



**HAL**  
open science

# Phénotypage du composant C3 du complément : relations entre le polymorphisme et certaines activités biologiques

Véronique Lasjaunias Grobon

► **To cite this version:**

Véronique Lasjaunias Grobon. Phénotypage du composant C3 du complément : relations entre le polymorphisme et certaines activités biologiques. Médecine humaine et pathologie. 1991. dumas-03664567

**HAL Id: dumas-03664567**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03664567>**

Submitted on 11 May 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

2<sup>e</sup> exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I  
SCIENCES, TECHNOLOGIE, MEDECINE

U.F.R. de PHARMACIE

-----

Domaine de la Merci - LA TRONCHE

ANNEE : 1991

N° D'ORDRE

7014

**MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional  
le : 27 mars 1991 à 17 heures  
Par : Mme Véronique LASJAUNIAS née GROBON

[Données à caractère personnel]

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988  
tient lieu de:

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

-----

Titre



**PHENOTYPAGE DU COMPOSANT C3  
DU COMPLEMENT :  
RELATIONS ENTRE LE POLYMORPHISME ET  
CERTAINES ACTIVITES BIOLOGIQUES**

-----

JURY

- PRESIDENT : - Monsieur le Professeur A. FAVIER  
MEMBRES : - Monsieur le Professeur M.G. COLOMB  
- Monsieur le Professeur D. CORDONNIER  
- Monsieur le Docteur C. DROUET

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I  
SCIENCES, TECHNOLOGIE, MEDECINE

U.F.R. de PHARMACIE

-----

Domaine de la Merci - LA TRONCHE

ANNEE : 1991

N° D'ORDRE :

**MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional  
le : 27 mars 1991 à 17 heures  
Par : Mme Véronique LASJAUNIAS née GROBON

*[Données à caractère personnel]*

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988  
tient lieu de:

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

-----

Titre



**PHENOTYPAGE DU COMPOSANT C3  
DU COMPLEMENT :  
RELATIONS ENTRE LE POLYMORPHISME ET  
CERTAINES ACTIVITES BIOLOGIQUES**

-----

JURY

PRESIDENT : - Monsieur le Professeur A. FAVIER  
MEMBRES : - Monsieur le Professeur M.G. COLOMB  
- Monsieur le Professeur D. CORDONNIER  
- Monsieur le Docteur C. DROUET

**A Thierry et Benoît,**

**A mes Parents,**

**A ma Famille,**

**A mes Amis,**

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire d'Immunologie de l'Hôpital Sud, à l'initiative de Monsieur le Professeur COLOMB. Je tiens à lui exprimer ici mon profond respect et toute ma gratitude et à le remercier vivement pour l'attention qu'il a manifestée tout au long de ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur FAVIER de me faire l'honneur de présider ce jury, ainsi que Monsieur le Professeur CORDONNIER qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Christian DROUET qui m'a prodigué des conseils précieux pour la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à remercier Denise PONARD qui m'a soutenue tout au long de cette thèse par ses conseils judicieux, son enthousiasme et sa disponibilité constante.

J'adresse tous mes remerciements à Catherine ALIBEU et Evelyne AGERON qui m'ont apporté leur aide dans la réalisation des illustrations, ainsi qu'à Françoise CSOPAKI, à l'ensemble du personnel du Laboratoire d'Immunologie de l'Hôpital Sud et du Laboratoire d'Immunochimie du CENG.

Je soulignerai la participation active et la gentillesse de Gwenaëlle BAGUET qui a dirigé Babar du bout de ses doigts pour réaliser la frappe de ce travail.

Enfin, je n'oublierai pas Véro HARDELIN qui a pris une part active dans la manipulation de la trypsine et de la C3 convertase. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon amitié.

# SOMMAIRE

<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>1</b>
<b>I - ACTIVATION DU COMPLEMENT</b>	<b>2</b>
A - Activation de la voie classique	2
B - Activation de la voie alterne	4
C - La voie finale du système	5
<b>II - SYSTEMES DE REGULATION DU COMPLEMENT</b>	<b>6</b>
A - Régulation de la voie classique	6
B - Régulation de la voie alterne	8
C - Régulation de la formation du complexe d'attaque membranaire	9
<b>III - LES RECEPTEURS DU COMPLEMENT</b>	<b>10</b>
A - Le récepteur CR1	10
B - Le récepteur CR2	12
C - Le récepteur CR3	12
D - Le récepteur CR4	12
<b>IV - ROLES BIOLOGIQUES DU COMPLEMENT</b>	<b>13</b>
A - Activités médiées par les ligands diffusibles	13
B - Activités médiées par les ligands bifonctionnels	14
<b>V - LE COMPOSANT C3</b>	<b>14</b>
A - Structure de la molécule de C3	15
B - Biosynthèse et génétique de C3	16
C - Bases moléculaires du polymorphisme	17
D - Rôle de la liaison thioester dans la molécule de C3	19
E - Fragmentation de la molécule de C3	20
1 - Fragmentation de C3 par une C3 convertase	21
2 - Fragmentation par le facteur I	22
3 - Fragmentation par la trypsine	22
F - Interactions des fragments de C3 avec différents récepteurs et ligands	23
1 - Les ligands de C3b solubles	25
2 - Les récepteurs membranaires	27
G - Déficits en C3	29
<b>VI - OBJET DU TRAVAIL PRESENTE</b>	<b>30</b>

<b><u>LE TYPAGE DE C3</u></b>	<b>32</b>
<b>I - MATERIEL ET METHODES</b>	<b>33</b>
<b>A - Réactifs</b>	<b>33</b>
<b>B - Méthodes</b>	<b>34</b>
<b>II - RESULTATS</b>	<b>36</b>
<b>III - DISCUSSION</b>	<b>40</b>
<b><u>FRACTIONNEMENT DE LA MOLECULE DE C3</u></b>	<b>44</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>45</b>
<b>I - MATERIEL ET METHODES</b>	<b>46</b>
<b>A - Purification de C3</b>	<b>46</b>
<b>B - Traitement de C3 purifié par la trypsine</b>	<b>49</b>
<b>C - Traitement du plasma par la trypsine</b>	<b>50</b>
<b>D - Electrophorèse en gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation</b>	<b>50</b>
<b>E - Préparation d'une C3 convertase</b>	<b>52</b>
<b>F - Fractionnement de C3</b>	<b>55</b>
<b>G - Immunoélectrophorèse bidimensionnelle de C3</b>	<b>56</b>
<b>II - RESULTATS</b>	<b>58</b>
<b>A - Action de la trypsine</b>	<b>58</b>
1 - <i>Traitement de C3 purifié par la trypsine</i>	<b>58</b>
2 - <i>Traitement de plasmas par la trypsine</i>	<b>59</b>
3 - <i>Traitement du plasma par le zinc et la trypsine</i>	<b>61</b>
<b>B - Action d'une C3 convertase sur du plasma</b>	<b>62</b>
1 - <i>Vérification de l'efficacité de la C3 convertase</i>	<b>62</b>
2 - <i>Incubation du plasma C3S et C3F avec une C3 convertase</i>	<b>64</b>
3 - <i>Incubation de plasma C3S en l'absence de C3 convertase</i>	<b>67</b>

<b>III - DISCUSSION</b>	<b>68</b>
<b>A - Traitement de C3 par la trypsine et le zinc</b>	<b>68</b>
<b>B - Traitement de C3F et C3S par une C3         convertase</b>	<b>69</b>

<b><u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u></b>	<b>73</b>
--	-----------

<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>76</b>
-----------------------------	-----------

## PRINCIPALES ABREVIATIONS

Ac	anticorps
ADNc	ADN complémentaire
C/ml	cellule par millilitre
CCPRs	complement control protein repeats
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
DAF	decay accelerating factor
DAP	diaminopropane
DFP	diisopropylfluorophosphate
DTT	dithiothréitol
DGVB	dextrose gelatine veronal buffer
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EBV	virus d'Epstein-Barr
HRF	homologous restriction factor
Ig	immunoglobuline
kb	kilobase
kDa	kilodalton
mA	milliampère
MAC	complexe d'attaque membranaire
MCP	membrane cofactor protein
ml	millilitre
nm	nanomètre
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PEG	polyéthylène glycol
pI	point isoélectrique
P/P	poids/poids
P/V	poids/volume
PM	poids moléculaire
RCA	regulation of complement activation
RFLP	restriction length fragment polymorphism
SBTI	soybean trypsin inhibitor
SCR	short consensus repeat
SDS	sodium dodecyl sulfate
VBS	veronal buffer saline
V/V	volume/volume

# **INTRODUCTION**

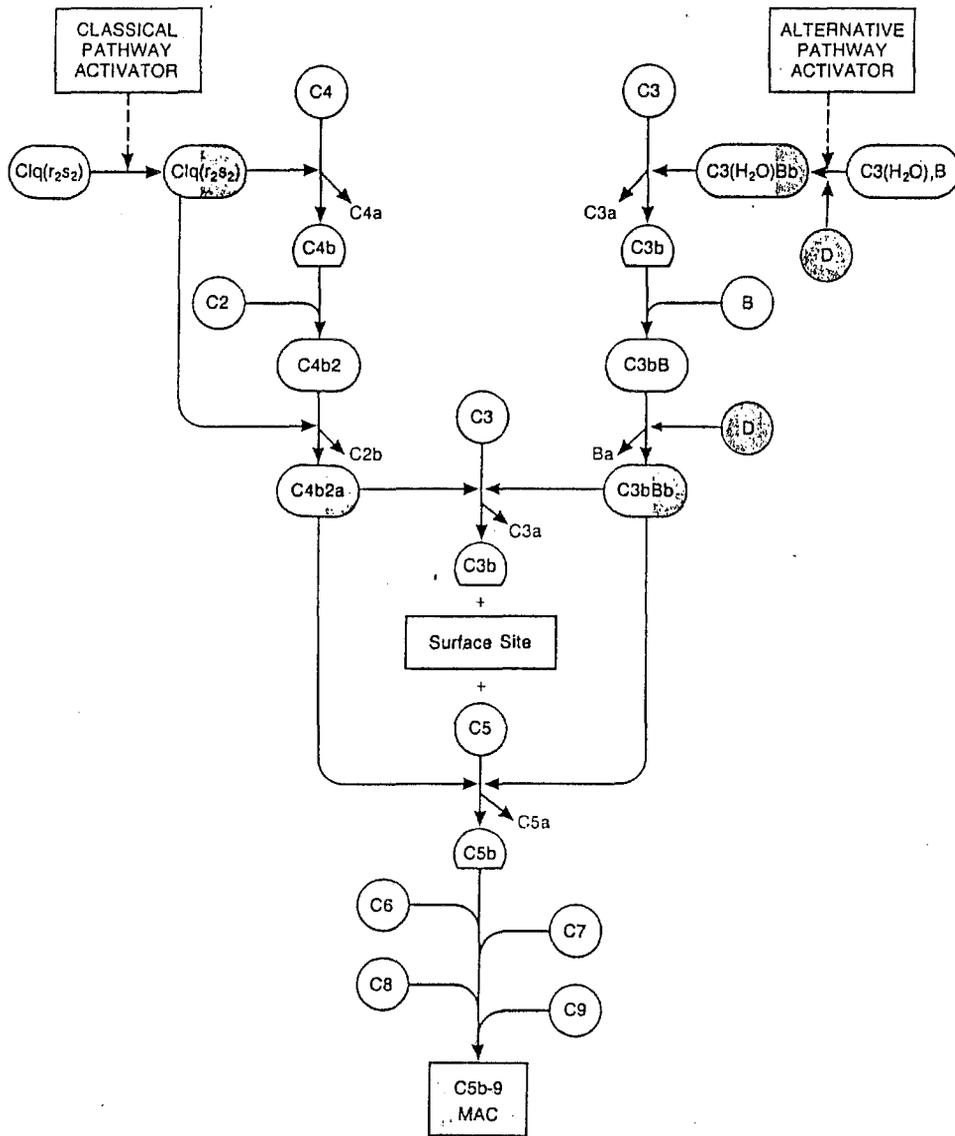


FIGURE 1 : LE SYSTEME DU COMPLEMENT (40)

Le système du complément représente un ensemble de protéines plasmatiques (Tableau I) ou membranaires jouant un rôle essentiel dans les mécanismes de défense immunitaire. Il peut être décomposé en trois unités : deux unités de reconnaissance conduisant à des activations parallèles mais distinctes (voie classique et voie alterne) et une unité effectrice terminale (complexe d'attaque membranaire) mise en jeu par les deux voies classique et alterne (28,49) (Figure 1).

Le contrôle de l'activation du système est assuré d'une part par des protéines régulatrices présentes dans le plasma, d'autre part par des récepteurs et des protéines membranaires.

## I - ACTIVATION DU COMPLEMENT (Tableau II)

### A - ACTIVATION DE LA VOIE CLASSIQUE

La voie classique est généralement activée par des complexes antigènes-anticorps à IgM, IgG1 ou IgG3 principalement. Elle peut également être activée par la C-Reactive-Protein, quelques bactéries à gram négatif, des virus (rétrovirus), des parasites (*Schistosoma mansoni*) ainsi que des polyanions (sulfate de dextran, lipide A, héparine).

	PM (k Da)	Nombre de chaînes	PM des chaînes (k Da)	Localisation des gènes	Concentration plasmatique		Activité enzymatique (+) (substrat(s))
					mg/l	µM	
VOIE CLASSIQUE							
C1q	462	18 (six A + six B + six C)	A:26,5 ; B:26,5 C:24	1	80	0,17	-
C1r	175	2	-	12	50	0,30	+ (C1r, C1s)
C1s	80	1	-	12	50	0,30	+ (C4, C2)
C4	205	3 ( $\alpha + \beta + \gamma$ )	$\alpha$ :97; $\beta$ :75; $\gamma$ :33	6	200	1	-
C2	102	1	-	6	20	0,20	+ (C3, C5)
C3	185	2	$\alpha$ :110 ; $\beta$ :75	19	1 300	7,02	-
VOIE ALTERNE							
Facteur D	24	1	-	6	1	0,04	+ (C3bB)
Facteur B	92	1	-	19	210	2,20	+ (C3, C5)
C3	185	2	$\alpha$ :110 ; $\beta$ :75	19	1 300	7,02	-
VOIE FINALE							
C5	190	2	$\alpha$ :115 ; $\beta$ :75	-	70	0,37	-
C6	120	1	-	-	64	0,53	-
C7	110	1	-	-	56	0,51	-
C8	150	3	$\alpha$ :64 ; $\beta$ :64 ; $\gamma$ :22	1	55	0,36	-
C9	71	1	-	-	59	0,83	-

TABLEAU I : PROTEINES PLASMATIQUES IMPLIQUEES DANS L'ACTIVATION DU COMPLEMENT (40)

	VOIE CLASSIQUE	VOIE ALTERNE
PROTEINES	Immunoglobulines (IgM, IgG1, IgG3) C Reactive Protein Protéine P15E de rétrovirus Protéine basique de la myéline	IgG, IgA, IgE Facteur/Venin de cobra
POLYSACCHARIDES	Composés de venins de fourmi Certains di et tri-saccharides	Agarose, inuline Polysaccharides de LPS (Bactéries gram négatif)
POLYANIONS	Sulfate de Dextran Lipide A de LPS Héparine Polynucléotides Cristaux d'urate monosodique	Sulfate de dextran Acide teichoïque
MICROORGANISMES ET MEMBRANES DIVERS	Quelques bactéries gram négatif Membranes mitochondriales Enveloppes de certains virus Certains parasites (Schistosoma mansoni)	Nombreuses bactéries gram négatif Nombreuses bactéries gram positif Virus et cellules infectées Parois de levures (Zymosan) Cellules tumorales (Raji) Trypanosomes Erythrocytes hétérologues

TABLEAU II : ACTIVATEURS DU COMPLEMENT (40)

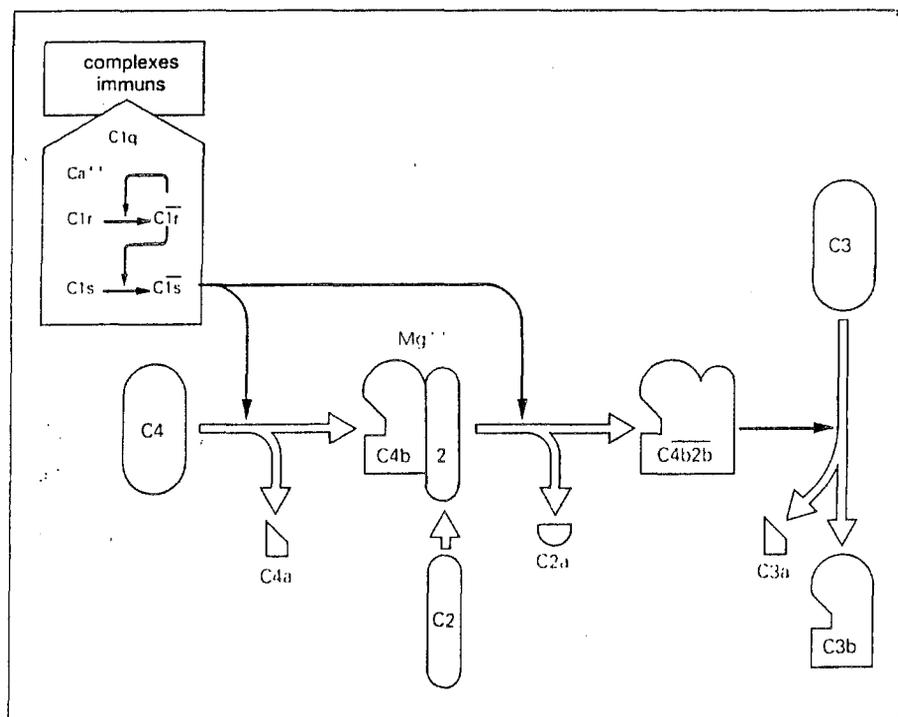


FIGURE 2 : ACTIVATION DE LA VOIE CLASSIQUE (49)

L'étape d'initiation fait apparaître dans le système la première activité protéolytique grâce à l'intervention du complexe C1. Ce dernier est composé de deux molécules de C1r et deux molécules de C1s qui, en présence de calcium, forment un tétramère se liant à une molécule de C1q. Celle-ci contient dix-huit chaînes polypeptidiques parmi lesquelles on retrouve trois types de chaînes A, B, et C. L'interaction du complexe C1 avec un activateur entraîne une modification de conformation de C1q qui permet une activation du pro-enzyme C1r en C1r activé (C1r̄) possédant un site actif de type protéase à sérine. C1r̄ est doué d'une activité très spécifique puisque son seul substrat connu est C1s. La protéolyse limitée de C1s se traduit par l'apparition d'une nouvelle activité enzymatique (3). Ce système se trouve normalement maintenu à l'état non activé grâce à un inhibiteur spécifique, C1 inhibiteur.

C1 intervient sur les protéines C4 et C2 par l'intermédiaire de C1s. Il existe deux substrats (C4 et C2) pour la même protéase (C1s). C4 et C2 subissent une protéolyse limitée : C4 est clivé en C4a et C4b, ce dernier fragment contenant un pont thioester lui permettant de se fixer à des sites accepteurs. En présence de magnésium, une molécule de C2 va alors s'associer au C4b fixé et être protéolysée en deux fragments C2a et C2b. On obtient un assemblage bimoléculaire C4b2a appelé C3 convertase qui possède une activité protéolytique spécifique (*Figure 2*).

Ce complexe enzymatique, dont le site actif de type protéase à sérine est porté par C2a, a pour substrat le composant C3 qui est clivé et activé en C3a et C3b. Ce dernier peut se fixer sur C4b formant alors un complexe trimoléculaire

et acquiert la propriété de protéolyser C5 d'où son nom de C5 convertase.

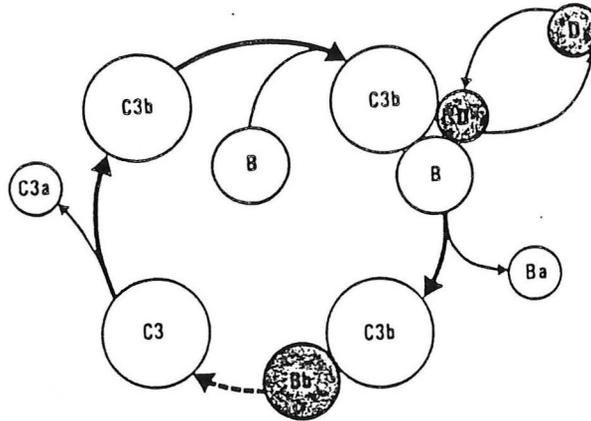
## **B - ACTIVATION DE LA VOIE ALTERNE**

La voie alterne peut être activée de façon non spécifique (*Tableau II*). Elle est mise en jeu, en l'absence d'anticorps, par de nombreuses substances telles que l'agarose, l'inuline, le sulfate de dextran, l'acide téichoïque ainsi que par de nombreuses bactéries à gram positif et à gram négatif et des parasites (trypanosomes).

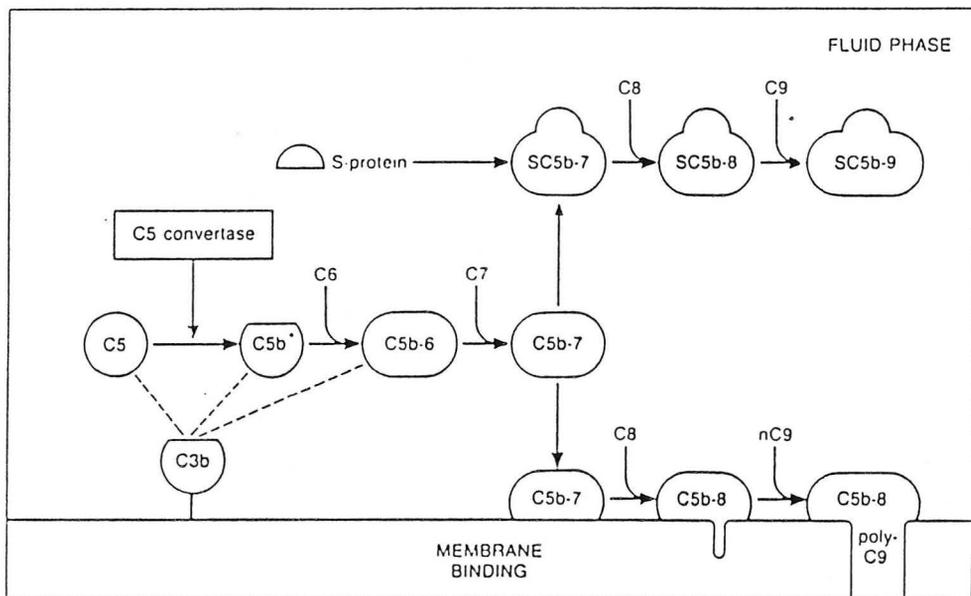
La voie alterne peut être décomposée en deux étapes : une étape initiale indépendante des activateurs et une étape amplificatrice ne pouvant fonctionner qu'à la surface des particules activatrices. Ces deux phases aboutissent à la formation des C3 et C5 Convertases. Seuls les ions magnésium sont indispensables au fonctionnement de la voie alterne d'activation.

