Nos résultats de l'article #4 démontrent aussi que la présence de C5b-9 dans les agrégats est proportionnelle au pourcentage d'agrégation et à la l'expression de la p-sélectine, sans toutefois démontrer une colocalisation avec cette dernière au sein de l'agrégat. Par conséquent, nous ne pouvons non plus estimer que le complément y est activé par la voie alterne puisque les niveaux de C3b sont faibles, malgré des concentrations relativement élevées de C5a par rapport aux patients avec hypercholestérolémie.

L'hypercholestérolémie a été associée avec des niveaux sériques élevés de C3 et C4 [447, 448]. Chez les patients hypercholestérolémiques, nous suggérons donc que les concentrations déjà élevées des anaphylatoxines C3a et C4a dans le plasma (élevé dans le contrôle PRP non agrégé) viendraient masquer les effets du C1inh produit par les plaquettes activées. Il faut préciser que bien qu'ils soient indépendants des agonistes utilisés, les niveaux de C3a et C4a sont élevés, ce qui signifie un recrutement important de leucocytes au site de la lésion accompagné d'une augmentation de la perméabilité vasculaire. Le dépôt

de C5b-9 à la surface des plaquettes activées engendre l'activation et la sécrétion des plaquettes [444]. L'augmentation des niveaux de C5a en présence de TRAP et surtout de collagène en discordance avec l'augmentation des autres anaphylatoxines laisse supposer la présence d'un mécanisme qui pourrait ne pas dépendre des voies proximales conventionnelles d'activation du complément.

En parallèle avec l'analyse des niveaux d'anaphylatoxines, nous avons mesuré les microparticules plaquettaires formées suite à l'agrégation par les différents agonistes à l'aide de la cytométrie en flux. Les résultats obtenus abondent dans le même sens que les précédents : la production de microparticules plaquettaires, suite à l'activation des plaquettes, est augmentée dans l'hypercholestérolémie, et ce principalement suivant une agrégation au collagène. Les analyses effectuées en western blot suivant l'isolement des microparticules par ultracentrifugation démontrent que le complexe terminal du complément a tendance à se retrouver davantage sur les microparticules provenant d'une agrégation par collagène. La concordance de ces résultats s'explique en partie par un mécanisme largement décrit dans le chapitre 2 et ailleurs. Sims a démontré il y a plus de deux décennies que les plaquettes endommagées par les C5b-9 à leur surface se vésiculisent dans le but de se débarrasser de ses complexes et d'acquérir de nouveau leur intégrité membranaire [317]. Dans le cas présent, la relation entre la formation de C5b-9 à la membrane des plaquettes activées, la formation de microparticules plaquettaires et la formation de C5b-9 à la surface des microparticules reflète ce mécanisme décrit par Sims.

6.4.1.3 Le traitement par atorvastatin

Dans un deuxième temps, nous avons analysé les effets d'un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, l'atorvastatine, sur cette activation du complément. Nous avons par le fait même caractérisé les interactions existant entre les microparticules issues de l'agrégation plaquettaire et l'activation du complément avant et après prise la prise d'atrovastatin.

Les constatations faites dans notre modèle d'étude furent étonnantes. Dans un premier temps, nous avons découvert que l'atorvastatine diminue l'activation de la phase terminale du complément sur l'agrégation plaquettaire. Les résultats étaient plutôt stable

d'un agoniste à l'autre quant à la production de C3a et de C4a, avec des diminutions présentes, mais assez faibles. Cependant, l'atorvastatine a réussi à diminuer plus du double des concentrations de C5a présentes dans le surnageant d'agrégation. De plus, bien qu'elle n'ait pas eu d'effet apparent en présence de TRAP, l'atorvastatin a fait drastiquement chuter de trois (3) fois la quantité de microparticules plaquettaires formées après l'agrégation en collagène. Les tests effectués en western blot démontrent aussi une diminution marquée de la formation de C5b-9 à la surface de microparticules plaquettaires (figure 8b de l'article #4).

Très peu d'études démontrent le rôle potentiel des statines dans la régulation de l'activation du complément. Les quelques résultats que nous avons s'avèrent très controversés [46, 449]. Mason a démontré que les statines stimulent l'expression de DAF (désassemble les C3 et C5 convertases) à la surface des cellules endothéliales ; il suggère que ce mécanisme serait protecteur dans l'athérosclérose puisqu'il limiterait les dommages causés par l'activation du complément [449]. Une étude plus récente, mais conduite cette fois dans l'arthrite rhumatoïde, a démontré que les statines pouvaient réguler le complément en augmentant la production de CD59 (protéine régulatrice de l'insertion du complexe terminal dans les membranes) par les cellules endothéliales en condition d'hypoxie, diminuer la production des protéines C3 et C9, et finalement inhiber la lyse cellulaire [47]. Une autre étude suggère que l'inhibition de HMG-CoA reductase dans les cellules musculaires lisses réduit à la fois les effets pro-inflammatoires et pro-mitotiques du C5b-9 par la régulation négative de l'activation du NF- κ B et de l'AP-1, et par l'inhibition de l'activation de ERK1/2 [450].

Plus près de notre pathologie ciblée, une étude supplémentaire a décrit la capacité de l'atorvastatin à réduire l'activation du complément chez des patients avec des valeurs élevées de C3 mais aussi de cholestérol total par rapport aux valeurs physiologiques normales. Chez ces patients, un traitement par atorvastatin (10 mg/jour) et vitamine E (600 IU/jour) pendant 3 mois avait réussi à faire diminuer les niveaux plasmatiques de C3 de manière considérable [451].

Les résultats de notre étude suggèrent que l'atorvastatin pourrait réduire les effets délétères engendrés par une activation excessive de la phase terminale du complément par les plaquettes activées chez les patients hypercholestérolémiques.

6.4.1.4 La voie des protéases extrinsèques

D'après nos résultats, l'activation du complément suivant l'agrégation plaquettaire serait potentialisée dans l'hypercholestérolémie. Si l'on transpose cette conclusion en clinique, ceci signifierait que les patients avec un taux élevé de LDL seraient plus à risques que les patients avec cholestérol normaux de former des «thrombus blanc» occlusifs, générés par les effets délétères d'une activation exagérée du complément (recrutement des leucocytes au site de la lésion, activation plaquettaire, sécrétion et augmentation de l'activité pro-coagulante des plaquettes, etc.)

Par conséquent, nous supposons une activation du complément soit par d'autres protéines relâchées par les plaquettes (donc autre que le gC1qR et la p-sélectine) qui viendraient agir en amont des C3 convertase, soit par la voie des protéases extrinsèques. La thrombine serait un bon candidat dans l'activation du complément par une action directe sur le C5 [251, 255] alors que la thrombospondine pourrait être un bon candidat relâché par les plaquettes activées pour assurer l'activation terminale du complément. La thrombospondine-1 (TSP-1) est une glycoprotéine relâchée par les granules α des plaquettes [230]. Dans son étude, Mnjoyan a démontré que le facteur H, une protéine qui déstabilise la C3 convertase, interagirait avec la TSP-1 à la surface des plaquettes lavées et activées à la thrombine par sa portion C-terminale [231]. Le rôle de cette interaction n'est cependant pas bien défini. Nous pouvons émettre comme hypothèse que la TSP-1 inhiberait l'activité du facteur H, et potentialiserait ainsi l'activation de la phase terminale du complément.

Dans la dernière année de mon stage, j'ai amorcé des travaux qui allaient nous permettre de mieux comprendre le mécanisme d'activation du complément dans la thrombose artérielle. Les investigations des dernières années tendent à vouloir démonter la forte interaction existant entre le système de la coagulation et le système du complément

[251, 255]. La thrombine, par exemple, active la composante C5 du complément directement, dans l'activation des autres protéines en aval [251]. Nous pourrions extrapoler ces résultats et les nôtres pour suggérer que l'assemblage des composantes du complément sur les microparticules pourrait augmenter significativement la génération de médiateurs inflammatoires.

Les travaux que j'ai amorcés concernent le rôle de la TSP-1 dans l'activation du complément. Bon nombre d'évidences attestent qu'il existe plusieurs interactions entre la TSP-1 et le système du complément, et plus particulièrement la voie alterne. La TSP-1 est une glycoprotéine multifonctionnelle de 451 kDa relâchée, entre autre, par les granules α des plaquettes durant leur activation [230]. Elle représente 25 % des protéines relâchées par les plaquettes actives par thrombine. Constitutivement présente en circulation, la TSP-1 a une concentration physiologique de 60 à 300 η g/mL. Elle peut induire l'agrégation des plaquettes via le CD47 (IAP, *integrin-associated protein*) et le fibrinogène. Il a été démontré que des anticorps anti-TSP-1 peuvent inhiber l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine et le collagène. La TSP-1 a un rôle controversé : elle peut à la fois réguler positivement et négativement un grand nombre de fonctions cellulaires, telle l'adhésion, la motilité, la prolifération et l'apoptose [452]. Elle est connue pour son rôle dans divers processus physiologiques ou physiopathologiques, tel l'angiogenèse, l'inflammation, l'athérosclérose, l'hémostase et surtout, ce qui nous intéresse présentement, la thrombose. À la fin de l'année 2007, en effectuant un stage dans le laboratoire du Dr Bernard Lévy à Paris (Hôpital Lariboisière, Paris, France) j'ai pu explorer en partie les effets ambivalents de la TSP-1 dans l'adhésion des cellules progénitrices à l'endothélium vasculaire¹⁰.

La figure 15 illustre les différentes interactions qui nous laissent suspecter un rôle potentiel de la TSP-1 dans la régulation de l'activation du complément par la voie alterne. La TSP-1 possède évidemment une grande homologie de séquences d'acides aminés avec la properdine, la protéine de régulation positive de la C3 convertase alterne (properdin-like

¹⁰ Malheureusement, ces résultats ne seront pas discutés pour cause de confidentialité.

type I repeats) [453]. Il a été démontré en 2006 que des concentrations non-lytiques en C5b-9 induisent la production de TSP-1 dans les cellules mésangiales chez le rat [454]. Des associations ont aussi été faites entre le facteur H et la TSP-1 : Vaziri-Sani a démontré que la TSP-1 liait facteur H et augmentait la liaison du facteur H aux plaquettes [231]. La même équipe a aussi soulevé que dans les syndromes atypiques urémiques hémolytiques, aHUS (*atypical hemolytic uremic syndrome*), une dysfonction en facteur H contribuait à la déposition des protéines du complément sur les plaquettes, engendrant ainsi l'activation de ces dernières [455].

