

## **C3, protéine du complément : une molécule aux multiples capacités**

**Christian Villiers**

La molécule C3 du complément a non seulement un rôle central dans le fonctionnement du système complémentaire, mais elle tient aussi, en se liant de façon covalente à l'antigène, une place très importante dans la réponse immune. Son clivage protéolytique modifie la conformation de la molécule de manière qu'un pont thioester intramoléculaire se rompt, permettant l'établissement d'une liaison covalente avec des accepteurs tels que des bactéries, des complexes immuns et d'autres protéines. Le complexe fragment de C3/antigène pénètre dans les cellules présentatrices de l'antigène après liaison aux récepteurs de C3, et la présence de fragments du C3 modifie l'apprêtement des peptides antigéniques dans les endosomes. Des modèles animaux déficients en C3 ont permis de montrer qu'il est impliqué dans la commutation IgM/IgG et à plusieurs niveaux de la réponse immune : opsonisation, prolifération cellulaire, cytotoxicité et établissement de la mémoire immunologique.

**L**e système complémentaire a longtemps été considéré comme un élément mineur associé au système immunitaire : un ensemble servant à la destruction des éléments étrangers à l'organisme et venant, comme son nom l'indique, en complément de la réponse anticorps. Mais à partir des années 1970, de nombreuses expériences, dont certaines réalisées à l'aide d'animaux déficients en protéines du complément, ont démontré une interrelation étroite entre tous les systèmes de défense [1]. Ces résultats ont mis en évidence le rôle important d'une protéine du système

complémentaire, C3, révélant son activité, d'une part, dans la prolifération ou la lyse des cellules, dans les réactions d'anaphylaxie (dégranulation des mastocytes et contraction des muscles lisses) et d'opsonisation (marquage favorisant la phagocytose) et, d'autre part, au niveau même de la réponse anticorps. La multifonctionnalité de C3 peut être expliquée, non seulement par la position centrale que cette protéine occupe dans le fonctionnement du système complémentaire, mais aussi par sa structure très particulière qui lui confère des aptitudes tout à fait originales.

### ADRESSE

C. Villiers : chargé de recherche à l'Inserm. CEA, laboratoire d'immunochimie, Inserm U. 238, département de biologie moléculaire et structurale, CEN-Grenoble, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France.

## RÉFÉRENCES

1. Pepis MB. Role of complement in induction of antibodies *in vivo*. Effect of cobra venom factor and other C3-reactive reagents on thymus-dependent and thymus-independent antibody response. *J Exp Med* 1974; 140: 126-45.
2. Ripoche J, Demares M, Julien N, Lemerrier C, Dauchel H, Davrinche C, Daveau M, Fontaine M. Les protéines régulatrices du système du complément. *médecine/sciences* 1989; 5: 234-43.
3. De Bruijn MHL, Fey GH. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 708-12.
4. Carroll MC, Fathallah DM, Bergamaschini L, Alicot EM, Isenman DE. Substitution of a single amino acid (aspartic acid for histidine) converts the functional activity of human complement C4B to C4A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6868-72.
5. Law SKA. The covalent binding reaction of C3 and C4. *Ann NY Acad Sci* 1983; 421: 246-58.
6. Anh-Tuan N, Falus A, Füst G, Merétey K, Hollan SR. Appearance of covalently bound antigen in immune complexes formed during the activation of complement. *J Immunol Methods* 1984; 75: 257-63.
7. Borht W, Urbanski A, Prohaska R, Susani M, Lugeu TA. Binding of recombinant interleukin-1 $\beta$  to the third complement component and  $\alpha$ 2-macroglobulin after activation of serum by immune complexes. *Blood* 1990; 75: 2388-95.
8. Jacquier MR, Gabert FM, Villiers CL, Colomb MG. Disulfide linkage between C3b and tetanus toxin on tetanus toxin-specific EBV-transformed B cells. *J Immunol* 1993; 150: 4253-60.
9. Chen H, Marjan J, Cox AD, Devine DV. Characteristics of a novel low affinity complement C3dg-binding protein of human platelets. *J Immunol* 1994; 152: 1332-8.
10. Carter RH, Spycher MO, Ng YC, Hoffman R, Fearon DT. Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J Immunol* 1988; 141: 457-63.