La molécule de C3 présente, dans sa structure, une liaison thioester instable susceptible d'être hydrolysée dans le plasma pour former une molécule de structure analogue à C3b mais ne possédant pas certaines propriétés de celui-ci (fixation aux membranes) d'où son appellation de C3b-like-C3.

La molécule de C3b-like-C3 est capable, en présence de magnésium, de s'associer avec le facteur B en formant un complexe bimoléculaire réversible C3bB. Ce dernier est alors



**FIGURE 3** : LA BOUCLE D'AMPLIFICATION DE LA VOIE ALTERNE (28)



**FIGURE 4** : LE COMPLEXE D'ATTAQUE MEMBRANAIRE (49)

sensible au facteur D ce qui contribue à former un assemblage bimoléculaire soluble C3bBb, par clivage du facteur B en deux fragments Ba et Bb, ce dernier restant lié à C3b. Ce clivage enzymatique par le facteur D fait apparaître sur le fragment Bb un site actif de type sérine-protéase. Le complexe activé C3bBb représente la C3 Convertase soluble, amorce de la voie alterne.

Ce complexe enzymatique a pour substrat C3 et libère ainsi de nouvelles molécules de C3b qui, en se déposant sur la surface activatrice, seront à l'origine d'un mécanisme de rétro-contrôle dénommé boucle d'amplification de la voie alterne (*Figure 3*). C3b est dans ce cas simultanément le produit de la réaction et le composant de départ de la C3 convertase. La fixation d'une nouvelle molécule de C3b entraîne un changement de spécificité de la C3 convertase alterne dont le substrat devient C5.

#### **C - LA VOIE FINALE DU SYSTEME (*Figure 4*)**

La voie finale, de C5 à C9, est commune aux deux voies d'activation. L'attaque de la membrane cellulaire s'effectue par un complexe d'attaque membranaire (MAC) dont la formation ne nécessite pas la mise en jeu de réactions enzymatiques. Ce sont des réactions d'associations progressives des molécules les unes aux autres. L'activation de C5 par la C5 Convertase classique et/ou alterne clive C5 en deux fragments C5a et C5b. Sur ce dernier apparaît un site labile de liaison spécifique pour C6 puis intervient C7 qui conduit à former un complexe stable trimoléculaire C5b-C6-C7 présentant une

	PM (k Da)	Distribution	Spécificité	Rôle
C1 Inh.	110	Plasmatique (200 mg/l)	C1r ; C1s	. Complexes covalents avec C1r et C1s . Dissociation de C1
C4BP	500	Plasmatique (250 mg/l)	C4b	. Accélération de la dissociation de la C3/C5 convertase classique . Cofacteur du Fact. I dans l'inactivation du C4b
Facteur I	88	Plasmatique (30 mg/l)	C3b Cofacteur C4b Cofacteur	. Inactivation protéolytique du C3b ( H) et/ou du C4b ( C4bp)
CR1	200	Membranaire (forme plasmatique décrite)	C3b ; C4b	. Accélération de la dissociation des C3/C5 convertases alterne et classique . Cofacteur du Fact. I dans l'inactivation du C3b et C4b
DAF	70	Membranaire (forme plasmatique décrite)	C3b ; C4b	. Accélération de la dissociation des C3/C5 convertases classique et alterne
MCP	45 - 70	Membranaire	C3b ; C4b	. Cofacteur du Fact. I dans l'inactivation du C3b et du C4b
PROPERDINE	220	Plasmatique (20 mg/l)	C3b	. Stabilise la C3/C5 convertase alterne
FACTEUR H	155	Plasmatique (500 mg/l) (forme membranaire décrite)	C3b	. Accélération de la dissociation de la C3/C5 convertase alterne . Cofacteur du Fact. I dans l'inactivation du C3b
VITRONECTINE (S Protéine)	83	Plasmatique (505 mg/l)	C5b-9	. Liaison à C5b-7
HRF	65	Membranaire	C8 - C9	. Empêche l'assemblage du complexe d'attaque membranaire

TABLEAU III : PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE CONTROLE  
DU COMPLEMENT (47)

affinité importante pour les membranes. Ce complexe vient s'insérer dans la membrane par l'intermédiaire de C7 et fixe C8. Le complexe C5b-8 permet alors à plusieurs molécules de C9 (12 à 16) de se polymériser. Cette polymérisation réalise un canal transmembranaire au travers duquel passent de petites molécules, dont de l'eau, pouvant entraîner la lyse cellulaire.

## II - SYSTEMES DE REGULATION DU COMPLEMENT

Un ensemble de protéines plasmatiques et membranaires intervient à tous les niveaux de la cascade enzymatique et de la formation du complexe d'attaque membranaire pour réguler l'activité du système. (Tableau III)

### A - REGULATION DE LA VOIE CLASSIQUE

\* C1 inhibiteur contrôle dans le sérum l'activation et l'activité de C1. Il se lie à C1r et à C1s dès leur activation. En les dissociant de C1q par blocage irréversible de leur site enzymatique, il permet la formation de complexes de type C1inh-C1r-C1s-C1inh.

\* Le contrôle de la C3 convertase classique met en jeu deux types de processus : l'accélération de la

dissociation de la C3 Convertase déjà très instable et/ou l'inactivation du système par protéolyse de C3.

- La C4 Binding Protéin (C4bp) est une glycoprotéine apparaissant au microscope électronique sous l'aspect d'une araignée. Chacune des sept pattes porte à son extrémité un site d'attachement spécifique pour C4b. Sur le corps central existe un site de liaison pour la protéine S, protéine vitamino-K- dépendante. La C4bp se lie à C4b, déplace C2a et accélère ainsi la dissociation de la convertase classique. D'autre part, par sa liaison à C4b, elle empêche celui-ci d'agir avec C2 et le rend accessible au facteur I, autre protéine régulatrice, jouant alors le rôle de cofacteur.

- Le facteur I est une sérine protéase qui, en utilisant la C4bp (ou le facteur H) comme cofacteur, clive C3b et/ou C4b pour engendrer des produits de coupure (C3bi, C3c, C3d) incapables de fixer le facteur B ou C2, donc d'assembler une convertase classique ou alterne.

#### **\* Les protéines membranaires**

- CR1 accélère la dissociation des convertases par son activité cofactrice du facteur I.

- Le DAF (Decay Accelerating Factor) est une protéine associée à la membrane par une liaison glycosyl-phosphatidyl-inositol. Il est présent sur de nombreuses cellules. Il accélère la dissociation spontanée des convertases d'une manière plus efficace que CR1 mais ne possède pas d'activité de type cofacteur pour l'inactivation de C3b ou C4b par le facteur I.

DAF et CR1 sont les seules protéines régulatrices du complément présentes à la surface des érythrocytes.

- Les MCP (Membrane Cofactor protein) présentent une répartition cellulaire similaire à celle du DAF à l'exception des érythrocytes. Elles se lient à C3b et C4b et jouent également le rôle de cofacteurs pour l'inactivation de C3b et/ou de C4b par le facteur I. Par contre, elles ne possèdent aucune activité de dissociation des convertases.

## B - REGULATION DE LA VOIE ALTERNE

\* **La properdine** est une glycoprotéine dont la particularité est de stabiliser la C3 Convertase de la voie alterne ce qui rend celle-ci plus résistante à l'action des facteurs I et H.

\* **Le facteur H** accélère la dissociation spontanée du complexe C3bBb en se liant spécifiquement à C3b, empêchant ainsi la fixation de nouvelles molécules de B à C3b. D'autre part, il joue le rôle de cofacteur en permettant la coupure de C3b par le facteur I.

\* Enfin, comme pour la voie classique, peuvent intervenir **les protéines membranaires**, CR1 et DAF, possédant une activité semblable à celle du facteur H.

Deux protéines plasmatiques, le facteur H et la C4bp, ainsi que trois protéines membranaires, CR1, DAF et MCP, contrôlant la dissociation des C3/C5 convertases et l'inactivation par le facteur I de C3b et/ou C4b, possèdent une très frappante homologie structurale. Leur structure primaire est organisée autour d'une unité répétitive commune de soixante acides aminés. Cette parenté structurale et fonctionnelle est également soulignée par le fait que les gènes de structure codant pour le facteur H, la C4bp, CR1, DAF et MCP sont localisés dans une même région, au niveau du chromosome 1, appelée "groupe de liaison R.C.A." (Regulation for Complement Activation).

#### **C - REGULATION DE LA FORMATION DU COMPLEXE D'ATTAQUE MEMBRANAIRE**

\* La **S-Protéine** ou **vitronectine** est une glycoprotéine présentant une forte affinité pour le complexe C5b-7 avec lequel elle forme un complexe stable et irréversible contenant trois molécules de S-Protéine. D'autre part, elle empêche la polymérisation de C9 au contact du complexe C5b-8.

\* Le **Homologous Restriction Factor (HRF)** est une protéine localisée au niveau de la membrane des érythrocytes mais sans doute présente sur de nombreuses autres membranes. Il présente la propriété de prévenir la lyse des érythrocytes par le MAC en fixant C8 et/ou C9.

	PM CKD	LIGAND SPECIFIQUE	ROLE MAJEUR	LOCALISATION
CR1 (4 allotypes)	A 190 B 220 C 160 D 250	C3b C4b	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Accélération de la dissociation des convertases</li> <li>. Cofacteur I</li> <li>. Elimination des complexes immuns</li> <li>. Opsonisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Erythrocytes</li> <li>. Lymphocytes B</li> <li>. Granulocytes</li> <li>. Monocytes</li> </ul>
CR2	145	C3d C3dg C3bi	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Cofacteur de I</li> <li>. Récepteur des EBV</li> <li>. Modulateur des cellules B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Lymphocytes B</li> </ul>
CR3	$\alpha$ 165 $\beta$ 95	C3bi	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Opsonisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Macrophages</li> </ul>
CR4	$\alpha$ 150 $\beta$ 95	C3bi	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Opsonisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Macrophages</li> </ul>

TABLEAU IV : RECEPTEURS DU COMPLEMENT (40)

### III - LES RECEPTEURS DU COMPLEMENT (Tableau IV)

L'activation du système complémentaire génère un certain nombre de ligands pouvant interagir avec des cellules de l'hôte et réguler leur fonction. Cette interaction intéresse des récepteurs exprimés à la surface des cellules. Les mieux connus actuellement sont les récepteurs pour les fragments de C3 et C4 (CR1, CR2, CR3, CR4).

#### A - LE RECEPTEUR CR1 (17)

CR1 est une glycoprotéine formée d'une seule chaîne polypeptidique. Chez l'homme, les cellules exprimant CR1 sont les érythrocytes, les lymphocytes B, une partie des lymphocytes T (64), les monocytes, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (24), les podocytes glomérulaires (26) et les cellules folliculaires dendritiques (46). CR1 présente quatre variants allotypiques correspondant à un polymorphisme de taille au niveau de la chaîne polypeptidique elle-même. En plus des deux variants allotypiques A et B de poids moléculaire (PM) 190 et 220 kDaltons (kDa), il existe deux allotypes plus rares C et D de PM 160 et 250 kDa (21). Il n'a pas encore été observé de différence d'activité entre les quatre formes allotypiques. Il existerait, par contre, un autre type de variation génétiquement contrôlée, indépendamment du polymorphisme de

taille, concernant le nombre de CR1 exprimé à la surface des érythrocytes (60).

CR1 possède une spécificité de liaison pour les fragments C3b, C3bi, et C4b avec cependant une affinité nettement plus élevée pour C3b.

CR1 présente des rôles multiples pouvant varier en fonction de sa localisation cellulaire :

- CR1 participe à la régulation des voies classique et alterne en accélérant la dissociation des convertases. D'autre part, par son activité cofactrice du facteur I, il permet le clivage de C3b en C3bi et C3f ainsi que le clivage ultérieur de C3bi en C3c et C3dg .

- CR1 érythrocytaire permet l'attachement et le transport de complexes immuns ou de bactéries opsonisées vers les phagocytes.

- CR1 présent sur les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles facilite la fixation des particules opsonisées par C3b .

- CR1 des lymphocytes B est vraisemblablement impliqué, après fixation de ses ligands, dans l'activation lymphocytaire .

## **B - LE RECEPTEUR CR2**

CR2 est une glycoprotéine composée d'une seule chaîne de PM 145 kDa (62). Il n'est présent qu'à la surface des lymphocytes B. CR2 lie les particules recouvertes de C3d, C3dg, et C3bi avec des affinités respectivement décroissantes ainsi que le virus d'Epstein-Barr. Son rôle physiologique serait d'être un récepteur accessoire pour la stimulation des réponses anticorps puisqu'il serait impliqué dans la différenciation et la prolifération des lymphocytes B.

## **C - LE RECEPTEUR CR3**

CR3 est une glycoprotéine composée de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de PM 165 et 95 kDa, liées de façon non covalente. Il est exprimé à la surface des phagocytes, des lymphocytes K (Killer) ou NK (Natural Killer). Il est spécifique du fragment C3bi. Il participe à la fonction phagocytaire par opsonisation des substances acceptrices revêtues de C3bi ainsi qu'au métabolisme oxydatif des phagocytes. Par ailleurs, il intervient également dans la cytotoxicité cellulaire K ou NK.

## **D - LE RECEPTEUR CR4**

Très comparable à CR3, il se distingue par une distribution majoritaire sur les macrophages.

#### IV - ROLES BIOLOGIQUES DU COMPLEMENT

Le complément joue un rôle biologique important grâce à l'intervention de ligands diffusibles (C4a, C3a, C5a) produits au cours de l'activation du système et de récepteurs spécifiques de ligands bifonctionnels.

##### A - ACTIVITES MEDIÉES PAR LES LIGANDS DIFFUSIBLES

Au cours de l'activation du complément sont libérés les fragments C3a, C4a et C5a appelés anaphylatoxines. Ces molécules provoquent la dégranulation des cellules basophiles, libérant de l'histamine très vasoactive. La carboxypeptidase N abolit la capacité de ces anaphylatoxines à se fixer sur leur récepteur cellulaire (30).

C5a est le principal facteur chimiotactique. Sa fixation sur les phagocytes permet l'adhésion aux cellules endothéliales.

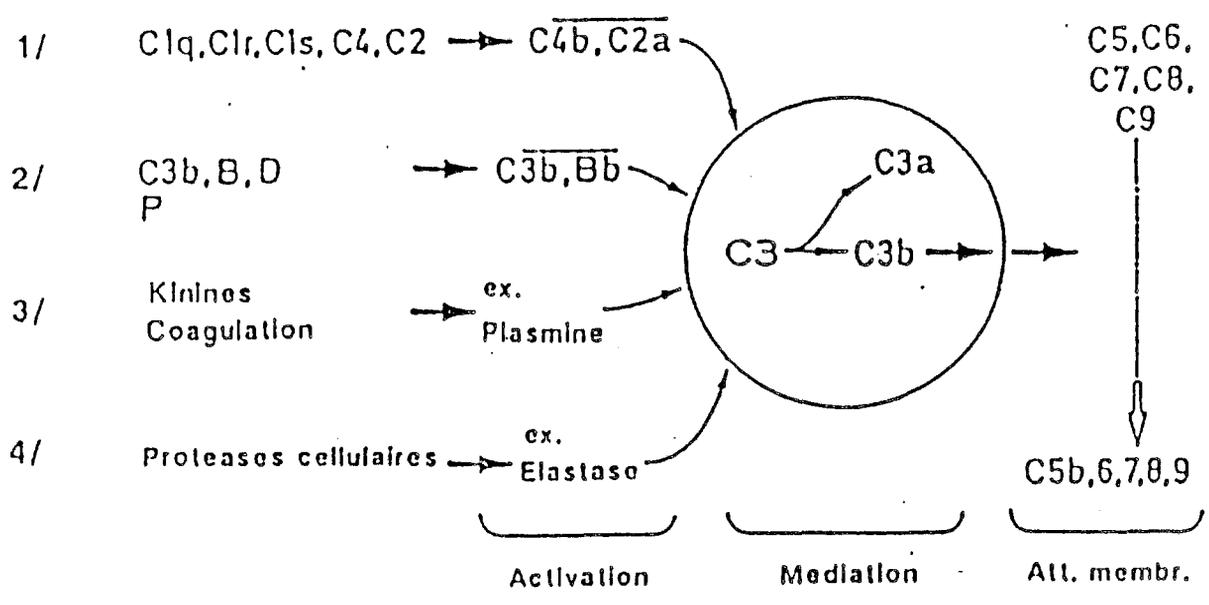


FIGURE 5 : SITUATION DU SYSTEME COMPLEMENTAIRE (21)

## **B - ACTIVITES MEDIÉES PAR LES LIGANDS BIFONCTIONNELS**

### **1 - Complexes immuns**

CR1 érythrocytaire reconnaît C3b fixé sur les complexes immuns et permet ainsi leur élimination. En effet, les érythrocytes transportent les complexes immuns du sang vers le foie et la rate. A ce niveau, la protéolyse de C3b recouvrant les érythrocytes par le facteur I génère C3bi puis C3dg qui n'ont plus qu'une affinité négligeable pour CR1 et sont donc libérés.

### **2 - Opsonisation et phagocytose**

Les fragments de C3 et C4 fixés (C3b et C4b) agissent comme des opsonines facilitant la phagocytose. Les particules opsonisées se fixent sur les phagocytes par l'intermédiaire des récepteurs CR1, CR3 et du fragment Fc des IgG.

## **V - LE COMPOSANT C3**

La molécule de C3 représente le composant central du système en raison de sa double appartenance aux voies classique et alterne du complément (*Figure 5*). D'autre part, C3 est la protéine du complément quantitativement la plus abondante dans le sérum. Son importance peut être mise en évidence par le fait

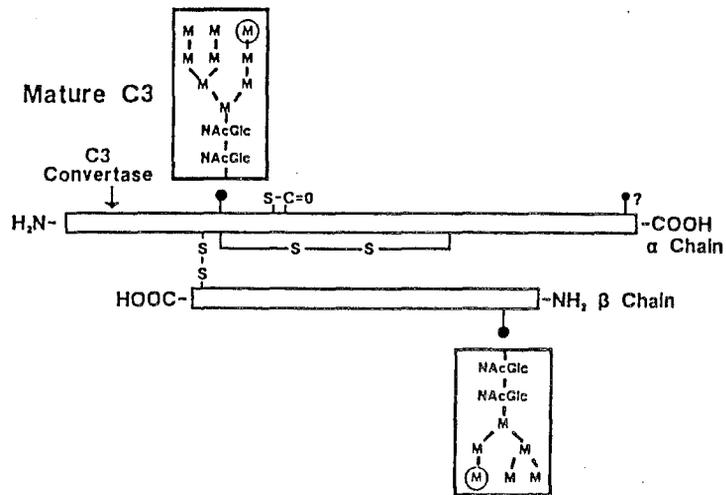


FIGURE 6 : SITES DE GLYCOSYLATION DE C3 (6)

que les individus présentant un déficit hétérozygote en C3 souffrent d'infections pyogènes récurrentes et l'absence de C3 est fréquemment létale.

#### A - STRUCTURE DE LA MOLECULE DE C3

C3 est une  $\beta$  globuline de 185 kDa composée de deux chaînes polypeptidiques distinctes  $\alpha$  110 kDa et  $\beta$  75 kDa reliées entre elles par des ponts disulfures et des forces non covalentes (56).

La composition en hydrates de carbone représente environ 1,7 % de C3 avec seulement deux types de sucres identifiés : mannose (1,3 %) et N-acétylglucosamine (0,4 %) (59). Les sites de glycosylation se situent au niveau des résidus proline en 63 de la chaîne  $\beta$  et tyrosine en 917 de la chaîne  $\alpha$  (6). C3 possède un autre site potentiel de glycosylation. Par contre, C3 humain paraît ne contenir que de très faibles quantités d'acide sialique (Figure 6).

La séquence peptidique de C3 a pu être déduite de la séquence de l'ADNc (20) : La composition en acides aminés montre pour la chaîne  $\beta$  l'importance quantitative des résidus thréonine, sérine, glycine et valine par rapport aux résidus acide aspartique, acide glutamique, alanine, cystéine et tryptophane. L'analyse N-terminale et C-terminale de chacune des deux chaînes de C3 met en évidence, pour la chaîne  $\alpha$  une

sérine aux deux extrémités, pour la chaîne  $\beta$ , une alanine côté C-terminal et une sérine côté N-terminal.

## **B - BIOSYNTHESE ET GENETIQUE DE C3**

La majorité de C3 (90%) est synthétisée au niveau hépatique mais il a également été décrit une synthèse par les monocytes, les lymphocytes B ainsi que par certaines lignées tumorales de différentes origines (6). La synthèse de C3 par d'autres tissus que le foie joue un rôle primordial dans les processus inflammatoires locaux et la régulation de la réponse immune (15).

C3 est synthétisé sous forme d'un précurseur formé d'une seule chaîne de 1663 acides aminés appelé pré-proC3. Celui-ci possède à son extrémité N-terminale un peptide signal de 22 acides aminés probablement clivé pendant la translocation dans le réticulum endoplasmique (20). Au sein du proC3, la chaîne  $\beta$  est liée par son extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale de la chaîne  $\alpha$  par l'intermédiaire d'un lien formé de 4 arginines qui est éliminé lors de la maturation de la protéine. Ce pont arginine est retrouvé dans C4 (RRRR) et C5 (RPRR) humains ainsi que dans C3 murin (RRRR) (6).

Après son passage dans le réticulum endoplasmique, C3 est transporté dans l'appareil de Golgi où il est glycosylé sur deux des trois sites. Pendant le transport entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, C3 est clivé en sa forme mature

composée des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , peut-être par une protéase de type cathepsine avec une spécificité pour les résidus basiques (6).

Le locus C3 a été localisé chez l'homme sur le chromosome 19 tandis que les composants C4, C2 et B sont codés par des gènes situés sur le chromosome 6, à proximité du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

C3 présente un polymorphisme génétique objectivé par une mobilité différente en électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage. Celle-ci permet de mettre en évidence deux allèles fréquents F (fast) et S (slow), dénommés ainsi en raison de leur vitesse différente de migration en gel d'agarose (36, 63). Leur transmission héréditaire s'effectue de manière autosomale codominante, ce qui conduit à observer les trois phénotypes suivants : F, S et FS. La fréquence des sujets homozygotes en F et S varie de manière importante selon l'origine des populations observées :

- chez les populations caucasiennes, les fréquences des gènes S et F sont respectivement de 75 % et 25%.

- chez les populations noires, les fréquences passent à 90 % et 10 %.

- chez les orientaux, elle est de 98 % et 2 % (27).

A côté de ces trois phénotypes les plus communs, il a été détecté au cours d'études familiales un nombre important de variants (une vingtaine environ) mis en évidence par une

différence de mobilité en électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage (5, 48).