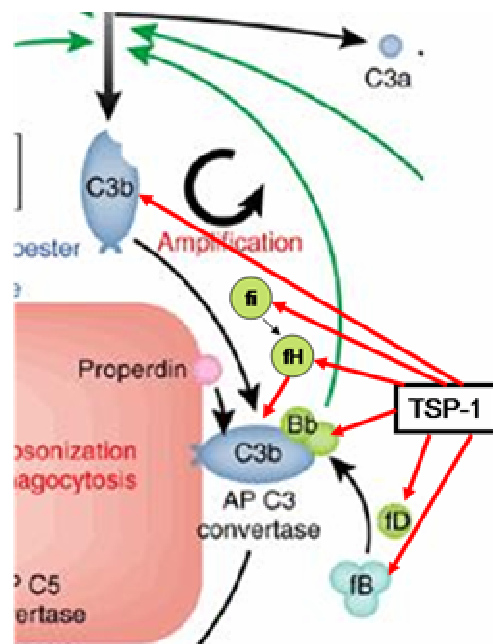


Figure 15. Interactions TSP-1/C3 convertase alterne qui sont ou seront caractérisées dans notre laboratoire.

À partir de ces observations et des évidences suggérées par nos propres expériences de l'existence de mécanismes autres que ceux déjà décrits dans les interactions plaquettes-

complément, nous avons soulevé l'hypothèse que la TSP-1 pourrait avoir un rôle de premier plan dans l'activation du complément par les plaquettes. Nous avons donc entrepris de caractériser les interactions possibles entre la TSP-1 et les convertases de la voie alterne. Ainsi, nous pourrions établir le rôle de la TSP-1 dans la stabilisation ou l'initiation des convertases de la voie alterne et, à l'inverse, déterminer si les protéases du complément ont un effet protéolytique sur la TSP-1 potentialisant son caractère pro- ou anti-athérogénique. À l'aide de test ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) et de résonance des plasmons de surface (*Surface Plasmon Resonance* (BIAcore)), nous pourrions caractériser les interactions TSP-1/Convertases de la voie alterne en termes de spécificité, d'affinité et de cinétique. La figure 16 représente les premiers résultats que nous avons obtenus concernant la liaison entre la TSP-1 et les composantes de la C3 convertase par des tests ELISA, suivant d'innombrables mises au point méthodologiques. De manière générale, nous avons fait adhérer les différentes composantes de la C3 convertase (facteurs B, I, D, H, properdine et C3b) au fond des puits de la plaque (96 puits) et observer la capacité de la TSP-1 à lier ces protéines. Nos résultats abondent dans le sens de la littérature et suggèrent une interaction entre la TSP-1 et le facteur H, et une interaction encore plus importante avec la properdine, cette protéine de régulation positive du complément. Bien que ces expériences en soient encore à leur phase préliminaire, nous pouvons suspecter que la TSP-1 pourrait avoir un rôle dans la stabilisation de la convertase, conduisant ainsi à la formation du complexe terminal et à la mise en place des effets nuisibles dans la maladie coronarienne aiguë. Évidemment, l'ambivalence fonctionnelle nous empêche pour l'instant d'établir un rôle clair de la TSP-1 dans cette interaction.

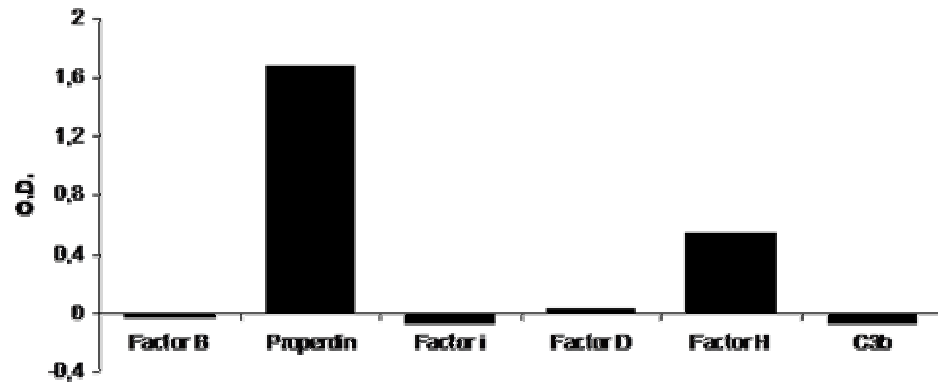


Figure 16. Interactions entre la TSP-1 et les différentes composantes de la C3 convertase de la voie alterne du complément.

En parallèle, nous avons planifié étudier les mécanismes d'activation du complément dans des souris TSP-1^{-/-}. À l'aide de la microscopie intravitale, nous voulons particulièrement visualiser la formation des convertases de la voie alterne et l'assemblage du complexe terminal dans ces conditions physiologiques. Le travail concernant cette voie d'étude a été amorcé : j'ai en effet effectué le travail de génotypage des souris (PCR) dans le but de permettre à l'étudiante qui prendra ma relève de commencer adéquatement les tests intravitaux.

6.5 Sommaire des principales observations

L'objectif global de mon travail de doctorat a été atteint : la progression des travaux effectués tout au long de mon cursus et la mise en place consécutive d'hypothèses m'a permis de mieux caractériser les rôles physiopathologiques du complément dans les interactions inflammation-thrombose du syndrome coronarien aigu. Mon plan d'investigations interconnectées m'a amené à étudier l'implication du complément dans diverses manifestations de la maladie coronarienne, les liens suspectés entre l'activation du

complément et les niveaux élevés de cholestérol LDL sanguin ainsi que l'influence de l'activation plaquettaire sur l'activité du complément. Globalement, nous avons démontré de façon inédite que :

Article #1 :

- L'angine stable était associée à des taux faibles de MBL (article #1). Des études en cours de publication ou préliminaires nous laissent suggérer qu'en plus d'être favorables à la diminution du taux de mortalité post-infarctus, des niveaux bas en MBL favoriseraient une diminution de l'activité de la voie alterne.
- Les syndromes coronariens aigus sont associés à une activation importante de la voie alterne, conduisant à l'assemblage du complexe terminal à la surface des cellules endothéliales et à la fragmentation et à l'apoptose de ces cellules.

Article #2 et 3 :

- Le Pexelizumab ne permet pas d'inhiber totalement l'activation du C5 tel que détecté *ex vivo* et semble paradoxalement augmenter le taux de complexe terminal soluble (article #2).
- Le Pexelizumab diminue efficacement la formation du complexe terminal à la surface de cellules endothéliales en cultures sous l'effet du sérum de patients de l'étude APEX-AMI, mais cela n'a pas d'effet significatif sur l'apoptose induite par ces serum. L'ensemble de ces éléments peut contribuer à expliquer l'échec du médicament et aider à l'élaboration de futures stratégies pharmacologiques anti-complément.

Article #4 :

L'atorvastatine diminue l'activation du complément induite par les plaquettes activées au collagène, ce qui constitue une avenue particulièrement intéressante à investiguer dans le traitement des maladies thrombo-inflammatoires.

Études en cours :

-La thrombospondine-1 est un partenaire d'interaction de la properdine et du facteur H. Nous explorons actuellement la relevance fonctionnelle de ces interactions dans un contexte *in vivo* (souris déficientes en thrombospondine-1).

Ensemble, l'étude du rôle spécifique des différentes voies d'activation du complément dans des contextes pathologiques variés, l'analyse des effets d'une inhibition spécifique de la protéine C5 du complément dans la progression des SCA et la mise en évidence des interactions entre l'activation du complément et les plaquettes activées ont contribué au développement d'une meilleure connaissance des rôles physiopathologiques du complément dans la progression de la maladie coronarienne.

7 CONCLUSION

L'effort, le temps et la passion que j'ai investis dans mes travaux de doctorat ont contribué au développement d'une meilleure connaissance des rôles physiopathologiques du complément dans la progression des syndromes coronariens aigus. Tout au long de mon projet, la pertinence des résultats obtenus me guidait vers de nouvelles interrogations et me permettait d'établir de nombreuses hypothèses successives. L'étude du rôle spécifique des différentes voies d'activation du complément dans des contextes pathologiques variés, l'analyse des effets d'une inhibition sélective de la protéine C5 du complément dans la progression des SCA comme la mise en évidence des interactions entre l'activation du complément et les plaquettes activées, m'ont permis de suggérer de nouvelles cibles thérapeutiques possibles dans la prévention et le traitement de la maladie coronarienne aiguë. En tant que pionnière de l'étude du système du complément dans le laboratoire du Dr Pierre Théroix, j'espère sincèrement que mes travaux, complétés ou amorcés, trouveront successeurs dans l'équipe. Les nombreuses mises au point et hypothèses soulevées faciliteront et surtout stimuleront, la poursuite des investigations.

Bien au-delà du développement de connaissances scientifiques et médicales spécifiques, ce stage dans le laboratoire du Dr. Pierre Théroix, une sommité incontestable en cardiologie, m'a rendu d'éminents services en me donnant la chance de développer une grande autonomie, une discipline indispensable et surtout la passion pour la recherche comme aussi la motivation à poursuivre mes aspirations dans le but de devenir une chercheuse indépendante et compétente dans le domaine des maladies cardiovasculaires.

Bibliographie

1. *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. JAMA, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
2. Walport, M.J., *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
3. Ridker, P.M., et al., *Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events*. N Engl J Med, 2002. **347**(20): p. 1557-65.
4. Khot, U.N., et al., *Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease*. JAMA, 2003. **290**(7): p. 898-904.
5. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
6. Libby, P., *Inflammation and cardiovascular disease mechanisms*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(2): p. 456S-460S.
7. Claeys, M.J., et al., *Determinants and prognostic implications of persistent ST-segment elevation after primary angioplasty for acute myocardial infarction: importance of microvascular reperfusion injury on clinical outcome*. Circulation, 1999. **99**(15): p. 1972-7.
8. Theroux, P., et al., *Prognostic significance of blood markers of inflammation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary angioplasty and effects of pexelizumab, a C5 inhibitor: a substudy of the COMMA trial*. Eur Heart J, 2005. **26**(19): p. 1964-70.
9. Marcheix, B., et al., *Effect of pericardial blood processing on postoperative inflammation and the complement pathways*. Ann Thorac Surg, 2008. **85**(2): p. 530-5.
10. Theroux, P. and C. Martel, *Complement activity and pharmacological inhibition in cardiovascular disease*. Can J Cardiol, 2006. **22 Suppl B**: p. 18B-24B.
11. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
12. Vlaicu, R., et al., *Quantitative determinations of immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic wall*. Med Interne, 1985. **23**(1): p. 29-35.
13. Vlaicu, R., et al., *Immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic intima*. Atherosclerosis, 1985. **55**(1): p. 35-50.
14. Shoenfeld, Y., Y. Sherer, and D. Harats, *Artherosclerosis as an infectious, inflammatory and autoimmune disease*. Trends Immunol, 2001. **22**(6): p. 293-5.
15. Abou-Raya, A. and S. Abou-Raya, *Inflammation: a pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis*. Autoimmun Rev, 2006. **5**(5): p. 331-7.
16. Hallenbeck, J.M., G.K. Hansson, and K.J. Becker, *Immunology of ischemic vascular disease: plaque to attack*. Trends Immunol, 2005. **26**(10): p. 550-6.

17. Danesh, J., et al., *C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease*. N Engl J Med, 2004. **350**(14): p. 1387-97.
18. Savchenko, A., et al., *Expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerotic lesions*. J Pathol, 2008. **215**(1): p. 48-55.
19. Liuzzo, G., et al., *The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina*. N Engl J Med, 1994. **331**(7): p. 417-24.
20. Inoue, K., et al., *Establishment of a high sensitivity plasma assay for human pentraxin3 as a marker for unstable angina pectoris*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 161-7.
21. Salio, M., et al., *Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction*. Circulation, 2008. **117**(8): p. 1055-64.
22. Gotto, A.M., Jr., *Treating hypercholesterolemia: looking forward*. Clin Cardiol, 2003. **26**(1 Suppl 1): p. I21-8.
23. Dagenais, G.R., et al., *Effects of ramipril on coronary events in high-risk persons: results of the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study*. Circulation, 2001. **104**(5): p. 522-6.
24. Packer, M., et al., *Effect of amlodipine on morbidity and mortality in severe chronic heart failure. Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation Study Group*. N Engl J Med, 1996. **335**(15): p. 1107-14.
25. *Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration*. BMJ, 1994. **308**(6921): p. 81-106.
26. *A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee*. Lancet, 1996. **348**(9038): p. 1329-39.
27. Yusuf, S., et al., *Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation*. N Engl J Med, 2001. **345**(7): p. 494-502.
28. Coons, J.C. and S. Battistone, *2007 Guideline update for unstable angina/non-ST-segment elevation myocardial infarction: focus on antiplatelet and anticoagulant therapies*. Ann Pharmacother, 2008. **42**(7): p. 989-1001.
29. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 310-8.
30. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)*. N Engl J Med, 1992. **326**(4): p. 242-50.
31. Mora, S. and P.M. Ridker, *Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER)--can C-reactive protein be used to target statin therapy in primary prevention?* Am J Cardiol, 2006. **97**(2A): p. 33A-41A.
32. Ridker, P.M., et al., *Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein*. N Engl J Med, 2008. **359**(21): p. 2195-207.

33. Comparato, C., et al., *Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction?* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2001. **11**(5): p. 328-43.
34. Rosenson, R.S. and C.C. Tangney, *Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction.* JAMA, 1998. **279**(20): p. 1643-50.
35. Lusis, A.J., *Atherosclerosis.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
36. Vuilleumier, N., et al., *Presence of autoantibodies to apolipoprotein A-1 in patients with acute coronary syndrome further links autoimmunity to cardiovascular disease.* J Autoimmun, 2004. **23**(4): p. 353-60.
37. Ledoux, S., et al., *Lovastatin enhances ecto-5'-nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: implication of rho-family GTPases.* Circ Res, 2002. **90**(4): p. 420-7.
38. Zeiser, R., et al., *Regulation of different inflammatory diseases by impacting the mevalonate pathway.* Immunology, 2008.
39. Kwak, B., et al., *Statins as a newly recognized type of immunomodulator.* Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1399-402.
40. Weitz-Schmidt, G., et al., *Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site.* Nat Med, 2001. **7**(6): p. 687-92.
41. McInnes, I.B., B.P. Leung, and F.Y. Liew, *Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T lymphocytes and synovial cells.* Arthritis Res, 2000. **2**(5): p. 374-8.
42. McKay, A., et al., *A novel anti-inflammatory role of simvastatin in a murine model of allergic asthma.* J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2903-8.
43. Meroni, P.L., et al., *Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(12): p. 2870-8.
44. Ferrara, D.E., et al., *Inhibition of the thrombogenic and inflammatory properties of antiphospholipid antibodies by fluvastatin in an in vivo animal model.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(11): p. 3272-9.
45. Ehrenstein, M.R., E.C. Jury, and C. Mauri, *Statins for atherosclerosis--as good as it gets?* N Engl J Med, 2005. **352**(1): p. 73-5.
46. Lappégard, K.T., T. Hvassing, and T.E. Mollnes, *Statin drugs do not affect serum complement activation in vitro.* Scand J Immunol, 2004. **60**(1-2): p. 178-83.
47. Kinderlerer, A.R., et al., *Statin-induced expression of CD59 on vascular endothelium in hypoxia: a potential mechanism for the anti-inflammatory actions of statins in rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther, 2006. **8**(4): p. R130.
48. Schafer, K., K. Kaiser, and S. Konstantinides, *Rosuvastatin exerts favourable effects on thrombosis and neointimal growth in a mouse model of endothelial injury.* Thromb Haemost, 2005. **93**(1): p. 145-52.
49. Undas, A., J. Brozek, and J. Musial, *Anti-inflammatory and antithrombotic effects of statins in the management of coronary artery disease.* Clin Lab, 2002. **48**(5-6): p. 287-96.

50. Serebruany, V.L., et al., *Absence of interaction between atorvastatin or other statins and clopidogrel: results from the interaction study*. Arch Intern Med, 2004. **164**(18): p. 2051-7.
51. Puccetti, L., et al., *Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolaemia*. Eur J Clin Invest, 2002. **32**(12): p. 901-8.
52. Mosheimer, B.A., et al., *CD40-ligand-dependent induction of COX-2 gene expression in endothelial cells by activated platelets: inhibitory effects of atorvastatin*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2005. **16**(2): p. 105-10.
53. Libby, P., *Molecular bases of the acute coronary syndromes*. Circulation, 1995. **91**(11): p. 2844-50.
54. Theroux, P., *Perspectives on acute coronary syndromes*. Can J Cardiol, 2005. **21**(12): p. 1053-60.
55. Lamon, B.D. and D.P. Hajjar, *Inflammation at the molecular interface of atherogenesis: an anthropological journey*. Am J Pathol, 2008. **173**(5): p. 1253-64.
56. Resnick, N., et al., *Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2000. **11**(2): p. 167-77.
57. Sary, 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, 1995. **15**(9): p. 1512-31.
58. Valgimigli, M., et al., *Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress*. Arch Biochem Biophys, 2003. **420**(2): p. 255-61.
59. Steinberg, D., *Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis*. Circulation, 1997. **95**(4): p. 1062-71.
60. Lind, L., *Circulating markers of inflammation and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2003. **169**(2): p. 203-14.
61. Zwaka, T.P., V. Hombach, and J. Torzewski, *C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis*. Circulation, 2001. **103**(9): p. 1194-7.
62. Blankenberg, S., et al., *Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease*. Circulation, 2003. **107**(12): p. 1579-85.
63. Inaba, K. and R.M. Steinman, *Accessory cell-T lymphocyte interactions. Antigen-dependent and -independent clustering*. J Exp Med, 1986. **163**(2): p. 247-61.
64. Mach, F., et al., *Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor*. Circulation, 1997. **96**(2): p. 396-9.
65. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
66. Fuster, V., et al., *Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(6): p. 937-54.

67. Libby, P. and P. Theroux, *Pathophysiology of coronary artery disease*. Circulation, 2005. **111**(25): p. 3481-8.
68. Barger, A.C. and R. Beuwkes, 3rd, *Rupture of coronary vasa vasorum as a trigger of acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1990. **66**(16): p. 41G-43G.
69. Loree, H.M., et al., *Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels*. Circ Res, 1992. **71**(4): p. 850-8.
70. Lerman, A., et al., *Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans*. Circulation, 1995. **92**(9): p. 2426-31.
71. Steinhubl, S.R. and D.J. Moliterno, *The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis*. Am J Cardiovasc Drugs, 2005. **5**(6): p. 399-408.
72. Davies, S.W., *Clinical presentation and diagnosis of coronary artery disease: stable angina*. Br Med Bull, 2001. **59**: p. 17-27.
73. Paoletti, R., A.M. Gotto, Jr., and D.P. Hajjar, *Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III20-6.
74. Braunwald, E., et al., *ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina)*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(3): p. 970-1062.
75. Braunwald, E., *Unstable angina. A classification*. Circulation, 1989. **80**(2): p. 410-4.
76. Gluckman, T.J., et al., *A simplified approach to the management of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes*. JAMA, 2005. **293**(3): p. 349-57.
77. Keeley, E.C., J.A. Boura, and C.L. Grines, *Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials*. Lancet, 2003. **361**(9351): p. 13-20.
78. Eltzschig, H.K. and C.D. Collard, *Vascular ischaemia and reperfusion injury*. Br Med Bull, 2004. **70**: p. 71-86.
79. Mastellos, D., et al., *Complement: structure, functions, evolution, and viral molecular mimicry*. Immunol Res, 2003. **27**(2-3): p. 367-86.
80. Schmidt, B.Z. and H.R. Colten, *Complement: a critical test of its biological importance*. Immunol Rev, 2000. **178**: p. 166-76.
81. Bohana-Kashtan, O., et al., *Cell signals transduced by complement*. Mol Immunol, 2004. **41**(6-7): p. 583-97.
82. Rawal, N. and M.K. Pangburn, *C5 convertase of the alternative pathway of complement. Kinetic analysis of the free and surface-bound forms of the enzyme*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 16828-35.
83. Rawal, N. and M.K. Pangburn, *Structure/function of C5 convertases of complement*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(3): p. 415-22.
84. Rawal, N., R. Rajagopalan, and V.P. Salvi, *Activation of complement component C5: comparison of C5 convertases of the lectin pathway and the classical pathway of complement*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7853-63.
85. Vogt, W., *Anaphylatoxins: possible roles in disease*. Complement, 1986. **3**(3): p. 177-88.

86. Matthews, K.W., S.L. Mueller-Ortiz, and R.A. Wetsel, *Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation*. Mol Immunol, 2004. **40**(11): p. 785-93.
87. Ueda, A., et al., *Probing functional sites on complement protein B with monoclonal antibodies. Evidence for C3b-binding sites on Ba*. J Immunol, 1987. **138**(4): p. 1143-9.
88. Pryzdial, E.L. and D.E. Isenman, *Alternative complement pathway activation fragment Ba binds to C3b. Evidence that formation of the factor B-C3b complex involves two discrete points of contact*. J Biol Chem, 1987. **262**(4): p. 1519-25.
89. Kolb, W.P., P.R. Morrow, and J.D. Tamerius, *Ba and Bb fragments of factor B activation: fragment production, biological activities, neoepitope expression and quantitation in clinical samples*. Complement Inflamm, 1989. **6**(3): p. 175-204.
90. Spear, G.T., et al., *The role of the complement system in virus infections*. Curr Top Microbiol Immunol, 2001. **260**: p. 229-45.
91. Bernet, J., et al., *Viral mimicry of the complement system*. J Biosci, 2003. **28**(3): p. 249-64.
92. Heidelberger, M., *Quantitative chemical studies on complement or alexin. I. A method*. J Exp Med, 1941. **73**: p. 691.
93. Nelson, R., *The immune adherence phenomenon: an immunologically specific reaction between micro-organisms and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis*. Science, 1953. **118**: p. 733.
94. Podack, E.R., et al., *Membrane attack complex of complement: a structural analysis of its assembly*. J Exp Med, 1980. **151**(2): p. 301-13.
95. Rambach, G., R. Wurzner, and C. Speth, *Complement: an efficient sword of innate immunity*. Contrib Microbiol, 2008. **15**: p. 78-100.
96. Hughes, J., et al., *C5b-9 membrane attack complex mediates endothelial cell apoptosis in experimental glomerulonephritis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(5): p. F747-57.
97. 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, 2003. **108**(10): p. 1184-90.
98. de Zwaan, C., M.P. van Dieijen-Visser, and W.T. Hermens, *Prevention of cardiac cell injury during acute myocardial infarction: possible role for complement inhibition*. Am J Cardiovasc Drugs, 2003. **3**(4): p. 245-51.
99. Roos, A., et al., *Therapeutic inhibition of the early phase of complement activation*. Immunobiology, 2002. **205**(4-5): p. 595-609.
100. Harris, C.L., D.A. Fraser, and B.P. Morgan, *Tailoring anti-complement therapeutics*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 1019-26.
101. de Zwaan, C., et al., *Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2002. **23**(21): p. 1670-7.
102. Horstick, G., et al., *Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects*. Circulation, 2001. **104**(25): p. 3125-31.