### C - BASES MOLECULAIRES DU POLYMORPHISME

Les deux variants les plus communs, C3S et C3F, peuvent être séparés par leur différence de mobilité électrophorétique sur gel d'agarose, ce qui implique une variation de charge entre les deux allotypes. La petite différence de pI (0,05) et leur migration identique sur SDS-PAGE (7, 14) suggèrent que la variation en acides aminés chargés est limitée à la substitution de seulement un ou deux résidus. La séquence de l'ADNc de la chaîne  $\beta$  de C3 humain a mis en évidence la substitution d'une cytosine en guanine, au niveau du nucléotide 364. Ceci correspond, après traduction, à la substitution d'un résidu arginine chargé positivement (C3S) par un résidu glycine neutre (C3F) en position 102 (11).

Par ailleurs, KOCH et BEHREND (35) ont rapporté un autre site polymorphique lié à la réactivité sélective de C3 avec un anticorps monoclonal HAV 4-1. La majorité des formes C3S ne présente aucune réaction avec les anticorps HAV 4-1, tandis que les formes portant l'allèle C3F réagissent. Il existe cependant des C3S HAV 4-1 positif ainsi que des C3F HAV 4-1 négatif. Ceci indique que la variation allotypique entraînant une différence de migration n'est pas identique à celle définie par les anticorps HAV 4-1 (8). Le déterminant polymorphique a été identifié sur le codon 314 de l'exon 9 de

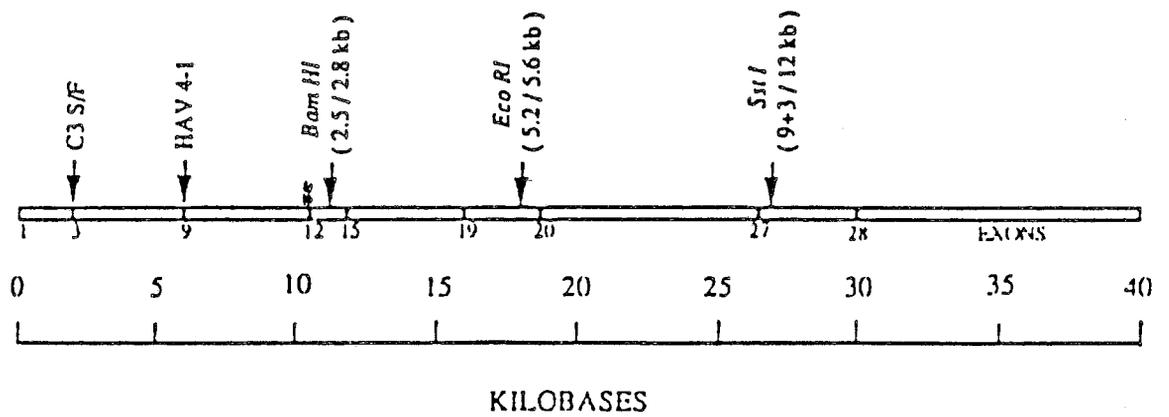
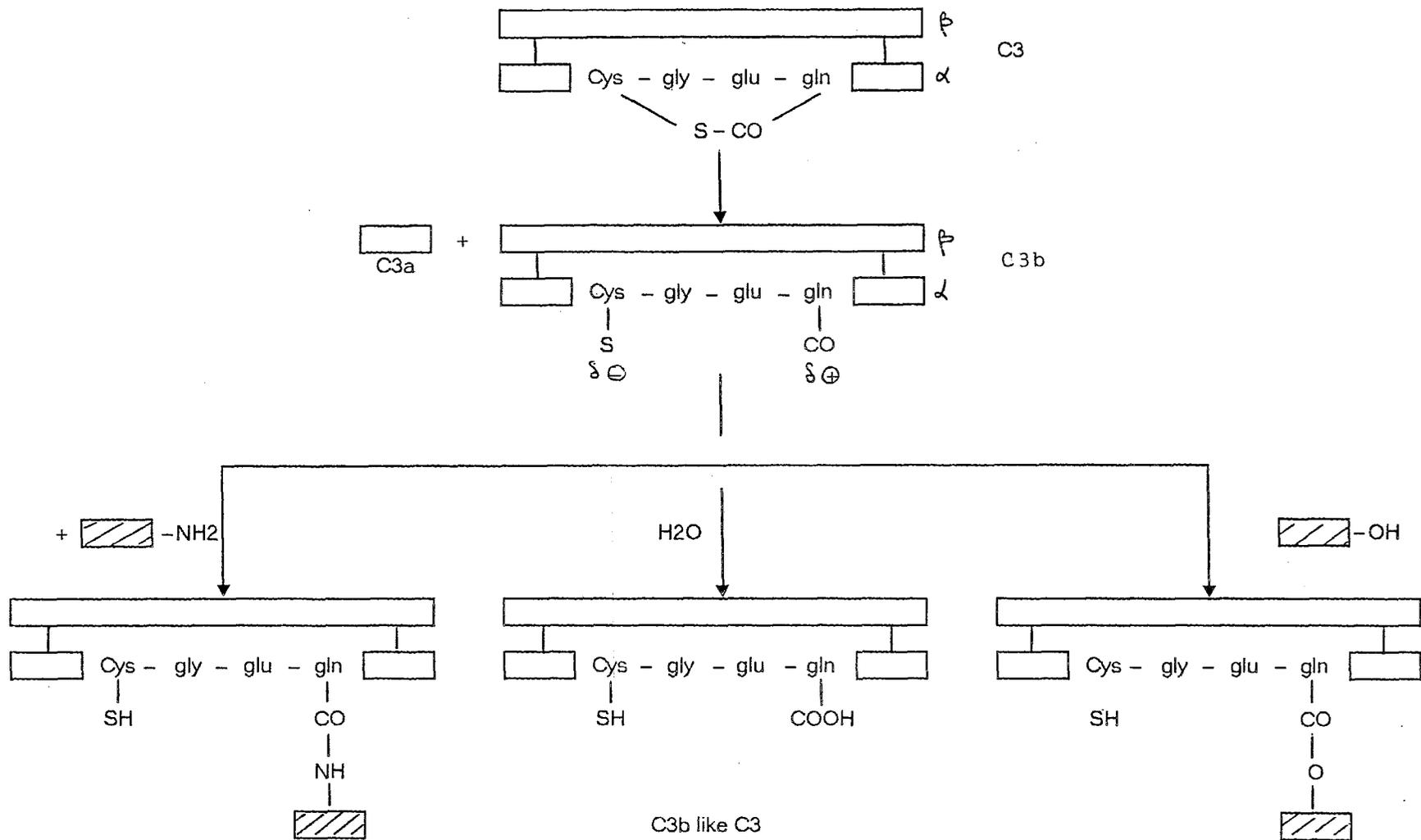


FIGURE 7 : CARTE DE RESTRICTION DU GENE DE C3 indiquant les positions des différents sites polymorphiques (11)





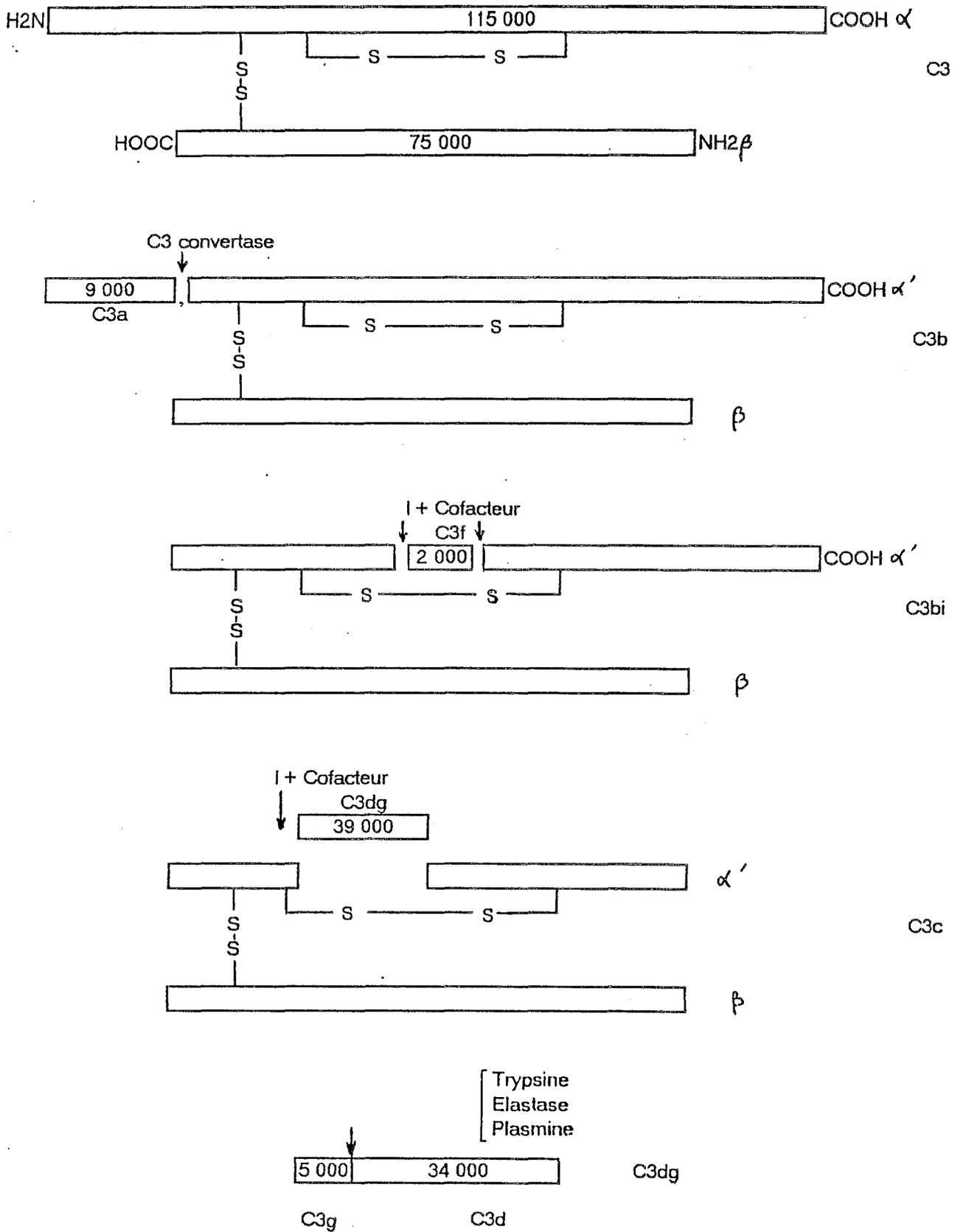
**FIGURE 8** : REACTIVITE DE LA LIAISON THIOESTER DE C3

l'alpha 2 macroglobuline (53). La protéolyse de C3 en C3a et C3b s'accompagne d'un changement de conformation de la molécule permettant de dégager la liaison thioester de C3b qui se trouvait relativement protégée dans C3 natif. C3b devient alors capable de se fixer de façon covalente aux surfaces cellulaires (31) ou aux complexes immuns par l'intermédiaire du groupe fonctionnel carbonyle hautement réactif.

Cette liaison thioester peut être hydrolysée pour former une molécule C3(H<sub>2</sub>O) appelée C3b-like-C3, de même PM que C3, mais ne présentant pas les mêmes fonctions que C3b (51). C3b-like-C3 se trouve à l'initialisation de la voie alterne. D'autre part, avec des particules biologiques présentant des groupements hydroxyles, C3b peut former une liaison ester. Il peut également réagir avec des groupements aminés membranaires pour former une liaison amide (*Figure 8*).

#### **E - FRAGMENTATION DE LA MOLECULE DE C3**

L'activation de la molécule de C3 par les deux voies classique ou alterne est accompagnée d'un clivage de C3 par une C3 convertase. Mais C3 peut également être fractionné par des protéases n'appartenant pas au complément, en particulier par la trypsine (*Figure 9*).



**FIGURE 9 : DEGRADATION DE LA MOLECULE DE C3**

## 1- Fragmentation de C3 par une C3-convertase (C4b2a ou C3bBb)

L'enzyme C3-convertase clive la molécule de C3 en deux fragments, C3a et C3b. Ce clivage s'effectue au niveau d'une liaison peptidique arginine-sérine située en position 748-749 sur la chaîne  $\alpha$  de C3 (38).

Le plus petit des deux fragments obtenus, C3a, est un peptide de 9 kDa environ, présentant une activité anaphylatoxique et susceptible d'intervenir comme médiateur de l'inflammation. Ce peptide possède une arginine C-terminale et une sérine N-terminale.

C3b représente le plus gros fragment de ce clivage. Son PM est de 181 kDa (56). Il est composé d'une chaîne  $\beta$  identique à celle de C3 et d'une chaîne  $\alpha'$  correspondant à la chaîne  $\alpha$  de C3 amputée du fragment C3a. Lors de l'activation, le clivage de C3 en C3b s'accompagne chez ce dernier de l'ouverture d'un groupement thioester hautement réactif lui permettant de se fixer de manière covalente à la surface de particules étrangères grâce à une réaction de transacylation. La surface acceptant C3b agit alors comme cofacteur dans la formation de la C5-convertase ce qui permet la suite de l'activation du complément. D'autre part, contrairement à C3 natif, C3b exprime de multiples sites de liaison pour C5, la properdine, le facteur H, le facteur I ainsi que pour CR1.

## 2 - Fragmentation par le facteur I

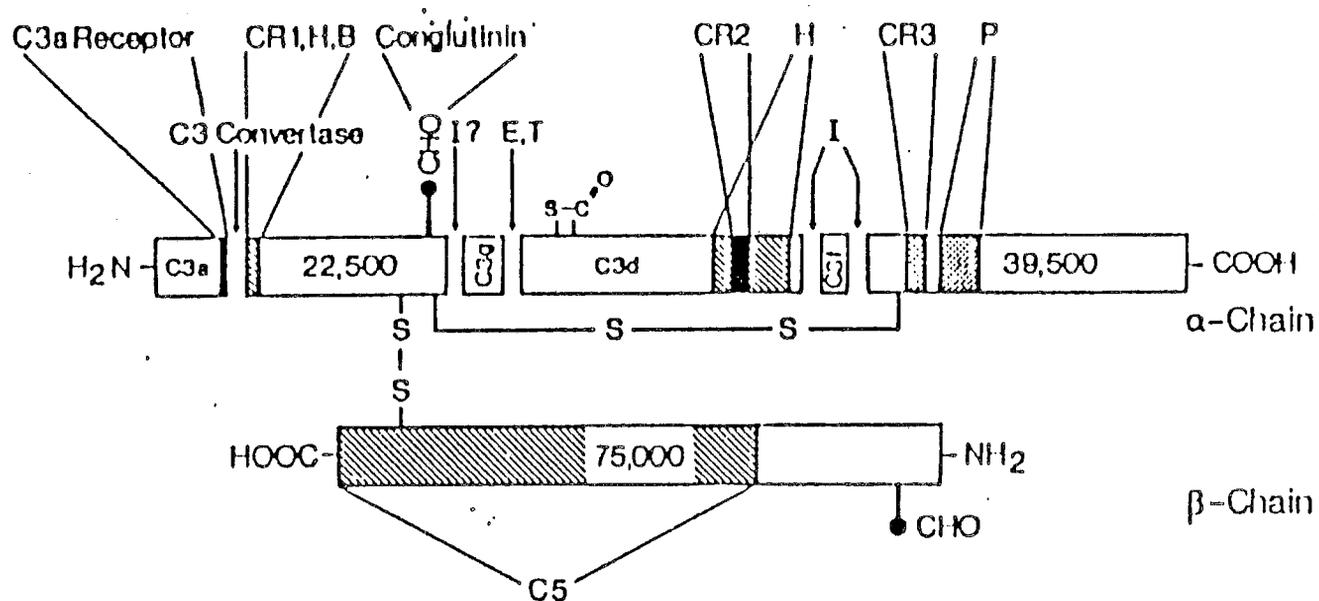
Certaines protéines de régulation, en se liant à C3b, induisent un changement de conformation de celui-ci, rendant ainsi accessibles certains sites de clivage. Le facteur I, sérine protéase, en présence d'un cofacteur (facteur H, C4bp, CR1, MCP) est susceptible de cliver la chaîne  $\alpha'$  de C3b au niveau d'une liaison arginine-sérine, entre les résidus 1303-1304 et 1320-1321 de la séquence de C3 (20). Un petit peptide de 2 kDa, C3f, est libéré. Le fragment restant, C3bi, exprime alors des sites de fixation pour CR2, CR3 et CR4 et reste fixé aux surfaces cellulaires par la liaison ester.

Un troisième site de clivage par le facteur I, en présence de cofacteurs (CR1, CR2, facteur H), situé sur les résidus 954-955 de la chaîne  $\alpha'$  de C3, génère un peptide de 39 kDa, C3dg, qui reste associé de façon covalente au site d'activation du complément alors que le reste de la molécule, constitué par C3c (141 kDa), est relargué en phase soluble. C3dg semble représenter le produit final de la dégradation physiologique de C3b.

## 3 - Fragmentation par la trypsine

Un certain nombre de protéases extrinsèques au système du complément est susceptible de dégrader la molécule de C3, en particulier la trypsine, l'élastase et la plasmine.

Le traitement de C3 purifié par la trypsine entraîne la transformation de la chaîne  $\alpha$  en chaîne  $\alpha'$ , ce qui correspond à la même fragmentation que celle obtenue par action



**FIGURE 10** : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE C3 indiquant les sites de coupure enzymatique par la C3 convertase, le facteur I (I), l'élastase (E) et la trypsine (T), ainsi que les sites de liaison aux récepteurs du complément et aux autres composants du complément : CR1, CR2, CR3, le facteur H (H), la properdine (P), le facteur B (B) et la conglutinine (39)

de la C3 convertase, à savoir formation de deux fragments, C3a et C3b. Un traitement prolongé provoque la formation de C3c et C3dg.

Enfin, trypsine, plasmine ou élastase peuvent générer un fragment C3d (34 kDa) et un fragment C3g (5 kDa), par clivage de C3dg, mais la formation de ces fragments ne paraît pas se produire à l'état physiologique et se voit uniquement in vitro.

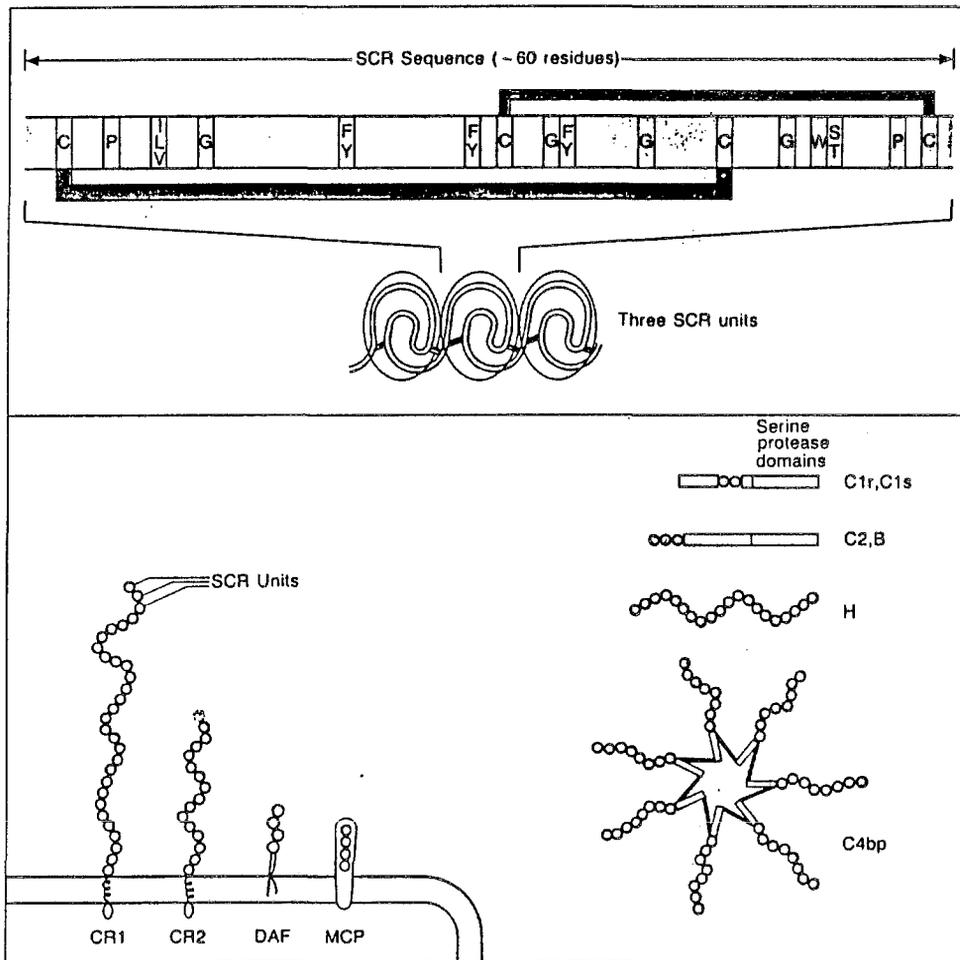
La trypsine agit au niveau d'une liaison lysine 1001-histidine 1002 de la chaîne  $\alpha'$ . Elle est également capable de cliver la chaîne  $\beta$  de C3.

Enfin, il a été décrit deux autres petits fragments de dégradation de C3b : C3e, peptide de 10 kDa provenant de C3c après clivage par des enzymes de type trypsine et C3dk peptide de 40 kDa (20).

## **F - INTERACTIONS DES FRAGMENTS DE C3 AVEC DIFFERENTS RECEPTEURS ET LIGANDS**

Les différents fragments formés au cours de l'activation et de la dégradation de C3 peuvent interagir avec de nombreuses protéines (39). Ces interactions sont à l'origine de nombreux effets biologiques (*Figure 10*).

Les protéines de contrôle de C3b interviennent au niveau de ces interactions, en particulier le facteur H, la C4bp, CR1, CR2, DAF et MCP. Chacune de ces protéines régulatrices est formée d'une répétition de séquences



**FIGURE 11** : STRUCTURE SCHEMATIQUE DES SCR (40)

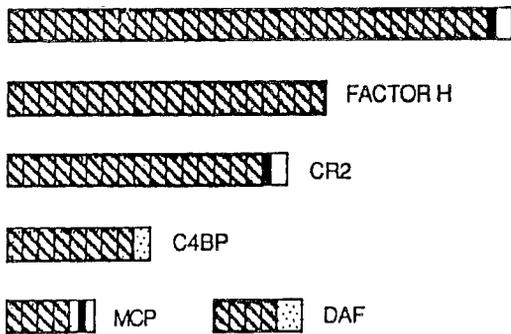
homologues d'environ soixante acides aminés appelées Séquences Consensus Répétées ou S.C.R. (Short Consensus Repeat). Ces S.C.R. sont généralement disposées de façon continue et commencent à l'extrémité N-terminale de chaque protéine. Chaque S.C.R. est caractérisée par la présence en position invariable de quatre résidus cystéine permettant des ponts disulfures à l'intérieur de chaque motif en 1-3 et 2-4, un tryptophane et deux prolines. Il existe également souvent d'autres positions conservées au niveau de résidus glycine et tyrosine/alanine (Figure 11).