103. Sahu, A. and J.D. Lambris, *Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics*. Immunopharmacology, 2000. **49**(1-2): p. 133-48.
104. Lazar, H.L., et al., *Total complement inhibition: an effective strategy to limit ischemic injury during coronary revascularization on cardiopulmonary bypass*. Circulation, 1999. **100**(13): p. 1438-42.
105. Kawano, M., *Complement regulatory proteins and autoimmunity*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2000. **48**(5): p. 367-72.
106. Brodbeck, W.G., et al., *Structure/function studies of human decay-accelerating factor*. Immunology, 2000. **101**(1): p. 104-11.
107. Kraus, D., M.E. Medof, and C. Mold, *Complementary recognition of alternative pathway activators by decay-accelerating factor and factor H*. Infect Immun, 1998. **66**(2): p. 399-405.
108. Barilla-LaBarca, M.L., et al., *Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6298-304.
109. Rodriguez de Cordoba, S., et al., *The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations*. Mol Immunol, 2004. **41**(4): p. 355-67.
110. Zipfel, P.F., et al., *The factor H protein family*. Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): p. 53-60.
111. Fearon, D.T. and K.F. Austen, *Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase*. J Exp Med, 1975. **142**(4): p. 856-63.
112. Kimura, Y., et al., *Activator-specific requirement of properdin in the initiation and amplification of the alternative pathway complement*. Blood, 2008. **111**(2): p. 732-40.
113. Hourcade, D.E., *The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement*. J Biol Chem, 2006. **281**(4): p. 2128-32.
114. Sims, P.J. and T. Wiedmer, *Repolarization of the membrane potential of blood platelets after complement damage: evidence for a Ca⁺⁺ -dependent exocytotic elimination of C5b-9 pores*. Blood, 1986. **68**(2): p. 556-61.
115. Morgan, B.P., *Effects of the membrane attack complex of complement on nucleated cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **178**: p. 115-40.
116. Morgan, B.P., et al., *Complement lysis of U937, a nucleated mammalian cell line in the absence of C9: effect of C9 on C5b-8 mediated cell lysis*. J Immunol, 1986. **136**(9): p. 3402-6.
117. Scolding, N.J., et al., *Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement*. Nature, 1989. **339**(6226): p. 620-2.
118. Moskovich, O. and Z. Fishelson, *Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex*. J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 29977-86.
119. Plow, E.F., *Vitronectin: back into the spotlight*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(5): p. 873-4.
120. Carney, D.F., T.J. Lang, and M.L. Shin, *Multiple signal messengers generated by terminal complement complexes and their role in terminal complement complex elimination*. J Immunol, 1990. **145**(2): p. 623-9.

121. Cybulsky, A.V., et al., *Cytosolic calcium and protein kinase C reduce complement-mediated glomerular epithelial injury*. *Kidney Int*, 1990. **38**(5): p. 803-11.
122. Kraus, S., R. Seger, and Z. Fishelson, *Involvement of the ERK mitogen-activated protein kinase in cell resistance to complement-mediated lysis*. *Clin Exp Immunol*, 2001. **123**(3): p. 366-74.
123. Reiter, Y., A. Ciobotariu, and Z. Fishelson, *Sublytic complement attack protects tumor cells from lytic doses of antibody and complement*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(5): p. 1207-13.
124. Dashiell, S.M., H. Rus, and C.L. Koski, *Terminal complement complexes concomitantly stimulate proliferation and rescue of Schwann cells from apoptosis*. *Glia*, 2000. **30**(2): p. 187-98.
125. Reiter, Y., et al., *Complement membrane attack complex, perforin, and bacterial exotoxins induce in K562 cells calcium-dependent cross-protection from lysis*. *J Immunol*, 1995. **155**(4): p. 2203-10.
126. Kraus, S. and Z. Fishelson, *Cell desensitization by sublytic C5b-9 complexes and calcium ionophores depends on activation of protein kinase C*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(5): p. 1272-80.
127. Niculescu, F. and H. Rus, *The role of complement activation in atherosclerosis*. *Immunol Res*, 2004. **30**(1): p. 73-80.
128. Petersen, S.V., et al., *Control of the classical and the MBL pathway of complement activation*. *Mol Immunol*, 2000. **37**(14): p. 803-11.
129. Moller-Kristensen, M., et al., *On the site of C4 deposition upon complement activation via the mannan-binding lectin pathway or the classical pathway*. *Scand J Immunol*, 2003. **57**(6): p. 556-61.
130. Takahashi, M., et al., *Requirements for the solubilization of immune aggregates by complement. The role of the classical pathway*. *J Clin Invest*, 1978. **62**(2): p. 349-58.
131. Botto, M., *Links between complement deficiency and apoptosis*. *Arthritis Res*, 2001. **3**(4): p. 207-10.
132. Lepow, I.H., et al., *Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities*. *J Exp Med*, 1963. **117**: p. 983-1008.
133. Ziccardi, R.J. and N.R. Cooper, *The subunit composition and sedimentation properties of human C1*. *J Immunol*, 1977. **118**(6): p. 2047-52.
134. Tenner, A.J., *C1q interactions with cell surface receptors*. *Behring Inst Mitt*, 1989(84): p. 220-9.
135. Kishore, U. and K.B. Reid, *C1q: structure, function, and receptors*. *Immunopharmacology*, 2000. **49**(1-2): p. 159-70.
136. Kishore, U., M.S. Kojouharova, and K.B. Reid, *Recent progress in the understanding of the structure-function relationships of the globular head regions of C1q*. *Immunobiology*, 2002. **205**(4-5): p. 355-64.
137. Muller-Eberhard, H.J. and H.G. Kunkel, *Isolation of a thermolabile serum protein which precipitates gamma-globulin aggregates and participates in immune hemolysis*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1961. **106**: p. 291-5.

138. McGreal, E. and P. Gasque, *Structure-function studies of the receptors for complement C1q*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 1010-4.
139. Wright, J.R., *Immunoregulatory functions of surfactant proteins*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(1): p. 58-68.
140. Ledue, T.B. and N. Rifai, *Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment*. Clin Chem, 2003. **49**(8): p. 1258-71.
141. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1805-12.
142. 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, 1998. **18**(9): p. 1386-92.
143. Krijnen, P.A., et al., *IgM colocalises with complement and C reactive protein in infarcted human myocardium*. J Clin Pathol, 2005. **58**(4): p. 382-8.
144. Sjowall, C., et al., *Anti-CRP autoantibody levels correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus*. Semin Arthritis Rheum, 2005. **35**(1): p. 65; author reply 66.
145. Mold, C., H. Gewurz, and T.W. Du Clos, *Regulation of complement activation by C-reactive protein*. Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): p. 23-30.
146. Bhakdi, S., et al., *Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(10): p. 2348-54.
147. Volanakis, J.E. and K.W. Wirtz, *Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers*. Nature, 1979. **281**(5727): p. 155-7.
148. Pepys, M.B., I.F. Rowe, and M.L. Baltz, *C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins*. Int Rev Exp Pathol, 1985. **27**: p. 83-111.
149. Agrawal, A., et al., *Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3998-4004.
150. Ji, S.R., et al., *Effect of modified C-reactive protein on complement activation: a possible complement regulatory role of modified or monomeric C-reactive protein in atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(4): p. 935-41.
151. Li, S.H., et al., *C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells*. Circulation, 2004. **109**(7): p. 833-6.
152. Gershov, D., et al., *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, 2000. **192**(9): p. 1353-64.
153. Pepys, M.B., et al., *Comparative clinical study of protein SAP (amyloid P component) and C-reactive protein in serum*. Clin Exp Immunol, 1978. **32**(1): p. 119-24.
154. Pepys, M.B. and M.L. Baltz, *Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein*. Adv Immunol, 1983. **34**: p. 141-212.

155. Assimeh, S.N. and R.H. Painter, *The identification of a previously unrecognized subcomponent of the first component of complement*. J Immunol, 1975. **115**(2): p. 482-7.
156. Hicks, P.S., et al., *Serum amyloid P component binds to histones and activates the classical complement pathway*. J Immunol, 1992. **149**(11): p. 3689-94.
157. Schwalbe, R.A., B. Dahlback, and G.L. Nelsestuen, *Independent association of serum amyloid P component, protein S, and complement C4b with complement C4b-binding protein and subsequent association of the complex with membranes*. J Biol Chem, 1990. **265**(35): p. 21749-57.
158. Garcia de Frutos, P., Y. Hardig, and B. Dahlback, *Serum amyloid P component binding to C4b-binding protein*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26950-5.
159. Gewurz, H., X.H. Zhang, and T.F. Lint, *Structure and function of the pentraxins*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(1): p. 54-64.
160. Klouche, M., et al., *Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 2004. **175**(2): p. 221-8.
161. Rolph, M.S., et al., *Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(5): p. e10-4.
162. Peri, G., et al., *PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans*. Circulation, 2000. **102**(6): p. 636-41.
163. Biro, A., et al., *Modified low density lipoproteins differentially bind and activate the C1 complex of complement*. Mol Immunol, 2007. **44**(6): p. 1169-77.
164. Henson, P.M. and D.A. Hume, *Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis*. Trends Immunol, 2006. **27**(5): p. 244-50.
165. Savill, J. and V. Fadok, *Corpse clearance defines the meaning of cell death*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 784-8.
166. Gaipal, U.S., et al., *Defects in the disposal of dying cells lead to autoimmunity*. Curr Rheumatol Rep, 2004. **6**(6): p. 401-7.
167. Halvorsen, B., et al., *Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque?* Prog Cardiovasc Dis, 2008. **51**(3): p. 183-94.
168. Mold, C. and C.A. Morris, *Complement activation by apoptotic endothelial cells following hypoxia/reoxygenation*. Immunology, 2001. **102**(3): p. 359-64.
169. Collard, C.D., et al., *Hypoxia-induced expression of complement receptor type 1 (CRI, CD35) in human vascular endothelial cells*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 1): p. C450-8.
170. Paidassi, H., et al., *C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2329-38.
171. Familian, A., et al., *Chromatin-independent binding of serum amyloid P component to apoptotic cells*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 647-54.
172. Zwart, B., et al., *Complement activation by apoptotic cells occurs predominantly via IgM and is limited to late apoptotic (secondary necrotic) cells*. Autoimmunity, 2004. **37**(2): p. 95-102.

173. Ciurana, C.L., et al., *Complement activation by necrotic cells in normal plasma environment compares to that by late apoptotic cells and involves predominantly IgM*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2609-19.
174. Elward, K., et al., *CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 36342-54.
175. Jones, J. and B.P. Morgan, *Apoptosis is associated with reduced expression of complement regulatory molecules, adhesion molecules and other receptors on polymorphonuclear leucocytes: functional relevance and role in inflammation*. Immunology, 1995. **86**(4): p. 651-60.
176. Cole, D.S., et al., *Complement regulator loss on apoptotic neuronal cells causes increased complement activation and promotes both phagocytosis and cell lysis*. Mol Immunol, 2006. **43**(12): p. 1953-64.
177. Trouw, L.A., et al., *C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack*. J Biol Chem, 2007. **282**(39): p. 28540-8.
178. Peake, P.W., et al., *Adiponectin binds C1q and activates the classical pathway of complement*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **367**(3): p. 560-5.
179. te Velhuis, H., et al., *Specific complement inhibition with heparin-coated extracorporeal circuits*. Ann Thorac Surg, 1996. **61**(4): p. 1153-7.
180. Wagner, D.D., *New links between inflammation and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(7): p. 1321-4.
181. Arumugam, T.V., et al., *The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury*. Shock, 2004. **21**(5): p. 401-9.
182. Torzewski, J., et al., *Processes in atherogenesis: complement activation*. Atherosclerosis, 1997. **132**(2): p. 131-8.
183. Wiedmer, T., C.T. Esmon, and P.J. Sims, *Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase*. Blood, 1986. **68**(4): p. 875-80.
184. Del Conde, I., et al., *Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system*. J Exp Med, 2005. **201**(6): p. 871-9.
185. Sims, P.J. and T. Wiedmer, *The response of human platelets to activated components of the complement system*. Immunol Today, 1991. **12**(9): p. 338-42.
186. Peerschke, E.I., K.B. Reid, and B. Ghebrehiwet, *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, 1993. **178**(2): p. 579-87.
187. Ghebrehiwet, B., et al., *Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1809-21.
188. Sinauridze, E.I., et al., *Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets*. Thromb Haemost, 2007. **97**(3): p. 425-34.
189. Tan, K.T. and G.Y. Lip, *The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2005. **94**(3): p. 488-92.

190. Zeiger, F., et al., *P-Selectin expression, platelet aggregates, and platelet-derived microparticle formation are increased in peripheral arterial disease*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2000. **11**(8): p. 723-8.
191. Morel, O., et al., *Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors*. Curr Opin Hematol, 2004. **11**(3): p. 156-64.
192. Diamant, M., et al., *Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?* Eur J Clin Invest, 2004. **34**(6): p. 392-401.
193. Tans, G., et al., *Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles*. Blood, 1991. **77**(12): p. 2641-8.
194. VanWijk, M.J., et al., *Microparticles in cardiovascular diseases*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 277-87.
195. Yin, W., B. Ghebrehiwet, and E.I. Peerschke, *Expression of complement components and inhibitors on platelet microparticles*. Platelets, 2008. **19**(3): p. 225-33.
196. Ward, J.V. and M.A. Packham, *Characterization of the sulfated glycosaminoglycan on the surface and in the storage granules of rabbit platelets*. Biochim Biophys Acta, 1979. **583**(2): p. 196-207.
197. Hamad, O.A., et al., *Complement activation triggered by chondroitin sulfate released by thrombin receptor-activated platelets*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(8): p. 1413-21.
198. Ghebrehiwet, B., M. Silverberg, and A.P. Kaplan, *Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment*. J Exp Med, 1981. **153**(3): p. 665-76.
199. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. **196**(3): p. 430-43.
200. Guo, W.X., et al., *Up-regulation of endothelial cell binding proteins/receptors for complement component C1q by inflammatory cytokines*. J Lab Clin Med, 1999. **133**(6): p. 541-50.
201. Ghebrehiwet, B., et al., *gC1qR/p33 serves as a molecular bridge between the complement and contact activation systems and is an important catalyst in inflammation*. Adv Exp Med Biol, 2006. **586**: p. 95-105.
202. Botto, M. and M.J. Walport, *C1q, autoimmunity and apoptosis*. Immunobiology, 2002. **205**(4-5): p. 395-406.
203. Harboe, M., et al., *The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(3): p. 439-46.
204. Dodds, A.W., *Which came first, the lectin/classical pathway or the alternative pathway of complement?* Immunobiology, 2002. **205**(4-5): p. 340-54.
205. Fearon, D.T. and K.F. Austen, *Initiation of C3 cleavage in the alternative complement pathway*. J Immunol, 1975. **115**(5): p. 1357-61.
206. Liszewski, M.K., et al., *Control of the complement system*. Adv Immunol, 1996. **61**: p. 201-83.

207. Pangburn, M.K., et al., *Molecular mechanisms of target recognition in an innate immune system: interactions among factor H, C3b, and target in the alternative pathway of human complement*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4742-51.
208. Kazatchkine, M.D. and M.P. Carreno, *Activation of the complement system at the interface between blood and artificial surfaces*. Biomaterials, 1988. **9**(1): p. 30-5.
209. Atkinson, J.P., et al., *Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor*. Clin Exp Immunol, 1991. **86 Suppl 1**: p. 27-30.
210. Nilsson, U.R., et al., *Modification of the complement binding properties of polystyrene: effects of end-point heparin attachment*. Scand J Immunol, 1993. **37**(3): p. 349-54.
211. Asberg, A.E., T.E. Mollnes, and V. Videm, *Complement activation by neutrophil granulocytes*. Scand J Immunol, 2008. **67**(4): p. 354-61.
212. Holers, V.M., *The spectrum of complement alternative pathway-mediated diseases*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 300-16.
213. Mollnes, T.E. and M. Kirschfink, *Strategies of therapeutic complement inhibition*. Mol Immunol, 2006. **43**(1-2): p. 107-21.
214. Tsuji, S., K. Kaji, and S. Nagasawa, *Activation of the alternative pathway of human complement by apoptotic human umbilical vein endothelial cells*. J Biochem, 1994. **116**(4): p. 794-800.
215. Matsui, H., et al., *Activation of the alternative pathway of complement by apoptotic Jurkat cells*. FEBS Lett, 1994. **351**(3): p. 419-22.
216. Schwaeble, W., et al., *Properdin, a positive regulator of complement activation, is expressed in human T cell lines and peripheral blood T cells*. J Immunol, 1993. **151**(5): p. 2521-8.
217. Schwaeble, W., et al., *Expression of properdin in human monocytes*. Eur J Biochem, 1994. **219**(3): p. 759-64.
218. Wirthmueller, U., et al., *Properdin, a positive regulator of complement activation, is released from secondary granules of stimulated peripheral blood neutrophils*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4444-51.
219. Pillemer, L., et al., *The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena*. Science, 1954. **120**(3112): p. 279-85.
220. Kemper, C., et al., *The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 9023-8.
221. Xu, W., et al., *Properdin binds to late apoptotic and necrotic cells independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7613-21.
222. Esko, J.D. and S.B. Selleck, *Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 435-71.
223. Yu, H., et al., *Kinetic studies on the interactions of heparin and complement proteins using surface plasmon resonance*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1726**(2): p. 168-76.

224. Zhang, L., et al., *CHO glycosylation mutants: proteoglycans*. Methods Enzymol, 2006. **416**: p. 205-21.
225. Hiemstra, P.S., et al., *Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA*. Eur J Immunol, 1987. **17**(3): p. 321-6.
226. Bogers, W.M., et al., *Immunoglobulin A: interaction with complement, phagocytic cells and endothelial cells*. Complement Inflamm, 1991. **8**(5-6): p. 347-58.
227. Zhang, W. and P.J. Lachmann, *Glycosylation of IgA is required for optimal activation of the alternative complement pathway by immune complexes*. Immunology, 1994. **81**(1): p. 137-41.
228. Selander, B., et al., *Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1425-34.
229. Mnjoyan, Z., J. Li, and V. Afshar-Kharghan, *Factor H binds to platelet integrin α IIb β 3*. Platelets, 2008. **19**(7): p. 512-9.
230. Lawler, J., *The structural and functional properties of thrombospondin*. Blood, 1986. **67**(5): p. 1197-209.
231. Vaziri-Sani, F., et al., *Factor H binds to washed human platelets*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(1): p. 154-62.
232. Higgins, J.M., et al., *Characterization of mutant forms of recombinant human properdin lacking single thrombospondin type I repeats. Identification of modules important for function*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5777-85.
233. Ikeda, K., et al., *Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway*. J Biol Chem, 1987. **262**(16): p. 7451-4.
234. Drickamer, K., *Recognition of complex carbohydrates by Ca(2+)-dependent animal lectins*. Biochem Soc Trans, 1993. **21**(2): p. 456-9.
235. Gal, P. and G. Ambrus, *Structure and function of complement activating enzyme complexes: C1 and MBL-MASPs*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(1): p. 43-59.
236. Hansen, S. and U. Holmskov, *Structural aspects of collectins and receptors for collectins*. Immunobiology, 1998. **199**(2): p. 165-89.
237. Weis, W.I., K. Drickamer, and W.A. Hendrickson, *Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide*. Nature, 1992. **360**(6400): p. 127-34.
238. Turner, M.W., *Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system*. Immunol Today, 1996. **17**(11): p. 532-40.
239. Holmskov, U., et al., *Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system*. Immunol Today, 1994. **15**(2): p. 67-74.
240. Krarup, A., et al., *L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47513-9.
241. Oroszlan, M., et al., *MBL and C1q compete for interaction with human endothelial cells*. Mol Immunol, 2007. **44**(6): p. 1150-8.
242. Iwaki, D., et al., *Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8626-32.