Ces unités répétitives S.C.R. sont également appelées Complement Control Protein Repeats (CCPRs) puisqu'elles rendent compte de structures rencontrées dans les protéines codées par un groupe de gènes nommés R.C.A. (Regulation of Complement Activation) situé sur le bras long du chromosome 1 et codant pour CR1 (30 unités), CR2 (16 unités), C4bp (8 unités), facteur H (20 unités), MCP (4 unités) et DAF (4 unités).

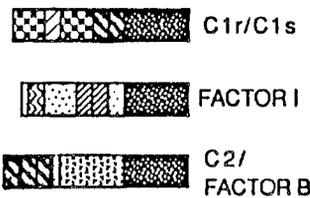
Toutes ces protéines montrent une similitude fonctionnelle : Toutes (excepté CR2) présentent une activité d'accélération de la dissociation des convertases et toutes (excepté le DAF) servent de cofacteurs dans le clivage de C3b par le facteur I. Ces S.C.R. se retrouvent également dans les protéases à sérine du complément (C2, facteur B, C1r et C1s) mais aussi dans des protéines n'appartenant pas au système du complément comme la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'interleukine 2, le facteur XIII de la coagulation et la  $\beta$  glycoprotéine I (45) (Figure 12).

Parmi cette famille de protéines régulatrices, CR1 présente une structure particulière puisqu'il est composé de

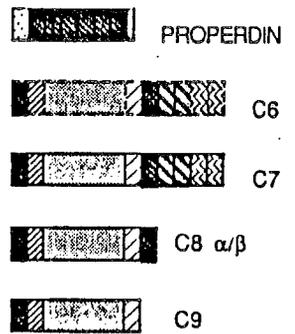
**RCA GENE CLUSTER PROTEINS**



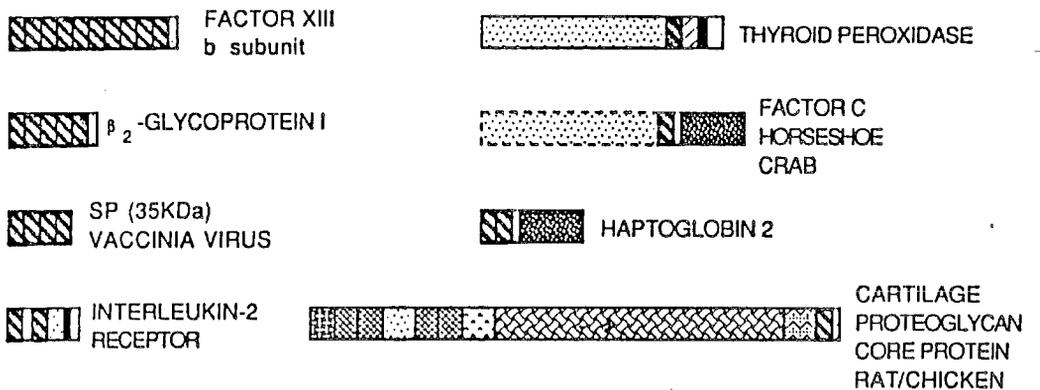
**SERINE PROTEASES**



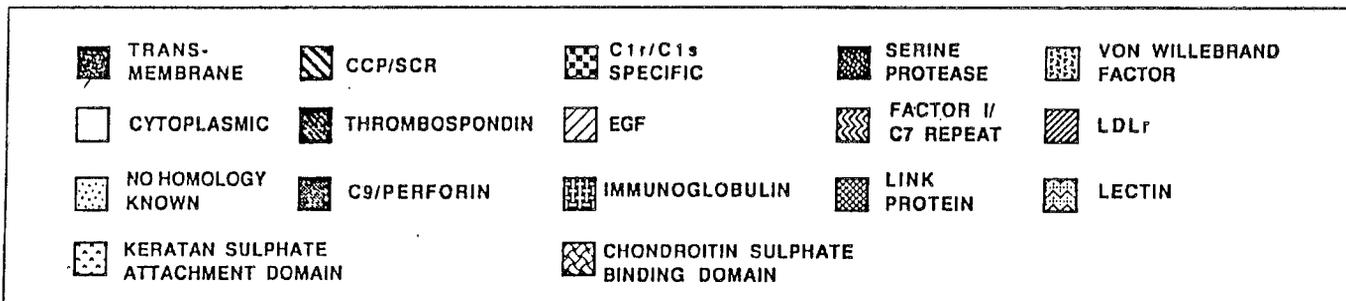
**PROPERDIN AND TERMINAL COMPONENTS**



**NON-COMPLEMENT MEMBERS OF CCP/SCR SUPERFAMILY**



**KEY**



**FIGURE 12** : DOMAINES DE STRUCTURE DES MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE CCP (SCR) (45)

plusieurs longues séquences répétées ou L.H.R. (Long Homologous Repeat) très fortement homologues codant chacune pour 450 acides aminés. Chacune de ces L.H.R. est constituée de 7 S.C.R.. CR2 présente une organisation similaire à celle de CR1 mais les L.H.R sont formées de 4 S.C.R..

## 1 - Les ligands de C3b solubles (39).

### *a - Le facteur B*

Le facteur B est une protéase à sérine de PM 93 kDa qui participe à l'initiation et l'amplification de la voie alterne. Un premier site de fixation de C3 se situe sur le fragment Ba. Le mode de fonctionnement de la voie alterne suggère qu'il existe, sur le facteur B, un second site de fixation de C3 qui serait localisé sur le fragment de 33 kDa C-terminal de Bb. C3b présenterait également deux sites de fixation pour les fragments du facteur B.

### *b - C4bp*

C4bp forme un complexe avec C3b permettant le clivage de celui-ci par le facteur I. Le facteur H est cependant plus efficace que la C4bp pour cette réaction.

### *c - C5*

L'interaction de C5 avec C3b présent sur les C5 convertases entraîne son clivage et la libération de C5a d'une part, l'initiation du complexe d'attaque membranaire d'autre part. La partie de C3b responsable de la fixation de C5

correspond à la chaîne  $\beta$ . C5 est le seul ligand connu à se fixer sur la chaîne  $\beta$  de C3.

#### *d - La conglutinine*

La conglutinine est une protéine plasmatique de six chaînes polypeptidiques de 66 kDa, se liant à C3b fixé. Cette liaison calcium dépendante est inhibée par la N-acétyl-D-glucosamine. Le site d'interaction de la conglutinine sur C3 a été localisé sur le site glycosylé du résidu 917 de C3. Le rôle de l'interaction conglutinine-C3bi dans la régulation du complément ou dans d'autres fonctions n'est pas connu.

#### *e - Le facteur H*

Le facteur H est une chaîne polypeptidique de 150 kDa. Il possède la propriété de se fixer à C3b, agissant alors comme un antagoniste du facteur B. C'est également un cofacteur du facteur I dans le clivage de C3b. Sur la chaîne de C3, trois sites différents d'interaction pour le facteur H ont été décrits : un de ces sites se trouve sur le fragment C3d, entre les résidus 1187 et 1249. Les deux autres sites se trouvent sur le fragment C3c dont l'un recouvre les 42 acides aminés N-terminaux de la chaîne  $\alpha'$  de C3b (résidu 727-768 de C3). Cette partie représente également le site de fixation de CR1.

#### *f - Le facteur I*

Le facteur I est une protéine plasmatique de 88 kDa formée de deux chaînes polypeptidiques. Il clive C3b ou

C3b-like-C3 après modification de ces molécules par différents cofacteurs.

#### *g - La properdine*

La properdine est une glycoprotéine plasmatique qui participe à la régulation de la voie alterne par fixation sur la C3 convertase et stabilisation de cette dernière. Le site responsable de la fixation de la properdine est localisé entre les résidus 1402 et 1435 de C3. Le mécanisme précis de la stabilisation de la convertase par la properdine est encore mal connu : les hypothèses émises seraient, soit une liaison à l'une des deux protéines (C3 ou B) qui augmenterait son affinité pour l'autre protéine, soit une liaison aux deux protéines à la fois, créant une gêne stérique pour l'attaque par des protéases.

## **2 - Les récepteurs membranaires**

### *a - CR1*

Le récepteur CR1 interagit avec la partie C3c de C3. Il lie C3b, C3b-like-C3 et, avec une affinité plus faible, C3bi et C3c mais ne reconnaît pas C3 natif, C3dg ou C3d. Il est, d'autre part, le récepteur pour le fragment C4b de C4.

Le site de fixation de CR1 sur C3b est le même que celui des facteurs H et B, recouvrant les résidus 727-768, à l'extrémité N-terminale de la chaîne  $\alpha'$ .

Les effets biologiques résultant de l'interaction de CR1 avec ses ligands sont très variables et

dépendent de la nature du ligand ainsi que du type cellulaire mis en jeu.

*b- CR2*

CR2 reconnaît la partie C3d de C3. Il lie spécifiquement les fragments C3bi, C3dg et C3d. De plus, CR2 est également le récepteur pour le virus d'Epstein-Barr (EBV). Le site de fixation de CR2 sur C3d recouvre les résidus 1205-1214 de C3. Cette région de C3d a été retrouvée similaire à une région de gp 350/220 de EBV mais on ne sait pas si C3d et EBV se fixent sur le même site de CR2 ou sur des sites différents.

*c - CR3*

CR3 reconnaît les fragments de C3 en présence de cations divalents. Son affinité est beaucoup plus importante pour C3bi que pour C3dg, suggérant que CR3 peut interagir avec au moins deux sites différents sur C3.

*d - CR4*

CR4 est une des trois protéines d'adhésion leucocytaire. Elle lie C3bi en présence de cations divalents et paraît avoir des propriétés similaires à CR3.

*e - CR5*

CR5 est une molécule de 90 kDa dont la structure n'a pas encore été établie de façon précise. Il reconnaît la partie C3d de C3. La fixation à CR5 est indépendante de l'action de cations divalents.

#### *f - Le DAF*

Le DAF protège les cellules de l'attaque des protéines du complément déposées à leur surface, en empêchant l'interaction du facteur B et de C3 avec les fragments C3b et C4b respectivement et en accélérant la dissociation des C3 convertases préformées sur la membrane. Le site précis de l'interaction du DAF avec les C3 convertases est encore sujet à discussion. Le DAF se lie à C3b isolé avec une affinité détectable mais très faible, bien qu'il soit établi qu'il interagit premièrement avec les sous-unités catalytiques des C3 convertases.

#### *g - MCP*

MCP est une protéine régulatrice fixant C3b. Elle est aussi appelée gp 45,70 car il existe une grande hétérogénéité dans le poids moléculaire de cette structure. Elle fixe C3b-like-C3, C3b, C4b, mais pas C3bi ni C3d. Elle sert de cofacteur au facteur I pour la dégradation de C3b mais n'a aucune activité favorisant la dissociation des C3 convertases classique ou alterne.

#### **G - DEFICIT EN C3**

Des déficits complets en C3 ont été retrouvés bien que ces cas soient très rares. Les individus déficitaires homozygotes en C3 souffrent d'affections auto-immunes (maladies rhumatismales, lupus érythémateux disséminé). Ils présentent une sensibilité accrue aux infections dues à des

microorganismes pyogènes (pneumonies, méningites). Les principaux agents étiologiques sont Pneumococcus, Streptococcus et Haemophilus influenzae (9). Néanmoins, les monocytes de ces patients produisent environ 25 % du C3 des monocytes de donneurs sains, ce qui suggère que la régulation de l'expression de C3 par les monocytes est indépendante de celle des hépatocytes. Le C3 produit par ces monocytes est morphologiquement et fonctionnellement identique à celui produit par les individus normaux (22). Par ailleurs, BOTTO et coll. (12) ont récemment confirmé la présence d'un gène C3 nul résultant d'une simple mutation suffisante pour entraîner un déficit en C3 chez les patients présentant ce gène de façon homozygote.

## VI - OBJET DU TRAVAIL PRESENTE

De nombreuses études ont permis de constater que la présence du phénotype F chez un individu le prédispose plus particulièrement à l'apparition d'un certain nombre de maladies, parmi lesquelles on distingue principalement l'arthrite rhumatoïde et la Maladie de Berger (affection rénale de type glomérulonéphrite à IgA). D'autre part, il a été démontré que les deux variants F et S diffèrent dans leur capacité à se fixer in vitro à des récepteurs du complément sur certaines cellules mononucléées (4). Par contre, l'activité hémolytique de chacun des deux variants ne présenterait pas de différence significative (16). D'autre part, des études chez la

souris ont mis en évidence une différence dans les degrés d'activation de C3 par le zymosan (32, 33).

Le travail présenté ici a pour objet la mise au point d'une méthode de typage de la molécule de C3 afin de détecter les individus présentant le gène F.

Dans un second temps est étudiée la recherche d'une différence fonctionnelle entre les deux types S et F de C3. Cette différence peut se traduire par une variation dans la vitesse de dégradation de C3 et/ou dans la quantité de C3 dégradée. D'autre part, du fait du caractère bifonctionnel de la molécule, la différence est également à rechercher au niveau de la fixation de C3b, soit à un accepteur, soit au récepteur.

**TYPAGE DE C3**

Le typage de C3 a été effectué d'après la méthode décrite par TEISBERG (58).

## I - MATERIEL ET METHODE

### A - REACTIFS

#### \* Tampon gel

- Véronal sodé.....13,35 mM
  - Lactate de calcium, 5 H<sub>2</sub>O.....0,45 mM
- pH 8,6 ; conservation à +4°C

#### \* Tampon cuve

- Véronal sodé.....71,5 mM
  - Lactate de calcium, 5 H<sub>2</sub>O.....1,8 mM
- pH 8,6 ; conservation à +4°C

#### \* Agaroses

- Agarose LITEX HSA préparée à 1 % dans le tampon gel.
- Agarose INDUBIOSE préparée à 1 % dans le tampon gel.

#### \* Acide acétique 4 % (V/V)

**\* Bleu de Coomassie**

- Bleu de Coomassie R250 (MERCK) 5 %  
(P/V) / Ethanol 45 % (V/V) / Acide acétique glacial 10 %  
(V/V) / Eau distillée.

**\* Solution de décoloration**

- Acide acétique 22 % (V/V) / Ethanol 55  
% (V/V) / Eau distillée.

**\* Tampon phosphate 1M pH 7**

- Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> anhydre.....0,61 M  
- KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> anhydre.....0,39 M

**\* PEG 3 % (P/V) dans tampon phosphate 1M pH 7**

**B - METHODE**

**1 - Préparation du gel d'agarose**

22 ml d'agarose LITEX HSA 1 % en tampon gel préalablement fondus au bain marie bouillant, sont coulés sur une plaque en verre de 10 cm x 10 cm, ce qui permet d'obtenir une épaisseur de gel de 2,2 ml.

Après gélification de l'agarose par passage à +4°C, on perce quatre puits rectangulaires de 1 cm x 0,1 cm, à 1,5 cm du bord de la plaque.

## **2 - Dilution des échantillons et dépôts**

Les échantillons étudiés sont prélevés sur anticoagulant EDTA 7,5 mM. Après centrifugation, les plasmas sont dilués au 1/10<sup>e</sup> dans de l'agarose INDUBIOSE 1 %, à 42°C, juste avant le dépôt. On dépose 25 µl de plasma dilué dans chaque puits. Les dépôts sont effectués du côté cathodique.

## **3 - Migration**

La migration s'effectue à 250 Volts (25 V/cm) pendant 4 heures dans une cuve d'électrophorèse thermostatée à +4°C (BIORAD). Une plaque de verre anticondensation est disposée sur chaque plaque d'agarose afin d'éviter l'évaporation de la gélose par effet thermique. L'intensité est d'environ 40 milliampères (mA) par plaque.

## **4 - Révélation**

Une fois la migration terminée, les protéines sont fixées pendant 2 minutes dans de l'acide acétique à 4 % puis le gel est rincé à l'eau distillée. Après avoir disposé un papier sur la plaque, celle-ci est mise à sécher sous infra-rouges. Enfin, la plaque est colorée en la plongeant 5 minutes dans la solution de Bleu de Coomassie puis décolorée par plusieurs bains dans le mélange décolorant.

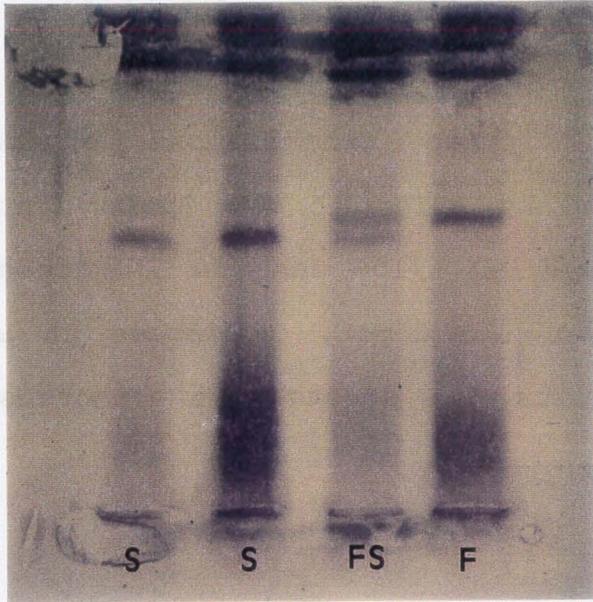


FIGURE 13

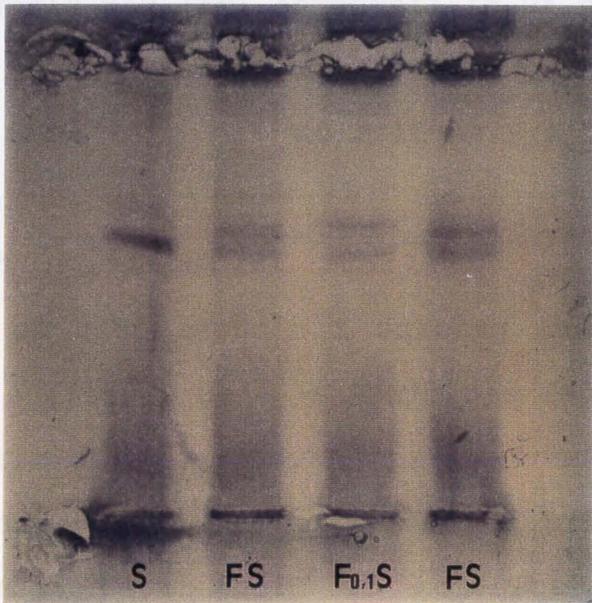


FIGURE 14

## II - RESULTATS

Dans les conditions décrites ci-dessus, l'électrophorèse du plasma en gel d'agarose à haut voltage permet de définir trois phénotypes distincts de C3 (*Figure 13*):

- Le type homozygote S se caractérise par la présence de deux bandes : une bande majeure située à 4,5 cm du dépôt, une bande mineure située à 5 cm du dépôt.

- Le type homozygote F se caractérise également par la présence de deux bandes : une bande majeure située à 4,8 cm du dépôt, une bande mineure moins visible que pour le type S et située à 5,3 cm du dépôt.

- Le type hétérozygote FS se caractérise par la présence de deux bandes de même intensité situées à 4,5 et 4,8 cm du dépôt.

Chaque allèle contrôle une paire de bandes. Sur les 120 sérums étudiés, il a été noté un type ne correspondant à aucune des trois formes de C3 les plus répandues. Ce variant se présente sous forme de deux bandes majeures plus espacées que pour le type FS, localisées à 4,2 et 4,8 cm du dépôt. On peut baptiser ce variant  $F_{0,1}S$ , en suivant la nomenclature établie par ALPER et coll. (1) (*Figure 14*).

On observe également, pour chaque plasma étudié, une autre bande d'intensité importante située à 7,2 cm du dépôt. Cette bande ne correspond pas à C3 car elle ne réagit pas avec

un anticorps anti-C3c. Cette bande correspond probablement à la transferrine.

La congélation n'entraîne pas de variation puisque les échantillons étudiés proviennent soit de sang frais, soit de plasmas congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . On ne note aucune différence de migration selon la durée de congélation.

#### **\* Etude de plusieurs agaroses**

Plusieurs géloses (toutes utilisées à 1 % en tampon gel) ont été étudiées en vue de déterminer la mieux adaptée à cette migration.

- L'agarose SERVA EEO à fort courant d'électroendosmose ne permet pas une migration suffisante.

- L'agarose LKB-L à faible courant d'électroendosmose entraîne une migration trop forte.

- Par contre, l'agarose LKB-M, présentant un courant d'électroendosmose plus élevé, permet une migration correcte, à peu près équivalente à celle obtenue avec l'agarose LITEX HSA.

#### **\* Conditions de travail**

- Il apparaît important de réaliser immédiatement après arrêt de la migration une fixation des protéines dans de l'acide acétique à 4 %. Ceci évite en effet

leur diffusion au sein de la gélose et permet d'obtenir des bandes mieux individualisées.

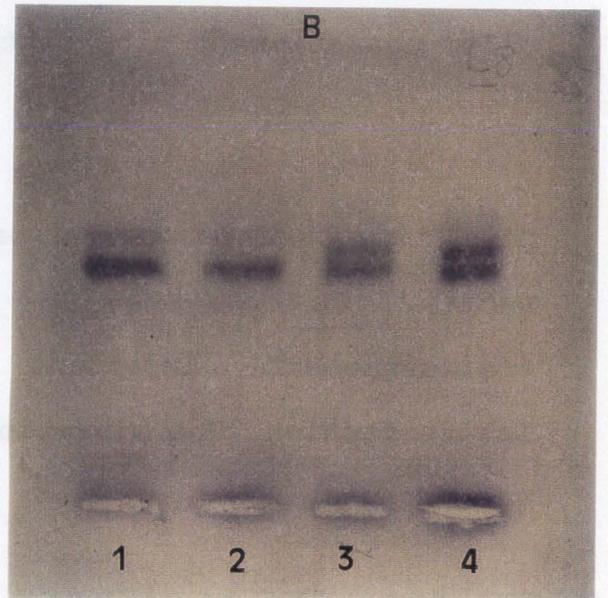
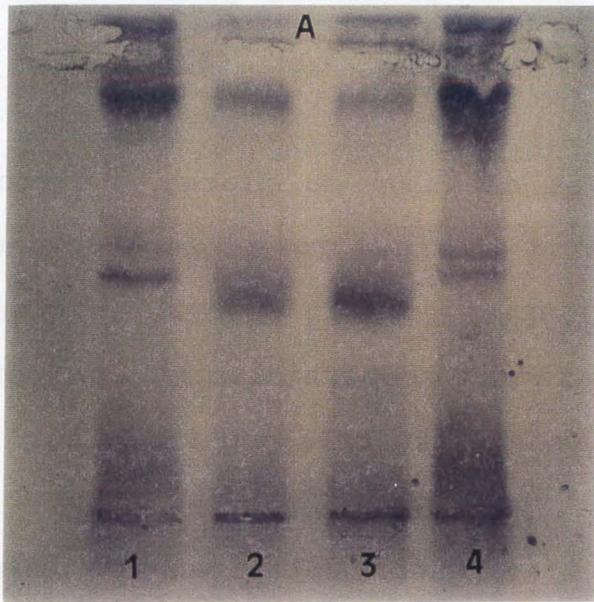
- La dilution du plasma s'effectue dans de l'agarose INDUBIOSE afin d'éviter une rupture de courant due à la fonte du gel. La dilution au 1/10° paraît suffisante ; au 1/25°, les bandes apparaissent trop faiblement, en particulier les bandes mineures qui sont alors très peu visibles.