243. Takahashi, M., et al., *Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-I contributes to activation of the lectin complement pathway*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 6132-8.
244. Arnold, J.N., et al., *Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease*. Immunol Lett, 2006. **106**(2): p. 103-10.
245. Roos, A., et al., *Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2861-8.
246. Terai, I., et al., *Degalactosylated and/or denatured IgA, but not native IgA in any form, bind to mannose-binding lectin*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1737-45.
247. Malhotra, R., et al., *Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein*. Nat Med, 1995. **1**(3): p. 237-43.
248. Bohlsion, S.S., D.A. Fraser, and A.J. Tenner, *Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions*. Mol Immunol, 2007. **44**(1-3): p. 33-43.
249. Ogden, C.A., et al., *C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 781-95.
250. Nauta, A.J., et al., *Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2853-63.
251. Markiewski, M.M., et al., *Complement and coagulation: strangers or partners in crime?* Trends Immunol, 2007. **28**(4): p. 184-92.
252. Vogt, W., et al., *Complement activation in human lymph: modulation by the contact activation system and by leukocytes*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1986. **79**(4): p. 423-33.
253. Schulze-Topphoff, U., et al., *Roles of the kallikrein/kinin system in the adaptive immune system*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(2): p. 155-60.
254. Wiggins, R.C., P.C. Giclas, and P.M. Henson, *Chemotactic activity generated from the fifth component of complement by plasma kallikrein of the rabbit*. J Exp Med, 1981. **153**(6): p. 1391-404.
255. Huber-Lang, M., et al., *Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway*. Nat Med, 2006. **12**(6): p. 682-7.
256. Kovanen, P.T., *Role of mast cells in atherosclerosis*. Chem Immunol, 1995. **62**: p. 132-70.
257. Laine, P., et al., *Evidence for complement activation in ruptured coronary plaques in acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2002. **90**(4): p. 404-8.
258. Oksjoki, R., et al., *Receptors for the anaphylatoxins C3a and C5a are expressed in human atherosclerotic coronary plaques*. Atherosclerosis, 2007. **195**(1): p. 90-9.
259. Fukuoka, Y. and L.B. Schwartz, *Human beta-tryptase: detection and characterization of the active monomer and prevention of tetramer reconstitution by protease inhibitors*. Biochemistry, 2004. **43**(33): p. 10757-64.
260. Janda, J.M., *Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus Aeromonas*. Clin Microbiol Rev, 1991. **4**(4): p. 397-410.

261. Nitta, H., et al., *Activation of prothrombin by ASP, a serine protease released from Aeromonas sobria*. FEBS Lett, 2007. **581**(30): p. 5935-9.
262. Nitta, H., et al., *Production of C5a by ASP, a serine protease released from Aeromonas sobria*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3602-8.
263. Yasojima, K., et al., *Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques*. Am J Pathol, 2001. **158**(3): p. 1039-51.
264. Bhakdi, S., *Complement and atherogenesis: the unknown connection*. Ann Med, 1998. **30**(6): p. 503-7.
265. Kastl, S.P., et al., *In human macrophages the complement component C5a induces the expression of oncostatin M via AP-1 activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 498-503.
266. Kastl, S.P., et al., *The complement component C5a induces the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human macrophages via NF-kappaB activation*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(8): p. 1790-7.
267. Vlaicu, R., et al., *Immunohistochemical localization of the terminal C5b-9 complement complex in human aortic fibrous plaque*. Atherosclerosis, 1985. **57**(2-3): p. 163-77.
268. Torzewski, M., et al., *Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(3): p. 369-78.
269. 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, 2003. **23**(4): p. 630-6.
270. Oksjoki, R., et al., *Complement regulation in human atherosclerotic coronary lesions. Immunohistochemical evidence that C4b-binding protein negatively regulates the classical complement pathway, and that C5b-9 is formed via the alternative complement pathway*. Atherosclerosis, 2007. **192**(1): p. 40-8.
271. Niculescu, F., H.G. Rus, and R. Vlaicu, *Immunohistochemical localization of C5b-9, S-protein, C3d and apolipoprotein B in human arterial tissues with atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1987. **65**(1-2): p. 1-11.
272. Ishikawa, Y., et al., *Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(4): p. 665-72.
273. Davitz, M.A., M.G. Low, and V. Nussenzweig, *Release of decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC). Selective modification of a complement regulatory protein*. J Exp Med, 1986. **163**(5): p. 1150-61.
274. Meri, S., et al., *Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers*. Immunology, 1990. **71**(1): p. 1-9.
275. Seifert, P.S. and G.K. Hansson, *Decay-accelerating factor is expressed on vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 1989. **84**(2): p. 597-604.

276. Meri, S., H. Waldmann, and P.J. Lachmann, *Distribution of protectin (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues*. Lab Invest, 1991. **65**(5): p. 532-7.
277. Torzewski, M., et al., *Immunohistochemical colocalization of the terminal complex of human complement and smooth muscle cell alpha-actin in early atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(11): p. 2448-52.
278. Torzewski, J., et al., *Complement-induced release of monocyte chemotactic protein-1 from human smooth muscle cells. A possible initiating event in atherosclerotic lesion formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(5): p. 673-7.
279. Viedt, C., et al., *The terminal complement complex C5b-9 stimulates interleukin-6 production in human smooth muscle cells through activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2370-2.
280. Rus, H.G., F. Niculescu, and R. Vlaicu, *Co-localization of terminal C5b-9 complement complexes and macrophages in human atherosclerotic arterial walls*. Immunol Lett, 1988. **19**(1): p. 27-32.
281. Hart, M.L., M.C. Walsh, and G.L. Stahl, *Initiation of complement activation following oxidative stress. In vitro and in vivo observations*. Mol Immunol, 2004. **41**(2-3): p. 165-71.
282. Yasuda, M., et al., *The complement system in ischemic heart disease*. Circulation, 1990. **81**(1): p. 156-63.
283. 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, 2002. **89**(8): p. 909-12.
284. Mathey, D., et al., *Early accumulation of the terminal complement-complex in the ischaemic myocardium after reperfusion*. Eur Heart J, 1994. **15**(3): p. 418-23.
285. Nauta, A.J., et al., *The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 783-92.
286. Albrecht, E.A., et al., *C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 849-59.
287. Foreman, K.E., et al., *C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1147-55.
288. Guo, R.F. and P.A. Ward, *Role of C5a in inflammatory responses*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 821-52.
289. 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, 2000. **84**(2): p. 237-43.
290. Kew, R.R., B. Ghebrehiwet, and A. Janoff, *Cigarette smoke can activate the alternative pathway of complement in vitro by modifying the third component of complement*. J Clin Invest, 1985. **75**(3): p. 1000-7.
291. Perricone, R., et al., *Complement activation by cigarette smoke condensate and tobacco infusion*. Arch Environ Health, 1983. **38**(3): p. 176-9.
292. Nordskog, B.K., W.R. Fields, and G.M. Hellmann, *Kinetic analysis of cytokine response to cigarette smoke condensate by human endothelial and monocytic cells*. Toxicology, 2005. **212**(2-3): p. 87-97.

293. Vayssier-Taussat, M., et al., *Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(3): p. H1293-300.
294. Witkowska, A.M., *Soluble ICAM-1: a marker of vascular inflammation and lifestyle*. Cytokine, 2005. **31**(2): p. 127-34.
295. Yin, W., et al., *Classical pathway complement activation on human endothelial cells*. Mol Immunol, 2007. **44**(9): p. 2228-34.
296. Yin, W., et al., *Regulated complement deposition on the surface of human endothelial cells: effect of tobacco smoke and shear stress*. Thromb Res, 2008. **122**(2): p. 221-8.
297. Pasqui, A.L., et al., *Relationship between serum complement and different lipid disorders*. Clin Exp Med, 2002. **2**(1): p. 33-8.
298. Engstrom, G., et al., *Complement C3 is a risk factor for the development of diabetes: a population-based cohort study*. Diabetes, 2005. **54**(2): p. 570-5.
299. Grundy, S.M., et al., *Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. e13-8.
300. van Oostrom, A.J., et al., *The metabolic syndrome in relation to complement component 3 and postprandial lipemia in patients from an outpatient lipid clinic and healthy volunteers*. Atherosclerosis, 2007. **190**(1): p. 167-73.
301. Muscari, A., et al., *Relationship of serum C3 to fasting insulin, risk factors and previous ischaemic events in middle-aged men*. Eur Heart J, 2000. **21**(13): p. 1081-90.
302. Verdeguer, F., et al., *Complement regulation in murine and human hypercholesterolemia and role in the control of macrophage and smooth muscle cell proliferation*. Cardiovasc Res, 2007. **76**(2): p. 340-50.
303. Reilly, M.P. and A.R. Tall, *HDL proteomics: pot of gold or Pandora's box?* J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 595-8.
304. Hamilton, K.K., J. Zhao, and P.J. Sims, *Interaction between apolipoproteins A-I and A-II and the membrane attack complex of complement. Affinity of the apoproteins for polymeric C9*. J Biol Chem, 1993. **268**(5): p. 3632-8.
305. Rezaee, F., et al., *Proteomic analysis of high-density lipoprotein*. Proteomics, 2006. **6**(2): p. 721-30.
306. Vaisar, T., et al., *Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 746-56.
307. Wiedmer, T., C.T. Esmon, and P.J. Sims, *On the mechanism by which complement proteins C5b-9 increase platelet prothrombinase activity*. J Biol Chem, 1986. **261**(31): p. 14587-92.
308. Bongrazio, M., A.R. Pries, and A. Zakrzewicz, *The endothelium as physiological source of properdin: role of wall shear stress*. Mol Immunol, 2003. **39**(11): p. 669-75.

309. Entman, M.L. and C.M. Ballantyne, *Association of neutrophils with platelet aggregates in unstable angina. Should we alter therapy?* Circulation, 1996. **94**(6): p. 1206-8.
310. Konstantopoulos, K., et al., *Shear-induced platelet aggregation in normal subjects and stroke patients.* Thromb Haemost, 1995. **74**(5): p. 1329-34.
311. Mickelson, J.K., et al., *Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease?* J Am Coll Cardiol, 1996. **28**(2): p. 345-53.
312. Xiao, Z. and P. Theroux, *Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor.* Circulation, 1998. **97**(3): p. 251-6.
313. Diacovo, T.G., et al., *Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18.* Blood, 1996. **88**(1): p. 146-57.
314. Konstantopoulos, K., et al., *Venous levels of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and beta2-integrin.* Circulation, 1998. **98**(9): p. 873-82.
315. Ruef, J., et al., *The complement factor properdin induces formation of platelet-leukocyte aggregates via leukocyte activation.* Platelets, 2008. **19**(5): p. 359-64.
316. Wiedmer, T. and P.J. Sims, *Effect of complement proteins C5b-9 on blood platelets. Evidence for reversible depolarization of membrane potential.* J Biol Chem, 1985. **260**(13): p. 8014-9.
317. Sims, P.J., et al., *Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity.* J Biol Chem, 1988. **263**(34): p. 18205-12.
318. Hamilton, K.K., et al., *Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex.* J Biol Chem, 1990. **265**(7): p. 3809-14.
319. Speidl, W.S., et al., *Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis.* Eur Heart J, 2005. **26**(21): p. 2294-9.
320. Cragg, M.S., et al., *Complement mediated cell death is associated with DNA fragmentation.* Cell Death Differ, 2000. **7**(1): p. 48-58.
321. Koski, C.L., et al., *Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3816-20.
322. Tedesco, F., et al., *The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity.* J Exp Med, 1997. **185**(9): p. 1619-27.
323. Morgan, B.P., *Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects.* Biochem J, 1989. **264**(1): p. 1-14.
324. Kilgore, K.S., et al., *Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant*