- L'épaisseur relativement élevée de la gélose est importante puisqu'avec 1,9 mm d'épaisseur, les bandes ont tendance à s'étaler dans le gel alors qu'avec 2,2 mm elles apparaissent plus nettes et mieux séparées.

- Une migration plus courte à voltage plus important ne permet pas une bonne individualisation des bandes. On observe en effet dans ces conditions un épaississement important des bandes empêchant toute interprétation. Une migration de 4 heures à 250 volts (25 V/cm) est acceptable.

#### **\* Traitement à la neuraminidase**

La neuraminidase est une enzyme qui coupe les acides sialiques couplés à la protéine. Il a donc été tenté de traiter préalablement les échantillons par de la neuraminidase, en incubant pendant 18 heures à température ambiante 1 volume de neuraminidase pour 2 volumes de plasma. Les résultats obtenus montrent un élargissement des bandes



**FIGURE 15** : TYPAGE DE C3 APRES TRAITEMENT DES ECHANTILLONS PAR LA NEURAMINIDASE

A : Electrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage

B : Electrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation

1 : C3S non traité

2 : C3S traité par la neuraminidase

3 : C3FS traité par la neuraminidase

4 : C3FS non traité

uniquement imputable à la neuraminidase elle-même puisqu'après immunofixation, la modification disparaît. Ceci peut s'expliquer aisément par la faible proportion d'acide sialique contenue dans la molécule de C3 (Figure 15).

#### \* Immunofixation

Afin d'être certain que les bandes observées sur les gels d'électrophorèse correspondent bien aux différents phénotypes de C3, il est réalisé une électrophorèse suivie d'une immunofixation. L'électrophorèse est effectuée comme précédemment, mis à part une dilution différente des échantillons que l'on dépose au 1/25° en agarose INDUBIOSE. A la suite de la migration de 4 heures à 250 volts, on étale sur la plaque un anticorps antiC3c (BEHRING), dilué au 1/6° dans du tampon phosphate contenant 3 % de PEG. On laisse incuber, dans une chambre humide, durant 1 heure à 37° puis 1 heure à température ambiante. La plaque est ensuite lavée pendant une nuit dans du chlorure de sodium à 9 g/l. Après séchage sous infra-rouges, on fixe les précipités antigène-anticorps du gel dans de l'acide acétique à 4 % pendant 2 minutes ; la plaque est ensuite colorée comme précédemment.

En comparant les plaques obtenues avec immunofixation et celles avec coloration directe, on constate que les bandes observées sont identiques sur les deux plaques, bien que plus nettes avec une dilution de l'échantillon au 1/25° lorsqu'on réalise l'immunofixation. Par contre, la bande située à 7,2 cm du dépôt obtenue avec coloration directe

n'apparaît pas sur la plaque traitée par l' Ac antiC3c, ce qui confirme que cette bande ne représente pas C3 mais sans doute la transferrine.

L'étude de 120 sérums a permis de détecter 77 formes S, 7 formes F et 35 formes FS. La fréquence du gène S apparaît donc de 80 %, celle du gène F de 20 %, ce qui est comparable aux résultats retrouvés dans la littérature (27).

### III - DISCUSSION

Il a été remarqué que les mobilités électrophorétiques, lors d'une migration en gel SDS-PAGE, sont identiques pour les deux variants les plus communs de C3, C3S et C3F (7). De même, après réduction des ponts disulfures entre les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  par du dithiothréitol (DTT), on constate que les PM apparents des deux chaînes de C3 sont semblables pour les deux types. Ces constatations confirment le fait que le polymorphisme réside au niveau d'une mutation d'un ou deux acides aminés seulement sur une des deux chaînes de C3.

D'autre part, l'activité des différents variants de la molécule de C3 a été étudiée (2) ce qui a permis de mettre en évidence une activité hémolytique approximativement identique chez tous les variants (16). Par contre, on sait

qu'il existe des différences fonctionnelles chez l'homme entre les deux phénotypes communs F et S dans la capacité à se fixer in vitro sur les cellules mononucléées (4).

Il est maintenant parfaitement reconnu que les personnes exprimant le gène F à l'état homozygote présentent une susceptibilité accrue devant certaines maladies.

\* **La Maladie de Berger** (41) est une glomérulonéphrite caractérisée par la présence en immunofluorescence de dépôts mésangiaux d'IgA prédominants ou exclusifs et par l'absence de signes extrarénaux. L'origine des IgA mésangiales et le mécanisme de leur dépôt restent en grande partie inconnus. Cette maladie touche essentiellement les enfants et les adultes jeunes et deux fois plus souvent l'homme que la femme. Elle est responsable d'environ 10 % des cas d'insuffisance rénale terminale. Le rôle des facteurs génétiques dans cette maladie est suggéré par la distribution géographique, l'existence de formes familiales et l'association de certains facteurs allotypiques. En effet, une association avec des allotypes nuls de la protéine C4 du complément et avec des allotypes particuliers des protéines C3 et B a été observée (44). Cette association évoque le rôle possible de la voie alterne du complément qui est normalement activée en particulier par les IgA agrégées. Au cours de la Maladie de Berger, cette activation pourrait conduire à la formation du MAC dans le mésangium (tissu intercapillaire séparant, dans le glomérule rénal, les différentes branches du bouquet de

vaisseaux capillaires). C3 pourrait également jouer un rôle dans le métabolisme et la localisation des agrégats d'IgA qui sont modifiés par le complément. L'allèle C3F serait associé à une activité accrue du composant C3. Sur les 120 sérums étudiés au cours de ce travail, sept formes F ont été détectées parmi lesquelles cinq provenaient de patients atteints d'insuffisance rénale ou de maladie de Berger.

\* Les autres sérums de phénotype F provenaient de patients atteints de **polyarthrite rhumatoïde**. BRONNESTAM (13) a pu mettre en évidence une association significative entre la présence du gène C3F et l'arthrite rhumatoïde. Il a été montré que le complément est impliqué dans le développement de lésions locales intra-articulaires au cours de l'arthrite rhumatoïde. La présence d'immuns complexes dans le liquide synovial active le système du complément. Cette activation entraîne chimiotactisme et phagocytose suivie du relargage des enzymes lysosomiales par les polynucléaires, ce qui contribue à l'inflammation tissulaire locale.

\* Certains auteurs ont mis en évidence une association entre le gène C3F et la survenue d'une **hypertension essentielle** (50, 37). Cette association pourrait être due à un "linkage" génétique entre le gène C3 et le trait pour l'hypertension essentielle. Là encore, une activité accrue de C3F, durant l'activation du complément, provoquant des lésions au niveau des membranes cellulaires et une augmentation de la perméabilité de l'endothélium, pourrait expliquer cette association.

De même, SORENSEN (52) retrouve une association significative entre le gène C3F, l'athérosclérose et l'hypertension. Ce type de C3 jouerait un rôle majeur, non seulement en tant que facteur de risque génétique, mais il pourrait également être fonctionnellement impliqué dans la pathogénie de la maladie. En effet, in vitro, le cholestérol et les athéromes lipidiques activent le complément qui agrègent alors les polynucléaires neutrophiles et provoquent des lésions au niveau des cellules endothéliales en culture.

Par contre, COOPER et Coll. (18) n'ont pu mettre en évidence aucune association significative entre un phénotype de C3 et l'apparition de crises d'éclampsie.

\* Après une étude sur des patients atteints de **maladies inflammatoires**, ELMGREEN et Coll. (23) ont conclu à une fréquence significativement plus élevée du gène C3F dans le cas de la Maladie de Crohn, alors que cette fréquence ne varie pratiquement pas dans le cas des colites ulcéraives. Dans ces processus d'inflammation chronique, on observe un hypercatabolisme de C3, entraînant une production accrue des produits de dégradation de C3 qui présentent des activités chimiotactiques, opsonisantes et anaphylatoxiques.

\* SRIVASTAVA (54) a relevé une association significative entre la présence du gène C3F et l'"**indian childhood cirrhosis**", cause majeure de mortalité infantile en Inde.

**FRACTIONNEMENT  
DE LA MOLECULE DE C3**

## INTRODUCTION

Le but du travail est de fractionner C3 en C3b afin d'étudier la relation entre le polymorphisme et les fonctions biologiques de C3.

La molécule de C3 est susceptible d'être dégradée, en dehors de l'action des convertases, par des protéases extrinsèques au système du complément, en particulier des protéases à sérine telles que la trypsine, l'élastase, la cathepsine G ou la plasmine (enzyme de la fibrinolyse).

La trypsine clive la molécule de C3 au niveau d'une liaison lysine 1001-histidine 1002 de la chaîne  $\alpha$  (20). Des études sur C3 purifié ont montré que le traitement de C3 par la trypsine dans des conditions bien définies (concentration de trypsine à 1 % P/P de C3 pendant 15 minutes à 37°C) permet d'obtenir la fragmentation de C3 au premier stade, à savoir C3a et C3b (42). Ceci a été contrôlé par électrophorèse verticale sur SDS-PAGE de C3, avant et après traitement, en présence de marqueurs de poids moléculaire.

On tente, dans un premier temps, de déterminer la concentration de trypsine capable du même résultat en milieu plasmatique, sachant que celui-ci contient lui-même des protéases à sérine capables de fractionner *in vivo* C3, des inhibiteurs de protéase, et surtout des protéines en quantité

variable selon les sérums et se comportant en substrats de la trypsine.

Dans un second temps, pour ne pas être soumis à l'action des protéases sériques, la mise en jeu d'une convertase sur C3 est étudiée. La C3 convertase clive C3 au niveau d'une liaison arginine-sérine, en position 748-749 sur la chaîne  $\alpha$  (38). On prépare donc en prenant comme support des hématies de mouton sensibilisées, une C3 convertase qui est mise au contact du plasma pendant des temps variables.

La coupure de C3 est ensuite étudiée par électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation, ainsi que par immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

## I - MATERIEL ET METHODE

### A - PURIFICATION DE C3

La purification de C3 est effectuée d'après la méthode décrite par TACK et Coll. (57).

## 1 - Précipitation des euglobulines

Le plasma humain citraté est incubé pendant 30 minutes à température ambiante, avec des inhibiteurs de protéases (DFP 5 mM ; EDTA 20 mM).

Les euglobulines sont ensuite précipitées par dialyse en tampon EDTA 8 mM pH 5,3, à +4° puis le précipité est lavé plusieurs fois en tampon EDTA 8 mM pH 5,3, extrait et dissous dans du tampon chlorure de sodium 0,15 mM ; EDTA 20 mM pH 7,2 ; DFP 5 mM.

## 2 - Chromatographie échangeuse d'ions sur colonne DEAE-SEPHACEL.

La fraction euglobulines est diluée dans de l'eau distillée jusqu'à obtention d'une conductivité de 1 millisiemens à 0°C puis déposée sur une colonne DEAE-SEPHACEL (60,2 cm x 2,6 cm) équilibrée en tampon TRIS 5 mM ; EDTA 5 mM ; pH 7,3. La colonne est lavée dans ce tampon jusqu'à obtention d'une absorbance nulle à 280 nm. L'élution est ensuite réalisée avec un gradient de chlorure de sodium (0 à 0,25 M). Des fractions de 5 ml sont collectées et l'élution des protéines est suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm. L'élution de C3 est suivie par immunodiffusion selon la méthode d'OUCHTERLONY. Le troisième pic d'absorbance à 280 nm correspond aux fractions enrichies en C3. Celles-ci sont regroupées puis dialysées contre un tampon chlorure de sodium 0,15 M ; EDTA 20 mM ; pH 7,2.

	GEL DE SEPARATION	GEL DE CONCENTRATION
Concentration en acrylamide	7,50%	3%
Acrylamide 30 % P/V N, N' méthylène bis acrylamide 0,8 % (P/V) (ml)	10	1
TRIS HCl 0,75 M pH 8,8 (ml)	20	-
TRIS HCl 1 M pH 6,8 (ml)	-	1,25
SDS 10 % (P/V) (ml)	0,4	0,1
Persulfate d'ammonium 1 % (P/V) (ml)	1	0,4
H <sub>2</sub> O (ml)	8,6	7,5
TEMED (μl)	10	10

TABLEAU V : COMPOSITION DES GELS DE SEPARATION ET DE CONCENTRATION

### 3 - Chromatographie sur colonne de phénylsépharose

La fraction enrichie en C3 est purifiée par une chromatographie sur phénylsépharose. Le dépôt s'effectue sur une colonne (30 cm x 2,6 cm) équilibrée en tampon chlorure de sodium 0,15 M ; EDTA 20 mM ; pH 7,2. Le premier pic d'absorbance à 280 nm contient la majorité des impuretés. C3 est retardé et forme le second pic d'absorbance à 280 nm. L'éluat est concentré jusqu'à 1 mg/ml. (Membrane AMICON PM10).

### 4 - Contrôle par électrophorèse en SDS.PAGE.

L'éluat de C3 est contrôlé par électrophorèse en gel de polyacrylamide (7,5 %) en présence de SDS. La séparation des chaînes polypeptidiques se fait selon leur poids moléculaire. Ceci permet de renseigner sur l'intégrité de C3 et la présence éventuelle de protéines contaminantes. Le gel de séparation est coulé entre deux plaques de verre verticales (16 cm X 18 cm) fixées sur un support. Quelques millilitres d'alcool isoamylique saturé en eau sont déposés à la surface du gel pour obtenir une surface plane et le gel polymérise à l'abri de l'air. Le gel de concentration est ensuite coulé. Les compositions des gels de séparation et de concentration sont reportées dans le tableau V.

L'échantillon protéique (C3) est dilué en tampon d'électrophorèse (TRIS 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 0,1 %). Les échantillons non réduits sont traités par de l'iodoacétamide (alkylant) pendant une heure à 37°C, puis du bleu de

bromophénol est ajouté. Les échantillons réduits sont traités par du DTT, réducteur, pendant une heure à 37°C, puis par de l'iodoacétamide pendant 20 minutes à 37°C. 10µg de protéines sont déposés par puits.

La migration s'effectue en deux temps : concentration à 80 mA, puis séparation à 40 mA dans du tampon électrophorèse (TRIS 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 0,1 %). La coloration est ensuite effectuée avec un mélange bleu de Coomassie 0,25 % (V/V) / acide acétique 9 % (V/V) / éthanol 45 % (V/V) pendant 20 minutes, puis le gel est décoloré pendant 48 heures dans un mélange acide acétique 7,5 % (V/V) / éthanol 5 % (V/V).

Le rendement de cette méthode de purification est assez faible en raison des chromatographies successives et des différentes étapes de précipitation et de dilution, responsables d'une perte importante de C3.

#### **B - TRAITEMENT DE C3 PURIFIÉ PAR LA TRYPSINE**

C3 purifié est incubé avec de la trypsine de pancréas bovin type XIII (T8642) SIGMA. La trypsine est diluée dans un tampon PBS (NaCl 13 mM ; KCl 2,7 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhydre) 8 mM ; pH 7,2), et conservée à -20°C en aliquots de 500 µl. Une quantité de trypsine correspondant à 1% P/P de C3 est incubée avec C3 purifié pendant 15 minutes à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par du SBTI (SoyBean Trypsin Inhibitor T9003 type I-S SIGMA), ajouté en molarité deux fois

plus importante que la trypsine et incubé pendant 5 minutes à 37°C. Le SBTI est dilué en eau distillée et conservé à -20°C en aliquots de 500 µl.

#### **C - TRAITEMENT DU PLASMA PAR LA TRYPSINE**

Le plasma est traité par une quantité de trypsine correspondant à 3 % P/P de protéines (on considère le poids de protéines contenues dans le plasma environ égal à 60 g/l). Le SBTI est ajouté en molarité deux fois plus importante que la trypsine. Le plasma est incubé 15 minutes à 37°C avec la trypsine ; la réaction est ensuite stoppée par addition de SBTI et incubation du mélange pendant 5 minutes à 37°C.

#### **D - ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE A HAUT VOLTAGE SUIVIE D'IMMUNOFIXATION**

Les fragments de C3 obtenus sont analysés par une électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation.

Les tampons sont les mêmes que ceux utilisés pour le phénotypage ; la préparation et l'utilisation des deux types d'agarose (LITEX HSA 1% ; INDUBIOSE 1 %) sont également identiques. Seule la quantité de gélose coulée par plaque est différente puisque les plaques utilisées sont de plus grande taille.

## **1 - Préparation des gels d'agarose**

Une plaque en verre de 12,5 cm x 10 cm est recouverte avec 27,5 ml d'agarose LITEX HSA 1 % en tampon gel, ce qui permet d'obtenir une épaisseur de gel de 3,4 mm. Après gélification par passage à +4°C, on réalise quatre puits rectangulaires de 1 cm x 0,1 cm à 1,5 cm du bord de la plaque.

## **2 - Dilution des échantillons et dépôts**

Les échantillons traités sont dilués au 1/25<sup>e</sup> dans de l'agarose INDUBIOSE 1 %, à 42°C, juste avant le dépôt. On dépose 25 µl de plasma dilué dans chaque puits, du côté cathodique.

## **3 - Migration**

La migration s'effectue à 310 volts (25 V/cm) pendant quatre heures dans une cuve d'électrophorèse thermostatée à +4°C (LKB). Une plaque de verre anticondensation est déposée sur chaque plaque d'agarose afin d'éviter l'évaporation de la gélose sous l'effet du haut voltage. L'intensité de la migration est d'environ 30 mA par plaque.

## **4 - Immunofixation**

Une fois la migration terminée, on réalise une immunofixation avec un anticorps antiC3c (BEHRING). L'Ac

antiC3c est dilué au 1/2 dans du tampon phosphate 1 M (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre 0,61 M ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhydre 0,39 M ; pH 7,0) contenant 3 % de polyéthylèneglycol (PEG). L'Ac est déposé en nappe sur la plaque et cette dernière est ensuite incubée en chambre humide pendant une heure à 37°C puis pendant une heure à température ambiante.

## 5 - Révélation

La plaque est lavée durant une nuit dans du chlorure de sodium 9 g/l puis séchée sous infrarouges. On réalise une fixation en acide acétique à 4 % (V/V) pendant 2 minutes. Enfin, la plaque est colorée de la même manière que pour le phénotypage.

## E - PREPARATION D'UNE C3 CONVERTASE (34)

### 1 - Réactifs

#### \* tampon VBS (Véronal Buffered Saline)

- chlorure de sodium.....0,72 M
  - véronal sodé.....0,025 M
- pH 7,5 ; conservation 15 jours à +4°C

**\* tampon DGVB++**

- gélatine...0,05 % (P/V)
- glucose....2,5 % (P/V)
- chlorure de sodium.....72 mM
- véronal sodé..... 2,5 mM
- chlorure de magnésium.... 0,5 mM
- chlorure de calcium..... 2,1 mM

conservation 2 jours à +4°C

**\* tampon DGVB++ - nickel**

- chlorure de nickel 0,1 M 0,25 % (V/V)  
en DGVB++

**2 - Préparation d'un sérum déplété en C3**

Un pool de sérums humains normaux est incubé avec du DiAminoPropane (DAP) 5 mM, du chlorure de magnésium 0,1 M et de l'inuline pendant 1 heure 40 à 30°C, en agitant régulièrement toutes les dix minutes. Le DAP dissocie C1 de manière réversible et empêche ainsi l'activation de la voie classique (61). L'inuline active la voie alterne ; le chlorure de magnésium est indispensable au fonctionnement de la voie alterne. Il est nécessaire de travailler sur sérum car, sur plasma, l'EDTA, en complexant les ions calcium et magnésium, bloque les voies classique et alterne. Après incubation, le mélange est centrifugé à froid, à 3500 g pendant 10 minutes, puis le surnageant est filtré sur filtre SARTORIUS 2 µm. On obtient ainsi du sérum humain déficitaire en composant C3 (HUR3) qui est aliquoté et congelé à -80°C.

### 3 - Préparation de la C3 convertase

Les préparations d'hématies s'effectuent en tubes à centrifuger (type SORVALL) parfaitement propres pour éviter l'influence de traces de détergents

a - Préparation des hématies de mouton ( $10^9$  cellules par millilitres)

5 ml d'hématies de mouton BIOMERIEUX sont lavés en tampon DGVB++ et ajustés à  $10^9$  cellules par millilitre (C/ml). Pour obtenir une préparation d'hématies à  $10^9$  C/ml, 0,5 ml d'hématies + 7 ml d'eau distillée correspondent à une densité optique (DO) de 0,7 à 541 nm. Cette préparation d'hématies peut se conserver une semaine à +4°C.

b - Sensibilisation des hématies de mouton par du sérum de lapin antihématies de mouton (hémolysine).

5 ml d'hématies à  $10^9$  C/ml sont incubés avec 5 ml de DGVB++ et 10  $\mu$ l d'hémolysine PASTEUR, pendant 15 minutes, au bain-marie à 37°C. Le mélange est centrifugé, à +4°C, pendant dix minutes, à 1500 g. Les hématies sont ensuite lavées deux fois en DGVB++ et le culot est repris par 5 ml de DGVB++. On obtient ainsi des hématies sensibilisées (EA) à  $10^9$  C/ml. Cette préparation peut se conserver 24 heures à +4°C.

c - Préparation de la C3 convertase fixée sur les hématies sensibilisées (EAC<sub>1420X</sub>)

**\* Oxydation de l'HUR3**

1 ml de HUR3 est oxydé par incubation pendant 10 minutes dans la glace avec 100  $\mu$ l d'un mélange iode 10 mM ; iodure de potassium 2 M. Ce traitement préalable entraîne l'oxydation du composant C2. L'iode réagit avec un groupement thiol libre de C2, entraînant une augmentation de l'activité hémolytique (43).

**\* Préparation des EAC<sub>1420X</sub>**

1 ml de HUR3 oxydé est incubé avec 1 ml d'hématies sensibilisées à  $10^9$  C/ml et 4 ml de DGVB++ pendant 30 minutes précises dans la glace ce qui permet la fixation de C1, C4b et C2a sur les hématies. La préparation est ensuite centrifugée à +4°C, pendant 10 minutes, à 1500 g et lavée une fois en DGVB++. Le culot est repris par 1 ml de DGVB++ - nickel, le nickel permettant de stabiliser la C3 convertase. On obtient donc une C3 convertase fixée sur des hématies sensibilisées.

**F - FRACTIONNEMENT DE C3**

On incube 10  $\mu$ l de plasma avec 60  $\mu$ l de EAC<sub>1420X</sub>, à 37°C, pendant des temps variables. Les échantillons sont ensuite centrifugés à froid, pendant 10 minutes, à 1500 g. La coupure de C3 est alors étudiée par :

- Immunoélectrophorèse bidimensionnelle de C3 : On dépose directement 10  $\mu$ l de la préparation.