- protein-1 through nuclear factor-kappa B activation. Am J Pathol, 1997. 150(6): p. 2019-31.*
325. Rus, H.G., F. Niculescu, and M.L. Shin, *Sublytic complement attack induces cell cycle in oligodendrocytes. J Immunol, 1996. 156(12): p. 4892-900.*
 326. Fosbrink, M., et al., *C5b-9-induced endothelial cell proliferation and migration are dependent on Akt inactivation of forkhead transcription factor FOXO1. J Biol Chem, 2006. 281(28): p. 19009-18.*
 327. Nijmeijer, R., et al., *C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. Am J Pathol, 2003. 163(1): p. 269-75.*
 328. Schafer, H., et al., *Deposition of the terminal C5b-9 complement complex in infarcted areas of human myocardium. J Immunol, 1986. 137(6): p. 1945-9.*
 329. Niculescu, F., T. Niculescu, and H. Rus, *C5b-9 terminal complement complex assembly on apoptotic cells in human arterial wall with atherosclerosis. Exp Mol Pathol, 2004. 76(1): p. 17-23.*
 330. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. Nature, 1999. 398(6729): p. 718-23.*
 331. Seifert, P.S., et al., *Prelesional complement activation in experimental atherosclerosis. Terminal C5b-9 complement deposition coincides with cholesterol accumulation in the aortic intima of hypercholesterolemic rabbits. Lab Invest, 1989. 60(6): p. 747-54.*
 332. Carter, A.M., U.K. Prasad, and P.J. Grant, *Complement C3 and C-reactive protein in male survivors of myocardial infarction. Atherosclerosis, 2008.*
 333. Gulati, P., et al., *Regulation of the synthesis of C1 subcomponents and C1-inhibitor. Behring Inst Mitt, 1993(93): p. 196-203.*
 334. Sheerin, N.S., et al., *TNF-alpha regulation of C3 gene expression and protein biosynthesis in rat glomerular endothelial cells. Kidney Int, 1997. 51(3): p. 703-10.*
 335. Warren, H.B., P. Pantazis, and P.F. Davies, *The third component of complement is transcribed and secreted by cultured human endothelial cells. Am J Pathol, 1987. 129(1): p. 9-13.*
 336. Johnson, E. and G. Hetland, *Human umbilical vein endothelial cells synthesize functional C3, C5, C6, C8 and C9 in vitro. Scand J Immunol, 1991. 33(6): p. 667-71.*
 337. Langeeggen, H., et al., *Detection of mRNA for the terminal complement components C5, C6, C8 and C9 in human umbilical vein endothelial cells in vitro. APMIS, 2001. 109(1): p. 73-8.*
 338. Langeeggen, H., et al., *The endothelium is an extrahepatic site of synthesis of the seventh component of the complement system. Clin Exp Immunol, 2000. 121(1): p. 69-76.*
 339. Dauchel, H., et al., *Expression of complement alternative pathway proteins by endothelial cells. Differential regulation by interleukin 1 and glucocorticoids. Eur J Immunol, 1990. 20(8): p. 1669-75.*
 340. Vastag, M., et al., *Endothelial cells cultured from human brain microvessels produce complement proteins factor H, factor B, C1 inhibitor, and C4. Immunobiology, 1998. 199(1): p. 5-13.*

341. Couplier, M., et al., *Activation of the endothelium by IL-1 alpha and glucocorticoids results in major increase of complement C3 and factor B production and generation of C3a*. Clin Exp Immunol, 1995. **101**(1): p. 142-9.
342. Berge, V., E. Johnson, and K.E. Berge, *Interleukin-1 alpha, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha increase the synthesis and expression of the functional alternative and terminal complement pathways by human umbilical vein endothelial cells in vitro*. APMIS, 1996. **104**(3): p. 213-9.
343. Vakeva, A. and S. Meri, *Complement activation and regulator expression after anoxic injury of human endothelial cells*. APMIS, 1998. **106**(12): p. 1149-56.
344. Collard, C.D., A. Agah, and G.L. Stahl, *Complement activation following reoxygenation of hypoxic human endothelial cells: role of intracellular reactive oxygen species, NF-kappaB and new protein synthesis*. Immunopharmacology, 1998. **39**(1): p. 39-50.
345. Collard, C.D., et al., *Complement activation after oxidative stress: role of the lectin complement pathway*. Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1549-56.
346. Brooimans, R.A., et al., *Differential regulation of complement factor H and C3 production in human umbilical vein endothelial cells by IFN-gamma and IL-1*. J Immunol, 1990. **144**(10): p. 3835-40.
347. Hamilton, K.K., et al., *Regulatory control of the terminal complement proteins at the surface of human endothelial cells: neutralization of a C5b-9 inhibitor by antibody to CD59*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2572-7.
348. Julen, N., et al., *In vitro biosynthesis of complement factor I by human endothelial cells*. Eur J Immunol, 1992. **22**(1): p. 213-7.
349. Berge, V., E. Johnson, and K. Hogasen, *Clusterin and the terminal complement pathway synthesized by human umbilical vein endothelial cells are closely linked when detected on co-cultured agarose beads*. APMIS, 1997. **105**(1): p. 17-24.
350. Berge, V., et al., *Human umbilical vein endothelial cells synthesize S-protein (vitronectin) in vitro*. Scand J Immunol, 1992. **36**(1): p. 119-23.
351. Langegegen, H., et al., *Human umbilical vein endothelial cells express complement receptor 1 (CD35) and complement receptor 4 (CD11c/CD18) in vitro*. Inflammation, 2002. **26**(3): p. 103-10.
352. Mason, J.C., et al., *Induction of decay-accelerating factor by cytokines or the membrane-attack complex protects vascular endothelial cells against complement deposition*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1673-82.
353. Mason, J.C., et al., *Induction of endothelial cell decay-accelerating factor by vascular endothelial growth factor: a mechanism for cytoprotection against complement-mediated injury during inflammatory angiogenesis*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(1): p. 138-50.
354. Tsuji, S., K. Kaji, and S. Nagasawa, *Decay-accelerating factor on human umbilical vein endothelial cells. Its histamine-induced expression and spontaneous rapid shedding from the cell surface*. J Immunol, 1994. **152**(3): p. 1404-10.
355. van den Berg, C.W. and K.E. Taylor, *Letter regarding article by Li et al, "C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells."*. Circulation, 2004. **110**(25): p. e542.

356. Joseph, K., et al., *Interaction of high molecular weight kininogen binding proteins on endothelial cells*. Thromb Haemost, 2004. **91**(1): p. 61-70.
357. Peerschke, E.I., et al., *Human umbilical vein endothelial cells possess binding sites for the globular domain of C1q*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 4154-8.
358. Lozada, C., et al., *Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8378-82.
359. Kilgore, K.S., et al., *Enhancement by the complement membrane attack complex of tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell expression of E-selectin and ICAM-1*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1434-41.
360. Hattori, R., et al., *Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface*. J Biol Chem, 1989. **264**(15): p. 9053-60.
361. Dobrina, A., et al., *Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo*. Blood, 2002. **99**(1): p. 185-92.
362. Casarsa, C., et al., *Intracerebroventricular injection of the terminal complement complex causes inflammatory reaction in the rat brain*. Eur J Immunol, 2003. **33**(5): p. 1260-70.
363. van den Berg, R.H., et al., *The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6924-30.
364. Czermak, B.J., et al., *In vitro and in vivo dependency of chemokine generation on C5a and TNF-alpha*. J Immunol, 1999. **162**(4): p. 2321-5.
365. Kilgore, K.S., et al., *The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells*. Am J Pathol, 1996. **149**(3): p. 953-61.
366. Benzaquen, L.R., A. Nicholson-Weller, and J.A. Halperin, *Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 985-92.
367. Halperin, J.A., A. Taratuska, and A. Nicholson-Weller, *Terminal complement complex C5b-9 stimulates mitogenesis in 3T3 cells*. J Clin Invest, 1993. **91**(5): p. 1974-8.
368. Selvan, R.S., H.B. Kapadia, and J.L. Platt, *Complement-induced expression of chemokine genes in endothelium: regulation by IL-1-dependent and -independent mechanisms*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 4388-95.
369. Platt, J.L., et al., *The role of C5a and antibody in the release of heparan sulfate from endothelial cells*. Eur J Immunol, 1991. **21**(11): p. 2887-90.
370. Ikeda, K., et al., *C5a induces tissue factor activity on endothelial cells*. Thromb Haemost, 1997. **77**(2): p. 394-8.

371. Christiansen, V.J., P.J. Sims, and K.K. Hamilton, *Complement C5b-9 increases plasminogen binding and activation on human endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(1): p. 164-71.
372. Lupia, E., et al., *The membrane attack complex of complement contributes to plasmin-induced synthesis of platelet-activating factor by endothelial cells and neutrophils*. *Immunology*, 2003. **109**(4): p. 557-63.
373. Yusuf, S., et al., *Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization*. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2746-53.
374. Tarantini, G., et al., *Duration of ischemia is a major determinant of transmural and severe microvascular obstruction after primary angioplasty: a study performed with contrast-enhanced magnetic resonance*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(7): p. 1229-35.
375. Vakeva, A., et al., *Time course of complement activation and inhibitor expression after ischemic injury of rat myocardium*. *Am J Pathol*, 1994. **144**(6): p. 1357-68.
376. van 't Hof, A.W., et al., *Clinical value of 12-lead electrocardiogram after successful reperfusion therapy for acute myocardial infarction*. *Zwolle Myocardial infarction Study Group*. *Lancet*, 1997. **350**(9078): p. 615-9.
377. Armstrong, P.W., et al., *Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2007. **297**(1): p. 43-51.
378. Franchini, M., D. Veneri, and G. Lippi, *Inflammation and hemostasis: a bidirectional interaction*. *Clin Lab*, 2007. **53**(1-2): p. 63-7.
379. Esmon, C.T., *Inflammation and thrombosis*. *J Thromb Haemost*, 2003. **1**(7): p. 1343-8.
380. Peerschke, E.I., et al., *Blood platelets activate the classical pathway of human complement*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(9): p. 2035-42.
381. Libby, P. and P.M. Ridker, *Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment*. *Am J Med*, 2004. **116 Suppl 6A**: p. 9S-16S.
382. Munro, J.M. and R.S. Cotran, *The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation*. *Lab Invest*, 1988. **58**(3): p. 249-61.
383. Buja, L.M. and J.T. Willerson, *Role of inflammation in coronary plaque disruption*. *Circulation*, 1994. **89**(1): p. 503-5.
384. 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*, 1998. **97**(22): p. 2259-67.
385. Ghebrehiwet, B. and E.I. Peerschke, *cC1q-R (calreticulin) and gC1q-R/p33: ubiquitously expressed multi-ligand binding cellular proteins involved in inflammation and infection*. *Mol Immunol*, 2004. **41**(2-3): p. 173-83.
386. Kostner, K.M., et al., *Inflammation, complement activation and endothelial function in stable and unstable coronary artery disease*. *Clin Chim Acta*, 2006. **365**(1-2): p. 129-34.
387. Thomas, T.C., et al., *Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv*. *Mol Immunol*, 1996. **33**(17-18): p. 1389-401.

388. Sherman, S.K., et al., *Impact of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, on total mortality and adverse cardiovascular outcomes in cardiac surgical patients undergoing cardiopulmonary bypass*. *Ann Thorac Surg*, 2004. **77**(3): p. 942-9; discussion 949-50.
389. 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*, 2003. **108**(10): p. 1176-83.
390. Mahaffey, K.W., et al., *Effect of pexelizumab on mortality in patients with acute myocardial infarction or undergoing coronary artery bypass surgery: a systematic overview*. *Am Heart J*, 2006. **152**(2): p. 291-6.
391. Verrier, E.D., et al., *Terminal complement blockade with pexelizumab during coronary artery bypass graft surgery requiring cardiopulmonary bypass: a randomized trial*. *JAMA*, 2004. **291**(19): p. 2319-27.
392. Guazzi, M.D., et al., *Evidence of multifocal activity of coronary disease in patients with acute myocardial infarction*. *Circulation*, 1997. **96**(4): p. 1145-51.
393. Gilpin, E.A., et al., *Periods of differing mortality distribution during the first year after acute myocardial infarction*. *Am J Cardiol*, 1983. **52**(3): p. 240-4.
394. Conde, I.D. and N.S. Kleiman, *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(25): p. 2575-7; author reply 2575-7.
395. Yan, J.C., et al., *The effect of elevated serum soluble CD40 ligand on the prognostic value in patients with acute coronary syndromes*. *Clin Chim Acta*, 2004. **343**(1-2): p. 155-9.
396. Blankenberg, S., et al., *Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina*. *Circulation*, 2002. **106**(1): p. 24-30.
397. Baldus, S., et al., *Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2003. **108**(12): p. 1440-5.
398. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(12): p. 836-43.
399. Song, C., et al., *Serum amyloid A may potentiate prothrombotic and proinflammatory events in acute coronary syndromes*. *Atherosclerosis*, 2008.
400. Boesten, L.S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha promotes atherosclerotic lesion progression in APOE*3-Leiden transgenic mice*. *Cardiovasc Res*, 2005. **66**(1): p. 179-85.
401. Rizzello, V., et al., *Modulation of CD4(+)CD28null T lymphocytes by tumor necrosis factor-alpha blockade in patients with unstable angina*. *Circulation*, 2006. **113**(19): p. 2272-7.
402. Engstrom, G., et al., *Complement C3 and C4 in plasma and incidence of myocardial infarction and stroke: a population-based cohort study*. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2007. **14**(3): p. 392-7.
403. Bhatia, V.K., et al., *Complement C1q reduces early atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. *Am J Pathol*, 2007. **170**(1): p. 416-26.

404. Haahr-Pedersen, S., et al., *Level of complement activity predicts cardiac dysfunction after acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention*. J Invasive Cardiol, 2009. **21**(1): p. 13-9.
405. Palikhe, A., et al., *Serum complement C3/C4 ratio, a novel marker for recurrent cardiovascular events*. Am J Cardiol, 2007. **99**(7): p. 890-5.
406. Thielmann, M., et al., *Administration of C1-esterase inhibitor during emergency coronary artery bypass surgery in acute ST-elevation myocardial infarction*. Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **30**(2): p. 285-93.
407. Peerschke, E.I., et al., *Expression of gC1q-R/p33 and its major ligands in human atherosclerotic lesions*. Mol Immunol, 2004. **41**(8): p. 759-66.
408. Ricklin, D. and J.D. Lambris, *Complement-targeted therapeutics*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(11): p. 1265-75.
409. Gori, A.M., et al., *The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with platelet aggregability in acute coronary syndrome patients*. Atherosclerosis, 2009. **202**(1): p. 255-62.
410. Isner, J.M., et al., *Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis*. Circulation, 1995. **91**(11): p. 2703-11.
411. Kockx, M. and G. De Meyer, *Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis*. Circulation, 1996. **93**(2): p. 394-5.
412. Bombeli, T., et al., *Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant*. Blood, 1997. **89**(7): p. 2429-42.
413. Valgimigli, M., et al., *Serum from patients with acute coronary syndromes displays a proapoptotic effect on human endothelial cells: a possible link to pan-coronary syndromes*. Circulation, 2003. **107**(2): p. 264-70.
414. Niculescu, F. and H. Rus, *Complement activation and atherosclerosis*. Mol Immunol, 1999. **36**(13-14): p. 949-55.
415. Oksjoki, R., P.T. Kovanen, and M.O. Pentikainen, *Role of complement activation in atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(5): p. 477-82.
416. Iltumur, K., et al., *Complement activation in acute coronary syndromes*. APMIS, 2005. **113**(3): p. 167-74.
417. Schwartz, R.S., et al., *Detecting vulnerable plaque using peripheral blood: inflammatory and cellular markers*. J Interv Cardiol, 2003. **16**(3): p. 231-42.
418. Bossi, F., et al., *Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6921-7.
419. Hong, Y.J., et al., *Impact of plaque rupture and elevated C-reactive protein on clinical outcome in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study*. J Invasive Cardiol, 2008. **20**(9): p. 428-35.
420. Burke, A.P., et al., *Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies*. Circulation, 2002. **105**(17): p. 2019-23.
421. Lagrand, W.K., et al., *C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon?* Circulation, 1999. **100**(1): p. 96-102.

422. Dimitrijevic, O., et al., *Serial measurements of C-reactive protein after acute myocardial infarction in predicting one-year outcome*. Int Heart J, 2006. **47**(6): p. 833-42.
423. de Winter, R.J., et al., *C-Reactive protein and cardiac troponin T in risk stratification: differences in optimal timing of tests early after the onset of chest pain*. Clin Chem, 2000. **46**(10): p. 1597-603.
424. Kockx, M.M., *Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(10): p. 1519-22.
425. Harada, K., et al., *Apoptotic cell death in atherosclerotic plaques of hyperlipidemic knockout mice*. Atherosclerosis, 1997. **135**(2): p. 235-9.
426. Ytting, H., et al., *Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise*. Scand J Immunol, 2007. **66**(4): p. 458-64.
427. Madsen, H.O., et al., *Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis*. Lancet, 1998. **352**(9132): p. 959-60.
428. Hegele, R.A., et al., *Mannose-binding lectin gene variation and cardiovascular disease in Canadian Inuit*. Clin Chem, 1999. **45**(8 Pt 1): p. 1283-5.
429. Eisen, D.P., et al., *Low mannose-binding lectin function is associated with sepsis in adult patients*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **48**(2): p. 274-82.
430. Steffensen, R., et al., *Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers*. J Immunol Methods, 2000. **241**(1-2): p. 33-42.
431. Petersen, S.V., et al., *An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation*. J Immunol Methods, 2001. **257**(1-2): p. 107-16.
432. Jordan, J.E., M.C. Montalto, and G.L. Stahl, *Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury*. Circulation, 2001. **104**(12): p. 1413-8.
433. Walsh, M.C., et al., *Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 541-6.
434. Brener, S.J., et al., *Reperfusion after primary angioplasty for ST-elevation myocardial infarction: predictors of success and relationship to clinical outcomes in the APEX-AMI angiographic study*. Eur Heart J, 2008. **29**(9): p. 1127-35.
435. Armstrong, P.W. and C.B. Granger, *Pexelizumab and the APEX AMI trial*. JAMA, 2007. **297**(17): p. 1881; author reply 1881-2.
436. Buller, C.E., et al., *ST-segment recovery and outcome after primary percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction: insights from the Assessment of Pexelizumab in Acute Myocardial Infarction (APEX-AMI) trial*. Circulation, 2008. **118**(13): p. 1335-46.
437. Trendelenburg, M., *Complement inhibition by anti-C5 antibodies--from bench to bedside and back again*. Swiss Med Wkly, 2007. **137**(29-30): p. 413-7.

438. Tjandrawidjaja, M.C., et al., *Failure of investigator adherence to electrocardiographic entry criteria is frequent and influences clinical outcomes: lessons from APEX-AMI*. Eur Heart J, 2007. **28**(23): p. 2850-7.
439. Bates, E.R., *Revisiting reperfusion therapy in inferior myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(2): p. 334-42.
440. *Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2000. **21**(18): p. 1502-13.
441. Ying, S.C., et al., *Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies*. J Immunol, 1989. **143**(1): p. 221-8.
442. Hakobyan, S., et al., *Complement factor H binds to denatured rather than to native pentameric C-reactive protein*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 30451-60.
443. Blockmans, D., H. Deckmyn, and J. Vermynen, *Platelet activation*. Blood Rev, 1995. **9**(3): p. 143-56.
444. Sims, P.J., S.A. Rollins, and T. Wiedmer, *Regulatory control of complement on blood platelets. Modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b-9 complex*. J Biol Chem, 1989. **264**(32): p. 19228-35.
445. Schmaier, A.H., P.M. Smith, and R.W. Colman, *Platelet C1- inhibitor. A secreted alpha-granule protein*. J Clin Invest, 1985. **75**(1): p. 242-50.
446. Schmaier, A.H., et al., *Expression of platelet C1 inhibitor*. Blood, 1993. **82**(2): p. 465-74.
447. Ylitalo, K., et al., *Serum complement and familial combined hyperlipidemia*. Atherosclerosis, 1997. **129**(2): p. 271-7.
448. Sampietro, T., et al., *Upregulation of the immune system in primary hypercholesterolaemia: effect of atorvastatin therapy*. J Intern Med, 2005. **257**(6): p. 523-30.
449. Mason, J.C., et al., *Statin-induced expression of decay-accelerating factor protects vascular endothelium against complement-mediated injury*. Circ Res, 2002. **91**(8): p. 696-703.
450. Viedt, C., et al., *HMG-CoA reductase inhibition reduces the proinflammatory activation of human vascular smooth muscle cells by the terminal complement factor C5b-9*. Basic Res Cardiol, 2003. **98**(6): p. 353-61.
451. Muscari, A., et al., *Short term effect of atorvastatin and vitamin E on serum levels of C3, a sensitive marker of the risk of myocardial infarction in men*. Cardiovasc Drugs Ther, 2001. **15**(5): p. 453-8.
452. Bonnefoy, A., R. Moura, and M.F. Hoylaerts, *The evolving role of thrombospondin-1 in hemostasis and vascular biology*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(5): p. 713-27.
453. Simantov, R., et al., *Histidine-rich glycoprotein inhibits the antiangiogenic effect of thrombospondin-1*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 45-52.
454. Gao, L., et al., *Sublytic complement C5b-9 complexes induce thrombospondin-1 production in rat glomerular mesangial cells via PI3-k/Akt: association with activation of latent transforming growth factor-beta1*. Clin Exp Immunol, 2006. **144**(2): p. 326-34.

455. Stahl, A.L., et al., *Factor H dysfunction in patients with atypical hemolytic uremic syndrome contributes to complement deposition on platelets and their activation*. *Blood*, 2008. **111**(11): p. 5307-15.

8 ANNEXE