- Electrophorèse en gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation selon la méthode décrite ci-dessus. Les échantillons sont dilués au 1/2 dans la gélose INDUBIOSE 1 % et le dépôt est de 25  $\mu$ l pour chaque échantillon.

#### **G - IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DE C3.**

La technique correspond à la mise en oeuvre successive d'une électrophorèse en gel d'agarose suivie d'une électroimmunodiffusion.

##### **1 - Préparation des plaques d'agarose**

14 ml d'agarose INDUBIOSE 1 % (P/V) en tampon de migration (Véronal acide 4,75 mM ; véronal sodé 28,5 mM ; glycine 90 mM ; TRIS 42,7 mM ; EDTA 10 mM ;  $\rho = 4 \cdot 10^{-3} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$  ; pH 8,8) sont coulés sur une plaque de verre de 10 cm x 10 cm, ce qui permet d'obtenir une épaisseur de gel de 1,4 mm. Après gélification de l'agarose par passage à +4°C, on perce quatre puits de quatre millimètres de diamètre à 2,4 centimètres du bord.

## **2 - Dilution des échantillons et dépôt.**

Les plasmas sont dilués au 1/7° dans du chlorure de sodium 9 g/l. 10 µl de plasma dilué sont déposés dans chaque puits du côté cathodique.

## **3 - Migration en première dimension**

La migration s'effectue à 200 volts pendant trois heures (20 V/cm) dans une cuve d'électrophorèse thermostatée à +4°C (BIORAD). Une plaque de verre anticondensation est disposée sur chaque plaque pour éviter l'évaporation de la gélose. L'intensité de la migration est d'environ 50 mA par plaque.

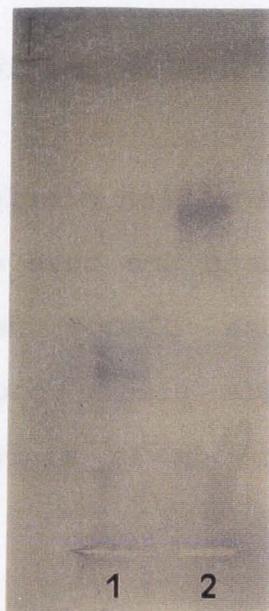
## **4 - Migration en deuxième dimension**

A l'aide d'un scalpel, on ne conserve sur la plaque que les bandelettes incluant la zone de migration. Par ailleurs, on ajoute, à une température de 56°C, 120 µl d'Ac antiC3c (BEHRING) à un tube de 14 ml de gélose INDUBIOSE 1 %. L'ensemble est ensuite réparti sur la plaque en recouvrant les bandelettes de la première migration.

On effectue une seconde migration perpendiculaire à la première, avec la même intensité de champ, 200 Volts pendant 2 heures.

2 - Direction des électrodes et dépôt.

Les plaques sont diluées au 1/10 dans du chlorure de sodium 0,9%. 10 ml de plasma dilué sont déposés dans chaque puits au côté cathodique.



4 - Migration en heures dimension

À l'aide d'un scalpel, on ne conserve sur la plaque que les bandes incluant la zone de migration. Par ailleurs, on ajoute à une température de 55°C, 120 µl d'acide (SILKING) à un tube de 14 ml de gelose (WUBIOLIS 1.4). L'ensemble est ensuite réparti sur la plaque en recouvrant les bandes de la première migration.

FIGURE 16 : ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE A HAUT VOLTAGE DE C3 PURIFIE TRAITÉ PAR LA TRYPSINE

- 1 : C3 purifié
- 2 : C3 purifié traité par la trypsin

## 5 - Révélation

La plaque est lavée pendant une nuit dans du chlorure de sodium 9 g/l puis séchée sous infrarouges. Les protéines sont fixées pendant 2 minutes dans de l'acide acétique à 2 % (V/V) puis colorées pendant 5 minutes dans du bleu de Coomassie. Enfin, la plaque est décolorée par plusieurs bains dans une solution éthanol 30 % (V/V) / acide acétique 10 % (V/V).

## II - RESULTATS

### A - ACTION DE LA TRYPSINE

#### 1 - Traitement de C3 purifié par la trypsine

C3 obtenu après purification est traité par la trypsine (1 % P/P de C3) pendant 15 minutes à 37°C, puis par le SBTI pendant 5 minutes à 37°C. Dans ces conditions, le fragment obtenu a pu être identifié par électrophorèse verticale sur SDS-PAGE comme correspondant à C3b. En réalisant une électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation, C3 purifié, traité par la trypsine dans ces mêmes conditions, entraîne l'apparition d'une bande migrant à 6,7 cm du dépôt, correspondant à C3b et qui nous servira de référence pour comparer les plasmas (*Figure 16*).

## 2 - Traitement de plasmas par la trypsine

Le but est, dans un premier temps, d'obtenir, par traitement du plasma par la trypsine, un fragment migrant au même niveau que C3b en électrophorèse sur gel d'agarose. Il faut cependant ajuster la concentration différemment de C3 purifié, en raison des nombreuses protéines présentes dans le plasma et susceptibles d'agir avec la trypsine à la place de C3. On va donc faire jouer, d'une part la concentration de trypsine ajoutée au plasma, d'autre part le temps d'incubation ainsi que la température d'incubation.

### a - Variation de la quantité de trypsine

Des essais avec des quantités importantes de trypsine, à savoir 10 %, 25 % et 50 % P/P de protéines (avec une base de 60 g/l de protéines dans le plasma) montrent que C3 a été protéolysé en petits fragments non révélés par notre technique.

En utilisant de faibles quantités de trypsine (0,5 % et 1 % P/P de protéines), on retrouve C3 entier à l'électrophorèse.

La concentration la mieux adaptée paraît être une quantité de trypsine représentant 3 % P/P de protéines (toujours avec une base de 60 g/l de protéines plasmatiques). A cette concentration, on observe une série de bandes plus ou moins bien individualisées, se rapprochant de celles observées avec C3 purifié, dont en particulier une bande majeure située à 7,1 cm du dépôt.

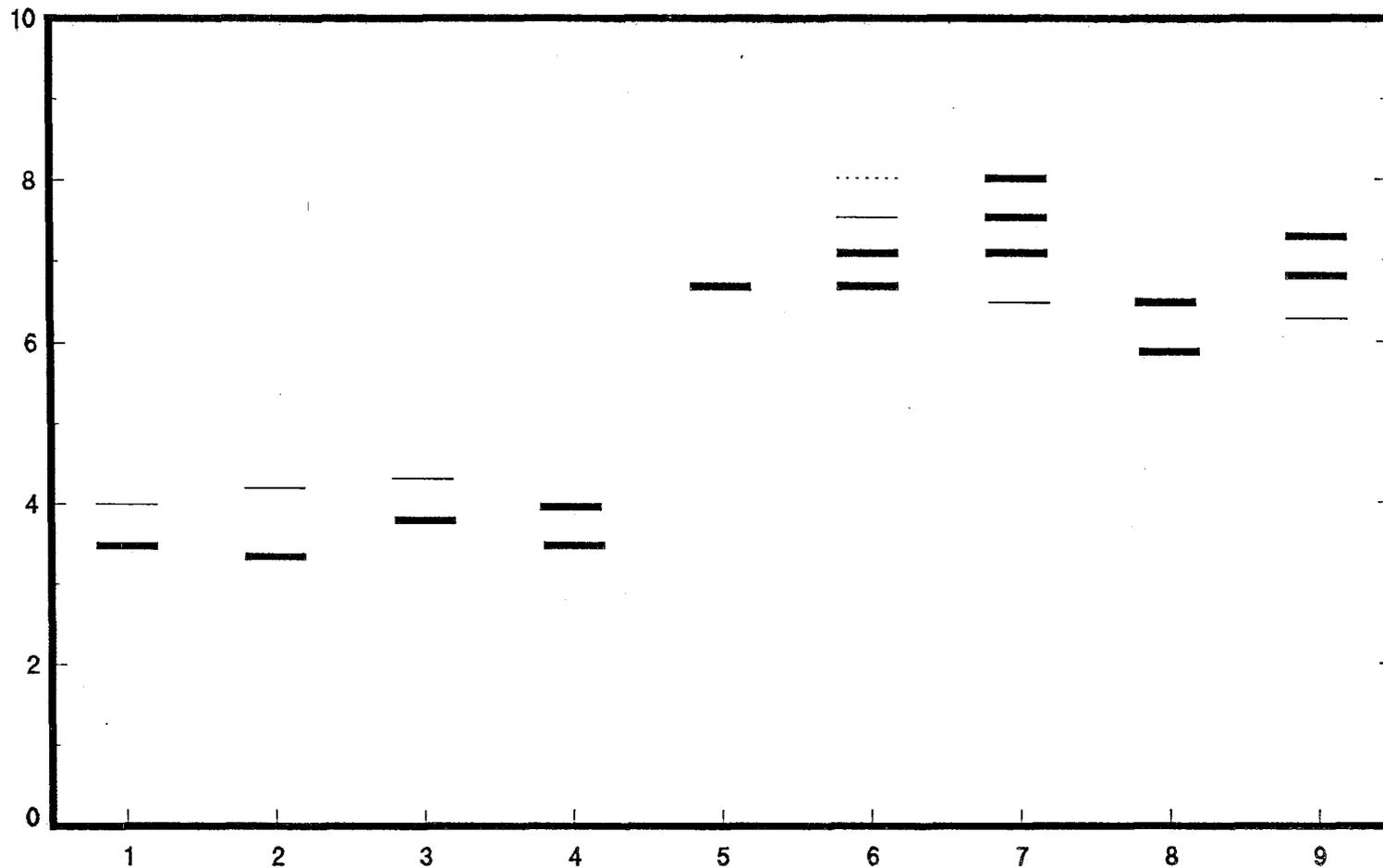


TABLEAU VI : COMPARAISON DE LA MIGRATION DES FORMES DE C3 EN ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE A HAUT VOLTAGE

- |                |                                       |
|----------------|---------------------------------------|
| 1 : C3 purifié | 5 : C3 purifié traité par la trypsine |
| 2 : C3S        | 6 : C3S traité par la trypsine        |
| 3 : C3F        | 7 : C3FS traité par la trypsine       |
| 4 : C3FS       | 8 : C3S traité par zinc et trypsine   |
|                | 9 : C3F traité par zinc et trypsine   |

*b - Variation de la température d'incubation*

Des essais de variations de la température d'incubation (20°, 30° et 37°) ont été effectués sur deux plasmas de phénotypes S et FS. On ne distingue aucune variation significative de la coupure en fonction de la température, aussi bien pour une forme que pour l'autre. On adopte donc une température d'incubation identique à celle utilisée pour C3 purifié, à savoir 37°C.

*c - Variation des temps d'incubation*

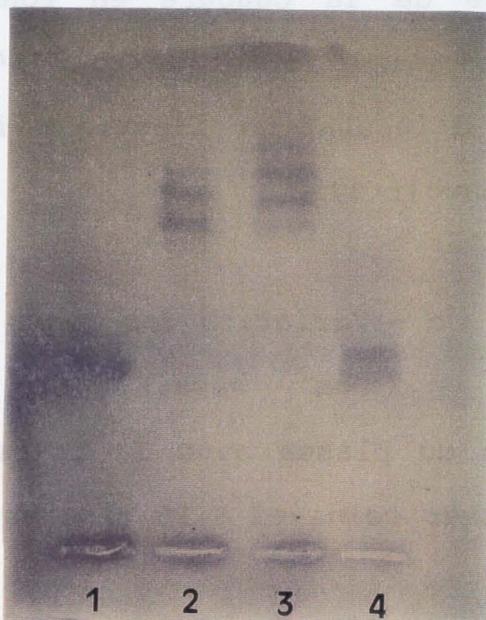
Des essais de variations du temps d'incubation du plasma avec la trypsine (15, 30, 45 mn), ont permis de fixer celui-ci à 15 minutes, comme pour C3 purifié.

*d - Incubation de plasmas S et FS.*

Les conditions de travail étant définies, on utilise alors des plasmas de donneurs différents. Les phénotypes choisis ici ont été S et FS, en raison d'une plus grande facilité d'obtention de ces deux types de C3.

En traitant ces deux plasmas dans les mêmes conditions, à savoir incubation avec de la trypsine en quantité équivalente à 3 % du poids de protéines (toujours estimé à 60 g/l dans le plasma) durant 15 minutes à 37°C, on ne note aucune variation sensible entre les deux formes S et FS de C3 (*Tableau VI*).

Pour la forme S, on observe deux bandes majeures, localisées à 6,5 cm et 7,1 cm du dépôt, et une bande



**FIGURE 17** : ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE A HAUT VOLTAGE DE C3S ET DE C3FS INCUBES AVEC DE LA TRYPSINE

- 1 : C3S non traité
- 2 : C3S traité par la trypsine
- 3 : C3FS traité par la trypsine
- 4 : C3FS non traité

mineure à 7,5 cm du dépôt. On peut également apercevoir une bande de très faible intensité à 8 cm du dépôt.

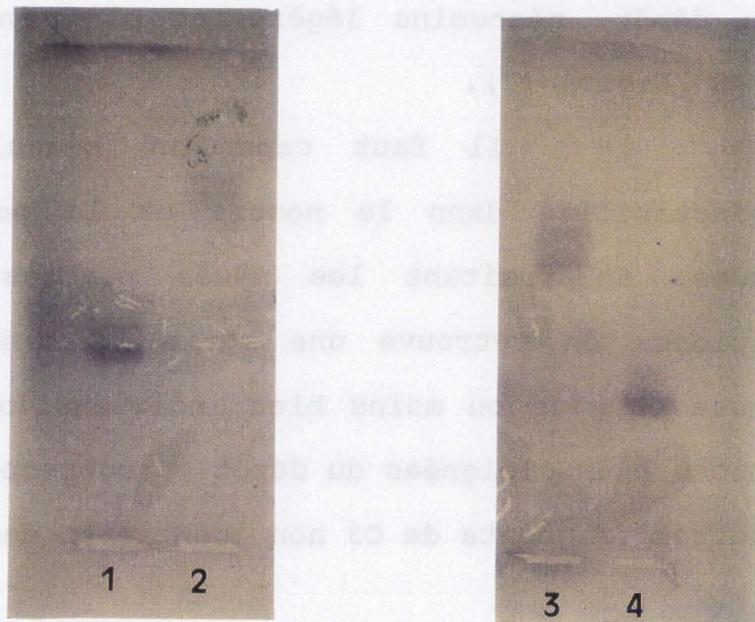
Pour la forme FS, on remarque la présence de deux bandes à 7,1 cm et 7,5 cm du dépôt, ainsi qu'une bande mineure à 6,5 cm du dépôt. Là encore, on aperçoit une bande à 8 cm du dépôt, néanmoins légèrement plus intense que pour la forme S (*Figure 17*).

Il faut cependant signaler un manque de reproductibilité dans le nombre et la position des bandes obtenues. En traitant les mêmes plasmas, dans les mêmes conditions, on retrouve une série de bandes plus ou moins intenses et plus ou moins bien individualisées, migrant à des positions plus éloignées du dépôt et correspondant probablement à d'autres fragments de C3 non identifiés dans cette étude.

### **3 - Traitement du plasma par le zinc et la trypsine**

En fonction de ces résultats, il nous a paru intéressant d'étudier l'action du zinc. Celui-ci possède la propriété d'inhiber la coupure de C3b en bloquant le facteur I (19). Le rôle de cette enzyme est de cliver C3b et/ou C4b, en présence de cofacteurs tels que la C4bp ou le facteur H, pour générer des fragments incapables de fixer le facteur B ou C3 et donc empêcher l'assemblage d'une convertase classique ou alterne. En présence de zinc, il n'y a donc pas de dégradation de C3b et celui-ci est présent en plus grande quantité.

En traitant par de la trypsine un plasma préalablement mis en contact avec du zinc, on observe une



**FIGURE 19** : ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE A HAUT VOLTAGE DE C3S ET DE C3F INCUBES EN PRESENCE DE ZINC ET DE TRYPSINE

- 1 : C3F non traité
- 2 : C3F traité par zinc et trypsine
- 3 : C3S traité par zinc et trypsine
- 4 : C3S non traité

dégradation de la molécule de C3 limitée à C3b. Les conditions définies sont les suivantes : concentration en zinc 3 mM ; trypsine 2,5 % P/P de protéines ; 15 minutes d'incubation à 37°C.

On compare deux plasmas de phénotypes C3F et C3S. Là encore, on ne peut observer aucune différence significative entre les deux formes de C3 (*Tableau VI*).

Pour le phénotype S, on note la présence de deux bandes à 5,9 cm et 6,5 cm du dépôt, alors que pour le phénotype F, on observe deux bandes à 6,8 cm et 7,3 cm, ainsi qu'une bande mineure à 6,3 cm du dépôt (*Figure 18*).

De nouveau, un manque important de reproductibilité gêne toute véritable interprétation, mais il paraît cependant n'y avoir aucune réelle différence, sur la majorité des essais effectués, entre la migration des fragments de C3F et S.

## **B - ACTION D'UNE C3 CONVERTASE SUR DU PLASMA**

### **1 - Vérification de l'efficacité de la C3 convertase**

On compare l'activité et le temps de décroissance d'une convertase simple avec une convertase dont C2 a été préalablement oxydé et avec une convertase stabilisée par l'adjonction de nickel (25). Chacune des convertases est

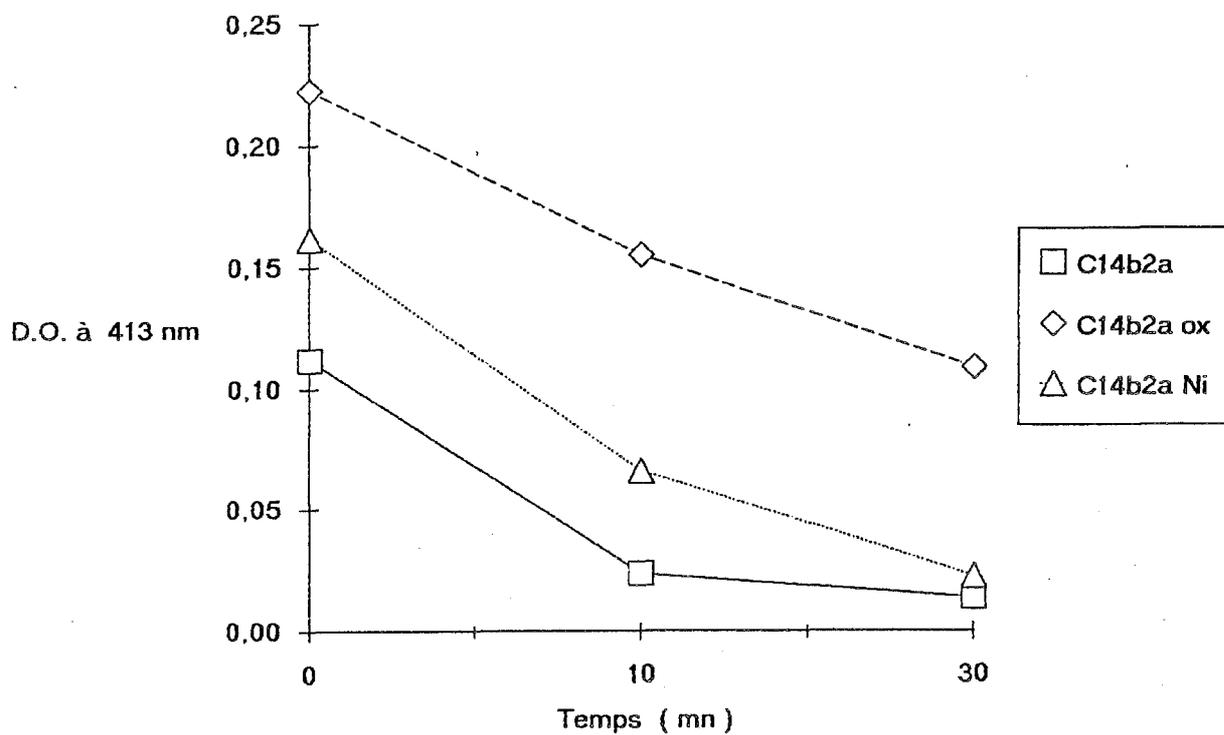


FIGURE 19

TEMPS (min)	C14b2a	C14b2a Oxydé	C14b2a Nickel
0	0,112	0,223	0,162
10	0,024	0,155	0,066
30	0,014	0,109	0,023

TABLEAU VII

VERIFICATION DE L'ACTIVITE DE LA C3  
CONVERTASE

incubée durant 0, 10 et 30 minutes à 37°C, puis on leur additionne du complément de cobaye en EDTA représentant la source des composants C3 à C9, avec lequel elles incubent durant 1 heure à 37°C. Après avoir centrifugé à +4°C, pendant 10 minutes, à 1500 g, on mesure la densité optique du surnageant à 413 nm, ce qui reflète la quantité d'hémoglobine libérée par les hématies lysées : on apprécie ainsi la décroissance de la convertase en fonction du temps. La DO est d'autant plus élevée que la convertase est abondante.

Plusieurs témoins sont nécessaires :

- Témoin 100 % lyse : le complément de cobaye est remplacé par la même quantité d'eau distillée.

- Témoin blanc : ce témoin est un indicateur de la lyse spontanée des hématies au cours du test. Le complément de cobaye est remplacé par la même quantité de tampon GVB-EDTA pour chaque temps (0, 10 et 30 minutes).

- Témoin coloration : ce témoin mesure l'absorbance apportée par le seul sérum de cobaye.

Pour chaque temps, on retranche les valeurs des témoins blancs et du témoin coloration à la valeur de DO obtenue. Les résultats sont reportés dans le *tableau VII*, ainsi que sur la *figure 19*.

\* Avec la C3 convertase simple, la décroissance est presque totale en 10 minutes, la pente de la droite entre 10 et 30 minutes étant très faible (0,012).

\* L'addition de nickel au tampon DGVB<sup>++</sup> permet de générer une quantité plus importante de C3 convertase puisque la DO au temps 0 est supérieure. D'autre part, le nickel permet de stabiliser la convertase car on constate que la décroissance est plus lente, la pente de la droite entre 10 et 30 minutes étant de 0,042.

\* L'oxydation de C2a par un mélange iode / iodure de potassium évite le phénomène de décroissance spontanée de C2 et permet également une stabilisation de la convertase. La pente entre 10 et 30 minutes est de 0,046 donc encore supérieure aux deux convertases précédentes. D'autre part, la quantité de convertase élaborée est également plus importante.

Par conséquent, l'oxydation de C2 permet d'obtenir une C3 convertase plus abondante et plus stable bien que la quantité de convertase produite reste néanmoins relativement faible.

## **2 - Incubation de plasmas C3S et C3F avec une C3 convertase**

La concentration d'hématies la mieux adaptée pour réaliser la C3 convertase est de  $10^9$  C/ml. En effet, en utilisant des hématies moins concentrées ( $10^8$  C/ml), le pourcentage de coupure obtenu est nettement plus faible.

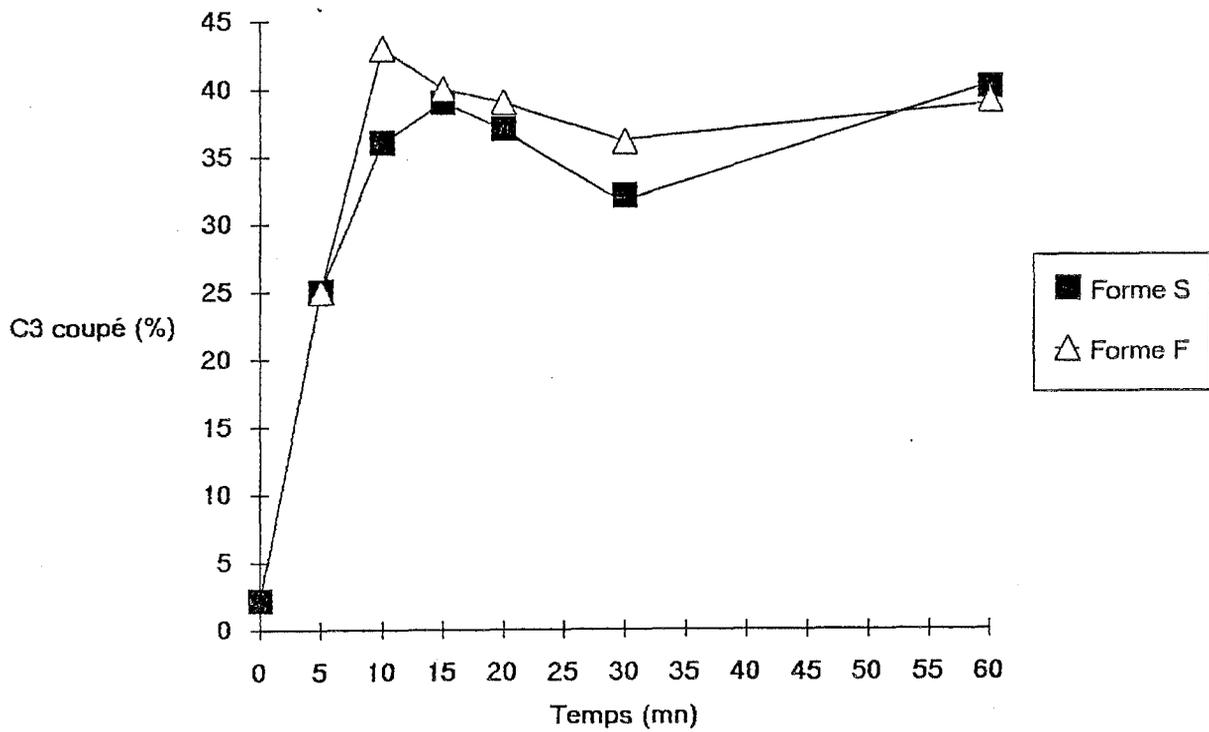


FIGURE 21

TEMPS (mn)	0	5	10	15	20	30	60
C3 coupé (%)							
S	2,2	25	36	39	37	32	40
F	—	25	43	40	39	36	39

TABLEAU VIII

POURCENTAGES DE C3 COUPE PAR RAPPORT A C3 NATIF

La convertase étant assemblée, on compare deux plasmas de formes F et S en les incubant avec la convertase durant des temps variables allant de 0 à 60 minutes. Après incubation, la dégradation des molécules de C3 est étudiée par migration en immunoélectrophorèse bidimensionnelle d'une part, et en électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation d'autre part.

Chacun des deux plasmas F et S est incubé à 37°C avec la C3 convertase pendant 0, 5, 10, 15, 20, 30 et 60 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à +4°C pendant 10 minutes, à 1500 g et le surnageant est étudié.

\* **En immunoélectrophorèse bidimensionnelle,** la dégradation est quantifiée par mesure de la surface des pics de C3 dégradé par rapport au C3 natif (*Figure 20*). La forme F se coupe plus rapidement que la forme S puisqu'à 10 minutes, 43 % de C3F sont dégradés contre 36 % de C3S. D'autre part, C3S se fragmente de manière moins importante. Les pics se situent à 43 % pour C3F et à 39 % pour C3S. Ce pic est atteint plus rapidement (10 minutes) pour la forme F que pour la forme S (15 minutes) (*Tableau VIII et Figure 21*).

Pour chacune des deux formes, le pic est suivi d'une décroissance puis d'une augmentation de C3 dégradé après 30 minutes. Or, la C3 convertase, en présence de nickel, ne reste théoriquement stable que pendant une vingtaine de minutes. Il se produit par conséquent une dégradation de C3 indépendante de l'action de la C3 convertase.

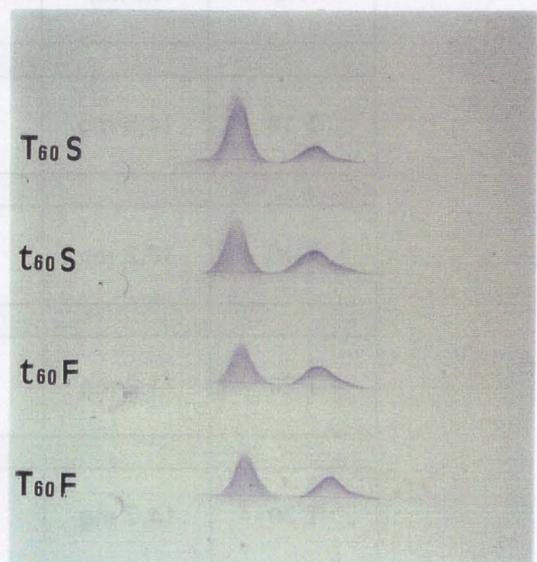
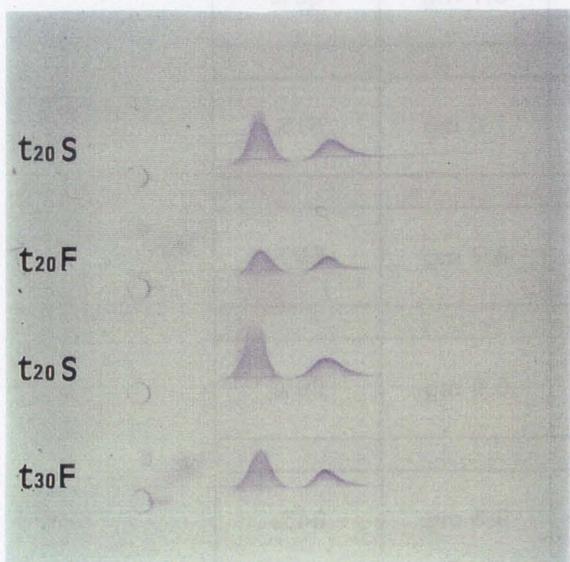
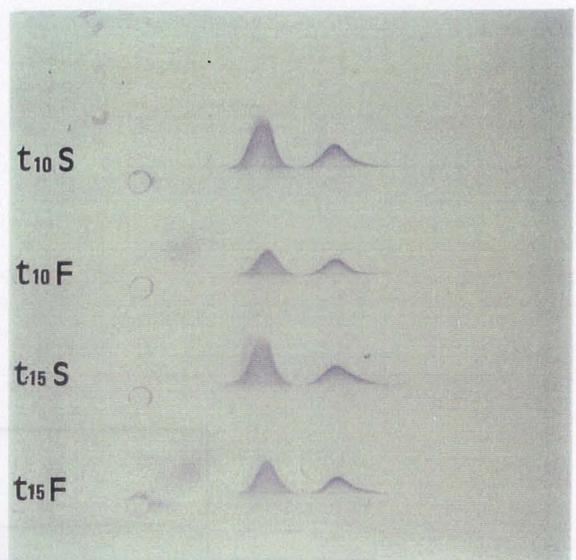
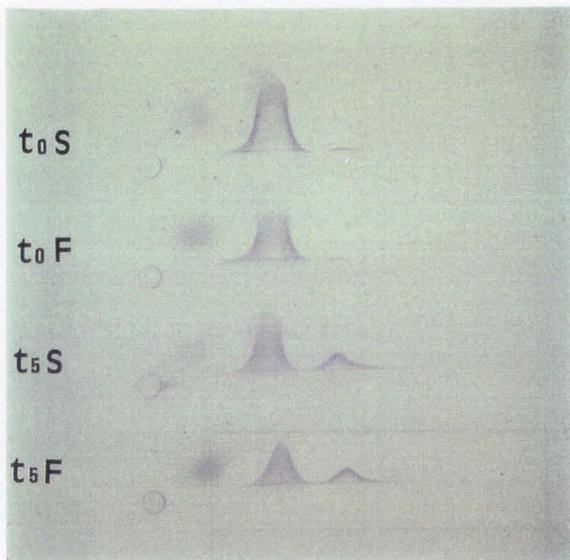


FIGURE 20 : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DE C3S ET DE C3F APRES INCUBATION AVEC UNE C3 CONVERTASE pendant 0 (t<sub>0</sub>), 5 (t<sub>5</sub>), 10 (t<sub>10</sub>), 15 (t<sub>15</sub>), 30 (t<sub>30</sub>) et 60 (t<sub>60</sub>) minutes et, en l'absence de C3 convertase, pendant 60 (T<sub>60</sub>) minutes

	S		F	
T 0	17,6 mg		14,7 mg	
T 5	15 mg	85%	8,7 mg	59%
T 10	14,5 mg	82%	7,5 mg	51%
T 15	13,2 mg	75%	8,7 mg	59%
T 20	11,2 mg	64%	5,8 mg	39%
T 30	14,7 mg	83%	9,5 mg	64%
T 60	17,5 mg	99%	11,9 mg	81%

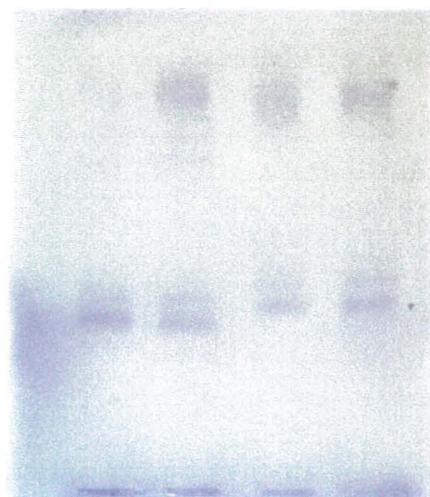
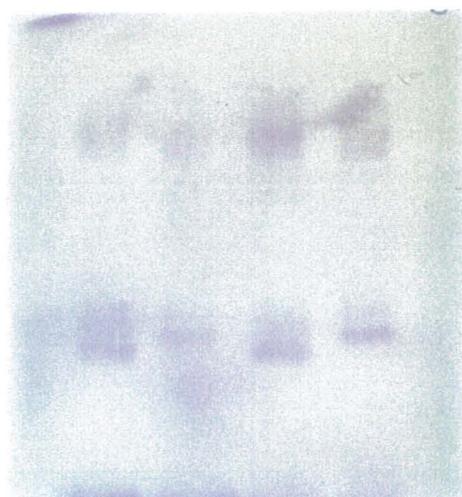
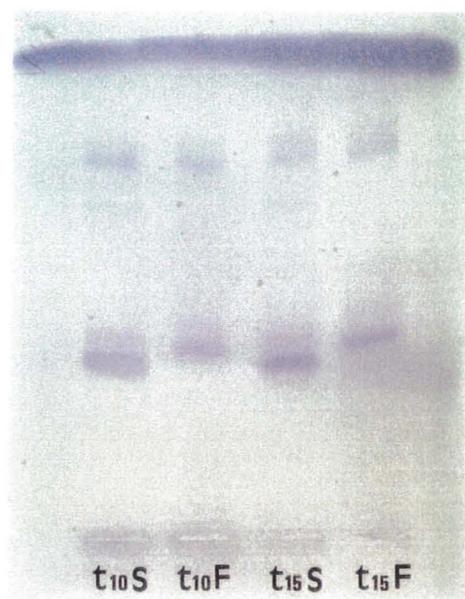
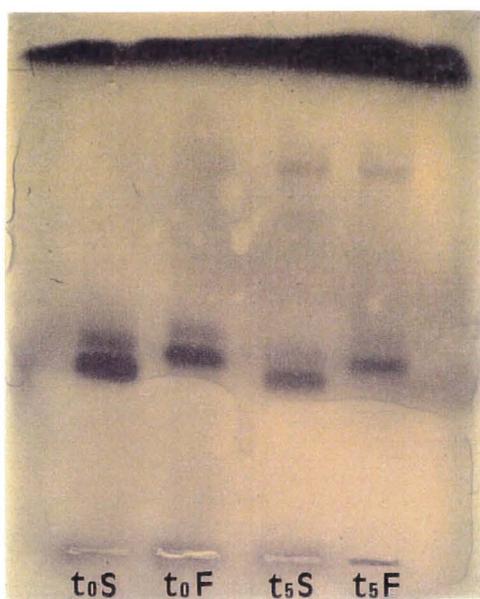
**TABLEAU IX : POURCENTAGES DE C3b RESTANT EN PHASE FLUIDE APRES COUPURE**

Enfin, on constate une variation dans la quantité totale de C3 restant dans le surnageant. Malgré l'erreur, on peut néanmoins supposer qu'une partie de C3 dégradé est restée fixée sur le support (hématies) et ceci de façon plus importante pour la forme F que pour la forme S.

La quantité totale de C3 (C3 dégradé + C3 natif restant dans le surnageant) est estimée par mesure de la surface des pics. La quantité de C3 obtenu au temps 0 étant fixée comme référence, on peut ainsi calculer, pour chaque temps d'incubation, le pourcentage de C3 restant dans le surnageant. Les résultats obtenus sont reportés dans le *tableau IX*. Au temps T20, une partie importante de C3F a disparu, puisqu'il ne reste que 39 % de la quantité de C3 de départ, alors que 64 % de C3S subsiste.

Pour les autres temps d'incubation, une quantité significativement plus importante de C3S persiste par rapport à la forme F. Une partie de C3 dégradé va donc se fixer ailleurs, probablement sur les hématies.

**\* En électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation, les résultats obtenus sont équivalents à ceux observés en immunoélectrophorèse bidimensionnelle. A T0, la coupure est trop faible pour pouvoir être visualisée. A T15, les deux formes F et S présentent une bande située à environ 7,8 cm du dépôt. Par contre, pour la forme S, une bande mineure supplémentaire apparaît à environ 6,8 cm du dépôt (Figure 22).**



t<sub>20</sub>S t<sub>20</sub>F t<sub>30</sub>S t<sub>30</sub>F

T<sub>60</sub>S t<sub>60</sub>S t<sub>60</sub>F T<sub>60</sub>F

FIGURE 22 : ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE A HAUT VOLTAGE SUIVIE D'IMMUNOFIXATION DE C3S ET DE C3F APRES INCUBATION AVEC UNE C3 CONVERTASE pendant 0 (t<sub>0</sub>), 5 (t<sub>5</sub>), 10 (t<sub>10</sub>), 15 (t<sub>15</sub>), 30 (t<sub>30</sub>) et 60 (t<sub>60</sub>) minutes et, en l'absence de C3 convertase, pendant 60 (T<sub>60</sub>) minutes

### 3 - Incubation de plasma C3S en l'absence de C3 convertase

Un plasma S est incubé pendant 60 minutes à 37°C avec du tampon DGVB++. On constate une dégradation de C3 comparable à celle obtenue en incubant les plasmas durant le même temps avec une C3 convertase (*Figure 23-24*).

Un plasma S est incubé à 37°C avec du chlorure de sodium 9 g/l pendant 60 minutes. Dans ces conditions, C3 natif reste intact et n'est pas dégradé.

Les ions calcium et magnésium contenus dans le tampon DGVB++ sont responsables de la coupure de C3 indépendamment de la convertase. L'EDTA contenu dans le prélèvement plasmatique ne se trouve pas en quantité suffisante pour capter le calcium et le magnésium. Ce phénomène nous permet d'expliquer la remontée observée sur la courbe pour des temps d'incubation supérieurs à 20 minutes.

Si l'on effectue les mêmes incubations dans les mêmes conditions, en ajoutant de l'EDTA 400 mM, C3 n'est pas dégradé. La C3 convertase nécessite donc la présence d'ions calcium et magnésium, non seulement pour se former, mais également au moment d'agir sur C3.

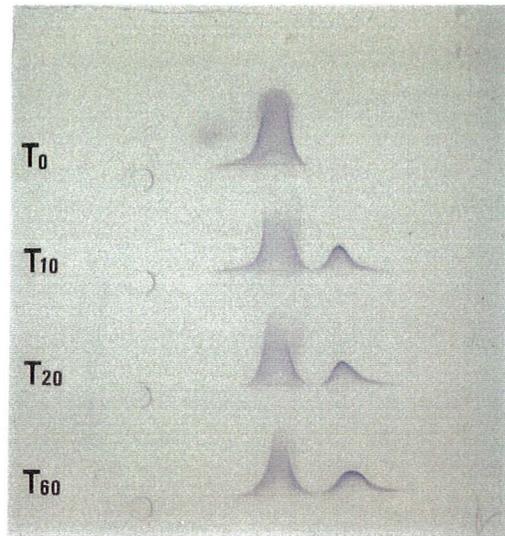


FIGURE 23 : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DE C3S APRES INCUBATION AVEC DU TAMPON DGVB<sup>++</sup> Ni pendant 0 (T<sub>0</sub>), 10 (T<sub>10</sub>), 20 (T<sub>20</sub>) et 60 (T<sub>60</sub>) minutes

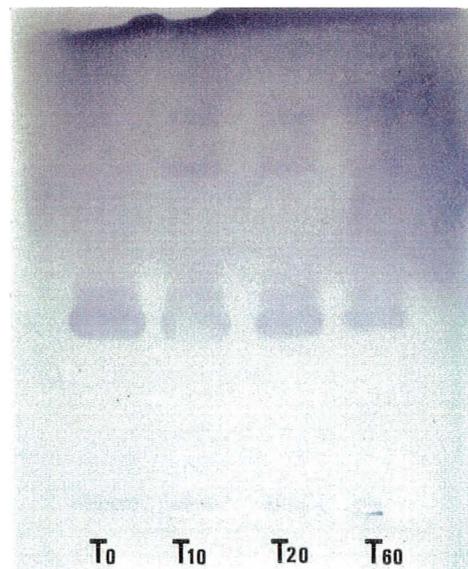


FIGURE 24 : ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE A HAUT VOLTAGE SUIVIE D'IMMUNOFIXATION DE C3S APRES INCUBATION AVEC DU TAMPON DGVB<sup>++</sup> Ni pendant 0 (T<sub>0</sub>), 10 (T<sub>10</sub>), 20 (T<sub>20</sub>) et 60 (T<sub>60</sub>) minutes

### III - DISCUSSION

#### A - TRAITEMENT DE C3 PAR LA TRYPSINE ET LE ZINC

\* Un point préalable important à souligner est le manque de reproductibilité. En effet, les mêmes plasmas traités dans les mêmes conditions de concentration en trypsine et SBTI, de durée et de température d'incubation, ne permettent pas d'obtenir les mêmes fragments de C3. Ceci est probablement dû à l'action même de la trypsine qui est une sérine protéase et, de ce fait, peut agir sur un grand nombre de protéines présentes dans le milieu et ceci de façon totalement aléatoire. D'autre part, dans le plasma existent, à l'état physiologique, des inhibiteurs des protéases qui pourront également interférer dans l'action de la trypsine. Toutes ces interactions sont imprévisibles et non modulables in vitro. C'est la raison pour laquelle, lorsque l'on travaille avec C3 purifié, on observe une bande parfaitement bien localisée et reproductible, alors que si l'on travaille sur plasma, les résultats obtenus sont beaucoup plus difficiles à interpréter.

\* On peut constater que, plus on augmente la concentration en trypsine, plus un nombre important de bandes apparaît, migrant en direction de l'anode, aussi bien pour les phénotypes S que FS. Les protéines migrant ici en partie en

fonction de leur PM, on peut penser qu'il s'agit de fragments de C3 de plus en plus petits.

\* La comparaison de la migration des formes S et FS, après traitement par la trypsine 3 % P/P de protéines, pendant 15 minutes à 37°C, permet de supposer que les bandes majeures obtenues, pour chacun des deux phénotypes, pourraient peut-être correspondre à C3b, puisque leur migration se rapproche beaucoup de celle obtenue avec C3 purifié traité par la trypsine. La différence de migration obtenue entre les deux phénotypes pourrait être due au polymorphisme existant entre les deux formes de C3.

\* La comparaison des phénotypes F et S permet d'individualiser deux bandes pour chaque phénotype, les bandes correspondant à C3F étant décalées vers l'anode par rapport à celles correspondant à C3S. Là encore, cette variation pourrait s'expliquer par la seule différence polymorphique existant entre les deux formes.

#### **B - TRAITEMENT DE C3F ET C3S PAR UNE C3 CONVERTASE**

\* En électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation, il apparaît, pour C3S, une bande supplémentaire située plus près du dépôt par rapport à la bande commune aux deux formes de C3. Etant située plus près du dépôt, on pourrait supposer que cette bande représente un fragment de C3 de PM plus important et donc aller dans le sens

d'une dégradation moins rapide de C3. Cependant, il faut signaler que cette bande très mineure apparaît, pour la forme S, quel que soit le temps d'incubation, alors que théoriquement, plus on incube longtemps, plus la dégradation du C3 sera importante et les fragments mis en évidence plus petits.

La seconde hypothèse qui paraît plus plausible et qui a été déjà évoquée lors de la coupure par la trypsine, expliquerait la présence de cette bande supplémentaire simplement par l'existence du polymorphisme génétique entre les formes F et S. Ce polymorphisme, qui existe pour C3 natif, est situé, comme nous l'avons vu précédemment, au niveau de la chaîne  $\beta$ . Cette chaîne  $\beta$  n'est pas touchée lors de la fragmentation de C3, puisque C3b ainsi que C3c conservent une chaîne  $\beta$  identique à celle de C3 natif. Dans ces conditions, il nous est impossible de conclure à une quelconque variation dans la dégradation des deux formes de C3 sur la seule interprétation de l'électrophorèse en gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation.

De même, la variation d'intensité des bandes pourrait n'être due qu'à une différence de concentration en C3 dans le plasma de départ.

**\* Sur immunoélectrophorèse bidimensionnelle,** malgré l'erreur due à l'estimation de la surface des pics, on peut néanmoins constater l'existence d'une différence dans le pourcentage de C3 dégradé provenant des deux phénotypes S et F.

Le phénotype F présente une coupure plus rapide et quantitativement plus importante. De plus, il

subsiste dans le surnageant, après traitement, une quantité plus faible de C3 ce qui laisse supposer une variation entre les deux phénotypes au niveau de la fixation à l'accepteur. Il est probable qu'une partie de C3b généré se fixe sur les hématies sensibilisées et ne soit donc pas décelable en électrophorèse sur gel d'agarose ou en immunoélectrophorèse bidimensionnelle. Ces résultats aiguillent plutôt vers une différence de fonction entre C3F et C3S au niveau de la fixation à l'accepteur.

Cette différence de fonction pourrait s'expliquer par une variation au niveau de quelques acides aminés seulement. C3F présente, par rapport à C3S, un résidu glycine neutre à la place d'un résidu arginine chargé positivement. La forme F est donc susceptible de se fixer préférentiellement sur des groupements aminés alors que la forme S aura une fixation préférentielle sur les groupements hydroxyles. Ceci permettrait peut-être d'expliquer la fixation plus importante de C3bF sur les hématies sensibilisées, probablement au niveau des Ac puisque COLTER et ALPER n'ont relevé aucune différence dans les fonctions hémolytiques de chacune des deux formes. De plus, les globules rouges présentent des résidus hydroxyles. Par contre, les immunoglobulines présentent des résidus aminés avec lesquels C3F agira de manière préférentielle ce qui explique sa fixation sur les hématies sensibilisées. D'autre part, les capsules polysaccharidiques des bactéries étant relativement riches en groupements hydroxyles, C3S se fixera de manière plus importante entraînant une meilleure activité bactéricide.

Le même phénomène se produit pour les variations allotypiques du composant C4. Les différents allotypes présentent une variation de quelques acides aminés suffisante pour entraîner une différence de fixation aux groupements aminés et hydroxyles et, par conséquent, une différence au niveau de la solubilisation des complexes immuns ainsi que du pouvoir bactéricide.

Enfin, il faut signaler que le polymorphisme se situe apparemment uniquement au niveau de la chaîne  $\beta$ . Or, la plupart des domaines fonctionnels de la molécule de C3, en particulier la région intervenant dans la fixation aux accepteurs ainsi qu'aux récepteurs du complément, est localisée sur la chaîne  $\alpha$  (10). L'influence du polymorphisme sur la fixation de la molécule de C3 interviendrait donc plutôt au niveau de la structure quaternaire de la molécule ou par l'intermédiaire de sites de fixation accessoires (11).

**CONCLUSIONS  
ET  
PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus montrent une différence fonctionnelle entre les deux phénotypes. Cette différence peut se manifester à trois niveaux:

- Vitesse de dégradation et/ou quantités de C3 dégradé différentes.

- Différence de fixation de C3b à un accepteur.

- Différence de fixation de C3b au récepteur.

\* C3F est dégradé de manière plus rapide et en quantité plus importante que C3S. Cette différence est de l'ordre de 3 % ce qui est trop faible pour être réellement significatif. Des études ultérieures ont été effectuées en utilisant comme support des bactéries (*Escherichia coli* C600) à la place des hématies sensibilisées. Les résultats obtenus tendent à confirmer l'existence d'une variation dans la vitesse de dégradation de C3 entre les deux types.

\* Si l'on étudie la fixation de C3b à un accepteur, la différence apparaît plus significative. C3F est retrouvé en quantité nettement plus faible en phase fluide que C3S. Une plus grande partie de C3bF se fixe donc sur les hématies sensibilisées probablement en raison d'une meilleure affinité de C3F pour les groupements aminés présentés par les immunoglobulines fixées sur les hématies. Cette différence d'affinité représente environ 25% et est due à la variation d'un acide aminé de charge différente entre les deux formes de C3.

Des études ultérieures ont été effectuées en observant la fixation de C3b de chacune des deux formes sur des

billes de SEPHADEX. C3b fixé sur les billes est ensuite relargué par de l'hydroxylamine. Là encore, ces études viennent confirmer les résultats obtenus précédemment puisque l'on retrouve une différence de dégradation en phase fluide de l'ordre de 10 % en faveur de C3F ainsi qu'une différence de relargage de C3b fixé d'environ 10 % également en faveur de C3F.

\* Il serait intéressant, dans un troisième temps, d'étudier la fixation de C3b à son récepteur CR1, en dosant la quantité de récepteurs avant et après incubation avec chacune des deux formes de C3b.

Le polymorphisme pourrait influencer, non pas en raison de la simple variation d'un acide aminé sur la chaîne  $\beta$  mais peut-être également par une différence d'encombrement stérique puisque tous les sites fonctionnels de C3 se situent sur la chaîne  $\alpha$  de la molécule .

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. ALPER C.A., AZEN E.A, GESERICK G., GOEDDE H.W., RITTNER C., TEISBERG P., WIEME R. (1973)  
Statement on the polymorphism of the third component of complement in man.  
Vox sanguinis, 25, 18-20.
2. ALPER C.A., PROPP R.P. (1968)  
Genetic polymorphism of the third component of human complement (C3').  
J.Clin.Invest., 47, 2181-2191.
3. ARLAUD G.J., COLOMB M.G., GAGNON J. (1987)  
A functional model of the human C1 complex.  
Immunol.today, 8, 4, 106-111.
4. ARVILOMMI H. (1974)  
Capacity of complement C3 phenotypes to bind on to mononuclear cells in man.  
Nature, 251, 740-741.
5. AZEN E.A., SMITHIES O. (1968)  
Genetic polymorphism of C'3 ( $\beta_{10}$ -globulin) in human serum.  
Science, 162, 905-907.
6. BARNUM S.R., FEY G., TACK B.F. (1990)  
Biosynthesis and genetics of C3.  
In : "The third component of complement", (LAMBRIS J.D. Ed.), Springer-Verlag, pp 23-44.
7. BEHRENDT N. (1985)  
Human complement component C3 : characterization of active C3S and C3F, the two common genetic variants.  
Mol. imunol., 22, 1005-1008.
8. BEHRENDT N., HANSEN O.C., PLOUG M., BARKHOLT V., KOCH C. (1987)  
Localization and functional significance of a polymorphic determinant in the third component of human complement.  
Mol. Immunol., 24, 1097-1103.
9. BITTER-SUERMAN D., BURGER R. (1990)  
C3 deficiencies.  
In : "The third component of complement", (LAMBRIS J.D. Ed.), Springer Verlag, pp 223-234.

10. BOKISCH V.A., DIERICH M.P., MÜLLER-EBERHARDT H.J. (1975)  
Third component of complement (C3) : structural properties in relation to functions.  
Proc.nat.acad.sci.USA, 72, 6, 1989-1993.
  
11. BOTTO M., FONG K.I., SO A.K., KOCH C., WALPORT M.J. (1990)  
Molecular basis of polymorphism of human complement component C3.  
J.exp.med., 172, 1011-1017.
  
12. BOTTO M., FONG K.Y., SO A.K., RUDGE A., WALPORT M. (1990)  
Molecular basis of hereditary C3 deficiency.  
J. clin. invest., 86, 1158-1163.
  
13. BRÖNNESTAM R. (1973)  
Studies of the C3 polymorphism : relationship between C3 phenotypes and rheumatoid arthritis.  
Hum. hered., 23, 206-213.
  
14. CHARLIONET R., DAVRINCHE C., RIVAT C. (1985)  
Subtypes of the human complement component C3 revealed by isoelectric focusing in immobilized pH gradients.  
Electrophoresis, 6, 423-427.
  
15. COLTEN H.R. (1986)  
Genetics and synthesis of components of the complement system.  
In : "Immunobiology of the complement system", (Ross J.F. Ed.), Academic press INC, pp 163-181.
  
16. COLTEN H.R., ALPER C.A. (1972)  
Hemolytic efficiencies of genetic variants of human C3.  
J. of immunol., 108, 5, 1184-1187.
  
17. COOK J., FISCHER E., BOUCHEIX C., MIRSRAHI M., JOUVIN M.H., WEISS L., JACK R.M., KAZATCHKINE M.D. (1985)  
Mouse monoclonal antibodies to the human C3b receptor.  
Mol.immunol., 22, 5, 531-539.
  
18. COOPER D.W., DEANE E.M., MARSHALL P., GALLERY E.D.M. (1988)  
C3 allotypes in pregnancy hypertension and eclampsia.  
Hum.hered., 38, 52-55.
  
19. DAY A.J., SIM R.B. (1986)  
Inhibitory effects of Zn<sup>2+</sup> ions on the degradation of the complement activation fragment C3b.  
14th meeting oxford, 14, 73-74.

20. DE BRUIJN M.H.L., FEY G.H. (1985)  
Human complement component C3 : cDNA coding sequence and derived primary structure.  
Proc.nat.acad.sci.USA, 82, 708-712.
21. DIERICH M.P., SCHULZ T.F., EIGENTLER A., HUEMER H., SCHWÄBLE W. (1988)  
Structural and functional relationships among receptors and regulators of the complement system.  
Mol. Immunol., 25, 11, 1043-1051.
22. EINSTEIN L.P., HANSEN P.J., BALLOW M., DAVIS A.E., DAVIS J.S., ALPER C.A., ROSEN F.S., COLTEN H.R. (1977)  
Biosynthesis of the third component of complement (C3) in vitro by monocytes from both normal and homozygous C3-deficient humans.  
J.clin.invest., 60, 963-969.
23. ELMGREEN L.P., SORENSEN H., BERKOWICZ A. (1984)  
Polymorphism of complement C3 in chronic inflammatory bowel disease.  
Act.med.scand, 215, 375-378.
24. FEARON D.T. (1980)  
Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte and monocyte.  
J.exp.med, 152, 20-30.
25. FISHELSON Z., MÜLLER-EBERHARD J. (1982)  
C3 convertase of human complement : enhanced formation and stability of the enzyme generated with Nickel instead of magnesium.  
J. of Immunol., 129, N° 6, 2603-2607.
26. GELFAND M.C., FRAN M.M., GREEN I. (1975)  
A receptor for the third component of complement in the human renal glomerulus.  
J.exp.med., 142, 1029-1034.
27. GLASS D.N., FEARON D.T., AUSTEN K.F. (1983)  
Inherited abnormalities of the complement system .  
In : "The metabolic basis of inherited disease" (fifth edition).

28. HALBWACHS-MECARELLI L., LESAVRE P. (1986)  
Le Complément.  
Dans : "Immunologie" (BACH J.F. Ed.) Flammarion  
Médecine/Sciences, 3<sup>e</sup> édition, pp 345-371.
29. HOSTETTER M.K., KRUEGER R.A., SCHMELING D.J. (1984)  
The biochemistry of opsonization : central role of the  
reactive thiolester of the third component of complement.  
The Journal of Infection Diseases, 150, N° 5, 653-661.
30. HUGLI T.E. (1990)  
Structure and function of C3a anaphylatoxin.  
In : "The third component of complement", (LAMBRIS J.D.  
Ed), Springer-Verlag, pp 181-208.
31. JANATOVA J., TACK B.F., PRAHL J.W. (1980)  
Third component of human complement : structural  
requirements for its function.  
Biochemistry, 19, 4479-4485.
32. KAY P.H., DAWKINS R.L. (1987)  
Complement genetics and disease : genetically determined  
polymorphism of complement components.  
In : "Complement in health and disease", (WHALEY K. Ed.),  
MTP press Ltd, pp.79-98.
33. KAY P.H., NATSUUME-SAKAI S., HAYAKAWA J., DAWKINS R.L.  
(1985).  
Different allotypes of C3 degrade at different rates.  
Immunogenetics, 22, 563-569.
34. KAZATCHKINE M., HAUPTMANN G., NYDEGGER U. (1985)  
Techniques du Complément.  
Ed. INSERM, 1985.
35. KOCH C., BEHRENDT N. (1986)  
A novel polymorphism of human complement component C3  
detected by means of a monoclonal antibody.  
Immunogenetics, 23, 322
36. KOCH C., SKJODT K., LAURSEN I. (1985)  
A simple immunoblotting method after separation of  
proteins in agarose gels.  
J. of Immunol. Methods, 84, 271-278.
37. KRISTENSEN B.O., PETERSEN G.B. (1978)  
Association between coronary heart disease and the C3F  
gene in essential hypertension.  
Circulation, 58, 4, 622-625.

38. LAMBRIS J.D. (1988)  
The multifunctional role of C3, the third component of complement.  
Immunol. Today, 9, N° 12, 387-393.
39. LAMBRIS J.D., MÜLLER-EBERHARD H.J. (1986)  
The multifunctional role of C3 : structural analysis of its interaction with physiological ligands.  
Mol. Immunol., 23, N° 11, 1237-1242.
40. LAW S.K.A., REID K.B.M. (1988)  
Complement, Oxford, IRL, 72 pages.
41. LESAVRE P., NOEL L.H., MONTEIRO R., HALBWACHS-MECARELLI L. (1989)  
La Maladie de Berger : une néphropathie à IgA.  
Méd.Sci., 5, 286-292.
42. NILSSON U.R., MANDLE R.J., MAC CONNELLS-MAPES J.R. et J.A. (1975)  
Human C3 et C5 : subunit structure and modification by trypsin and C<sub>42</sub> - C<sub>423</sub>.  
J. of Immunol., 114, N°2, 815-822.
43. PARKES C., GAGNON J., KERR M.A. (1983)  
The reaction of iodine and thiol blocking reagents with human complement components C2 and factor B.  
Bioch. J., 213, 201-209.
44. RAMBAUSEK N., VAN DEN WALL BAKE A.W.L., SCHUMACHER-ACH R., SPITZENBERG R., ROTHER U., VAN ES L.A., RITZ E. (1983)  
Genetic polymorphism of C3 and Bf in IgA nephropathy.  
Nephrol. Dial. Transplant 2, 208-211.
45. REID K.B., DAY A.J. (1989)  
Structure-function relationships of the complement components.  
Immunol. today, 10, N°6, 177-183.
46. REYNES M., AUBERT J.P., COHEN J.H.M., AUDOUIN J., TRICOTET V., DIEBOLD J., KAZATCHKINE M.D. (1985)  
Human follicular dendritic cells express CR1, CR2 and CR3 complement receptor antigens.  
J. Immunol., 135, 2687-2694.

47. RIPOCHE J., DEMARES M.J., JULEN N., LEMERCIER C., DAUCHEL H., DAVRINCHE C., DAVEAU M., FONTAINE M. (1989)  
Les protéines régulatrices du système du complément.  
Méd.Sci., 5, N° 4, 234-243.
48. RITTNER C., STRADMANN-BELLINGHAUSEN B. (1990)  
C3 reference typing report and nomenclature revision.  
Complement Inflamm, 7, 230-233.
49. ROITT I., BROSTOFF J., MALE D. (1989)  
Le complément.  
Dans : "Immunologie fondamentale et appliquée"  
( MEDSI/MCGRAW-HILL Ed.), pp 13.1-13.16.
50. SCHAADT O., SORENSEN H., KROGSGAARD A.R. (1981).  
Association between the C3F gene and essential  
hypertension.  
Clinical Science, 61, 3635-3655.
51. SIM E., WOOD A.B., HSIUNG L.M., SIM R.B. (1981).  
Pattern of degradation of human complement fragment C3b.  
Federation of European Biochemical Societies, 132, N° 1,  
55-60.
52. SORENSEN H. (1984).  
The complement C3F gene as a risk factor for vascular  
events in hypertension.  
Acta Med. Scand., 686, 49-58.
53. SOTTRUP-JENSEN L., STEPANIK T.M., KRISTENSEN T., LONBLAD  
P.B., JONES C.M., WIERZBICKI D.M., MAGNUSSON S., DOMDEY  
H., WETSEL R., LUNDWALL A., TACK B.F., FEY H. (1985).  
Common evolutionary origin of 2 macroglobulin and  
complement component C3 and C4.  
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 82, 9-13.
54. SRIVASTAVA N., SRIVASTAVA L.M. (1985)  
Association between C3 complement types and indian  
childhood cirrhosis.  
Hum. Hered., 35, 268-270.
55. TACK I.B.F., HARRISON R.A., JANATOVA J., THOMAS M.L.,  
PRAHL J.W. (1980).  
Evidence for presence of an internal thiolester bond in  
third component of human complement.  
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 77, N° 10, 5764-5768.
56. TACK B.F., MORRIS S.C., PRAHL J.W. (1979).  
Third component of human complement : structural analysis  
of the polypeptide chain of C3 and C3b.  
Biochemistry, 18, N° 8, 1487-1502.

57. TACK B.F., PRAHL J.W. (1986).  
Third component of human complement : purification from plasma and physicochemical characterization.  
Biochemistry, 15, N° 20, 4513-4521.
58. TEISBERG P. (1970).  
High voltage agarose gel electrophoresis in the study of C3 polymorphism.  
Vox Sang., 19, 47-56.
59. TOMANA M., NIEMANN M., GARNER C., VOLANAKIS J.E. (1985).  
Carbohydrate composition of the second, third and fifth components and factors B and D of human complement.  
Mol. Immunol., 22, 107-111.
60. VAN DYNE S., HOLERS V.M., LUBLIN D.M., ATKINSON J.P. (1987).  
The polymorphism of the C3b/C4b receptor in the normal population and in patients with systemic lupus erythematosus.  
Clin. Exp. Immunol., 68, 570-579.
61. VILLIERS C.L., ARLAUD G.J., COLOMB M.G. (1983).  
Diamine induced dissociation of the first component of human complement C1.  
Eur. J. Biochem., 140, 421-426.
62. WEIS J.J., TEDDER T.F., FEARON D.T. (1984).  
Identification of a 145 000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81, 881-885.
63. WIENE R.J., DEMEULENAERE L. (1967).  
Genetically determined electrophoretic variant of human complement component C3.  
Nature, 214, 1042-1043.
64. WILSON J.G., TEDDER T.F., FEARON D.T. (1983).  
Characterization of human T lymphocytes that express the C3b receptor.  
J. Immunol., 131, 684-689.



## CONCLUSIONS

*MEMOIRE SOUTENU PAR MADAME VERONIQUE LASJAUNIAS NEE GROBON*

La molécule de C3 présente un polymorphisme génétique objectivé par un profil différent en électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage. Les variations dans la vitesse de migration permettent de mettre en évidence deux allèles fréquents : F (fast) et S (slow). La transmission héréditaire de ce caractère s'effectue de manière autosomale codominante, ce qui conduit à observer les trois types S, F et FS dont les fréquences sont respectivement de 64 %, 6 % et 29 %. A côté de ces trois types les plus couramment retrouvés, il existe un nombre important de variants.

Le type F semble prédisposer plus particulièrement à l'apparition de certaines maladies parmi lesquelles on distingue principalement l'arthrite rhumatoïde et la Maladie de Berger.

L'objet de ce travail concerne la mise au point d'une technique de typage de la molécule de C3 par électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage. D'autre part, le fractionnement de C3 est étudié afin de mettre en évidence une différence fonctionnelle entre les deux types de C3 qui expliquerait la prédisposition des individus de type F à développer ces maladies.

Dans un premier temps, le fractionnement de C3 est réalisé par incubation de celui-ci avec de la trypsine puis objectivation de la coupure par électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation. Les résultats obtenus sont difficiles à interpréter en raison des nombreuses protéases sériques concurrentes de la trypsine, expliquant la faible reproductibilité de la coupure de C3. Une différence de migration entre les types FS et S est suspectée, mais elle pourrait n'être due qu'à la simple variation polymorphique existant entre les deux types.

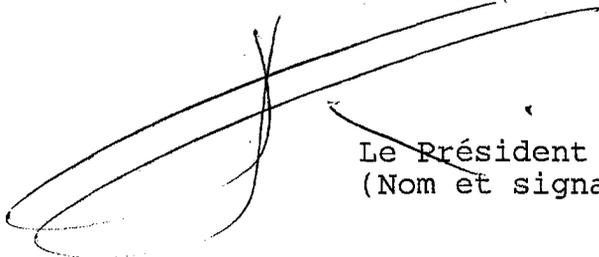
Pour se libérer de l'action des protéases sériques, C3 est incubé avec une C3 convertase élaborée en prenant comme support des hématies de mouton sensibilisées avec des anticorps antiglobules rouges de mouton. Là encore, l'objectivation de la coupure de C3 se fait par électrophorèse en gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation ainsi que par immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

Sur immunoélectrophorèse bidimensionnelle, la coupure de C3 est quantifiée par mesure de la surface des pics de C3 obtenus (par rapport au C3 natif). La forme F se coupe plus rapidement et en quantité plus importante que la forme S. Par ailleurs, on constate également une variation des quantités de

C3 natif et coupé restant dans le surnageant. Les poids de C3 natif et coupé obtenus au temps T0 étant fixés comme références, une quantité plus importante de C3F disparaît du surnageant, ce qui laisse supposer que C3F se fixe sur les hématies sensibilisées de manière plus importante que C3S. La différence entre les deux types de C3 résidant dans la variation d'un acide aminé de charge différente, C3F est susceptible de se fixer de manière préférentielle sur certains groupements tels que les résidus aminés portés par les immunoglobulines fixées sur les hématies.

La différence fonctionnelle entre les deux formes F et S de C3 se situe donc en partie au niveau de la vitesse de fragmentation et de la quantité de C3 coupé mais également au niveau de la fixation de la molécule de C3 à un accepteur.

P<sup>r</sup> FAVIER Alain



Le Président du Jury  
(Nom et signature)

Vu, le Doyen de la Faculté,

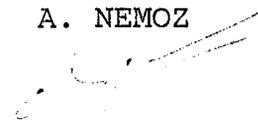
J. ROCHAT

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 6 Mars 1991

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
J. FOURIER

A. NEMOZ



## RESUME

Le composant C3 du complément humain présente un polymorphisme génétique à transmission autosomale codominante. Des variations dans la mobilité en électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage conduisent à observer trois types de C3 : S, F et FS dont les fréquences sont respectivement de 64 %, 6 % et 29 %. A côté de ces trois types les plus couramment retrouvés existe un nombre important de variants.

Après mise au point d'une technique de typage de C3 par électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage, le fractionnement de C3 est étudié afin de mettre en évidence une différence fonctionnelle entre les deux types F et S qui pourrait expliquer la prédisposition des individus de type F à développer certaines maladies comme la maladie de Berger ou l'arthrite rhumatoïde.

Des plasmas C3S et C3FS sont incubés avec de la trypsine et la coupure de C3 est ensuite étudiée par électrophorèse sur gel d'agarose à haut voltage suivie d'immunofixation. Les résultats obtenus sont difficiles à interpréter en raison des nombreuses protéases sériques concurrentes de la trypsine entraînant une reproductibilité médiocre.

Pour se libérer de l'action des protéases sériques, des plasmas C3S et C3F sont incubés avec une C3 convertase élaborée en prenant comme support des globules rouges de mouton sensibilisés. L'étude du fractionnement de C3 s'effectue en immunoélectrophorèse bidimensionnelle. On observe une coupure plus rapide et en quantité plus importante de la forme F par rapport à la forme S. D'autre part, il existe également une variation dans les quantités de C3 natif et coupé subsistant dans le surnageant qui laisse supposer que C3F se fixe préférentiellement à C3S sur les hématies sensibilisées. Ceci peut s'expliquer par la variation d'un acide aminé de charge différente existant entre les deux formes de C3.

La différence fonctionnelle entre les formes F et S de C3 se situe donc en partie au niveau de la vitesse de fragmentation et de la quantité de C3 coupé mais également au niveau de la fixation de C3b à l'accepteur.

**MOTS-CLES :** Polymorphisme de C3 - Typage - Fractionnement - Trypsine - C3 convertase