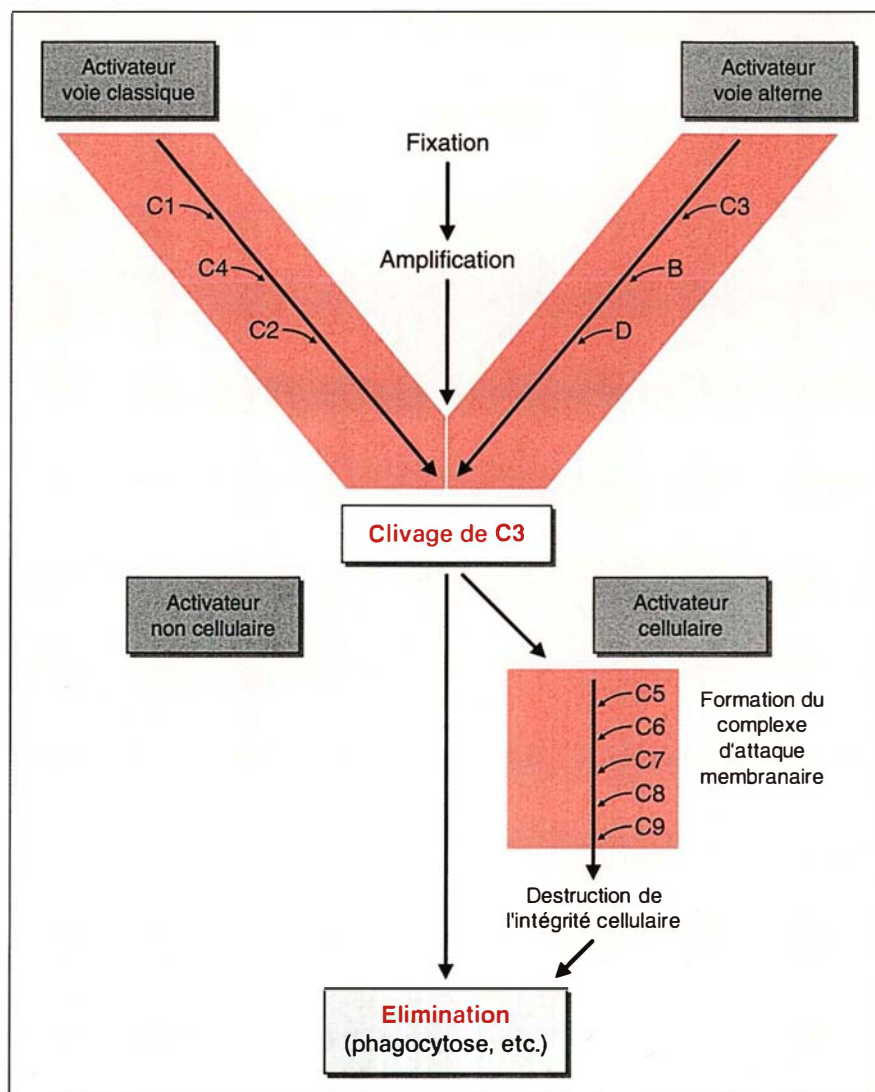
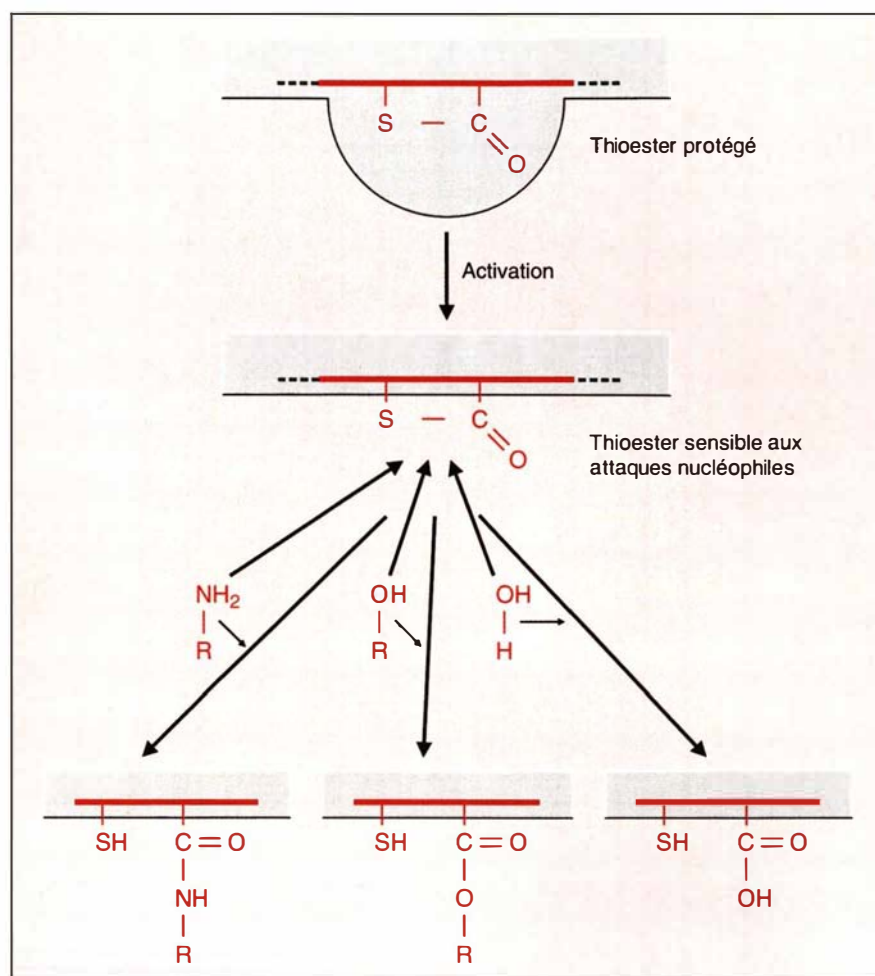


Figure 1. Représentation schématique du système complémentaire avec implication des protéines C1, C4 et C2 pour la voie classique, des protéines C3, B et D pour la voie alterne. La formation du complexe d'attaque membranaire fait intervenir les protéines C5, C6, C7, C8 et C9. Les facteurs de régulation ne sont pas représentés sur ce schéma. Le système complémentaire aboutit à l'élimination des micro-organismes, des complexes immuns et des cellules infectées.

## C3 et le système complémentaire

Le système complémentaire est constitué par un ensemble de protéines plasmatiques mis en jeu par deux voies d'activation : la voie classique, amorcée par des complexes immuns, des immunoglobulines agrégées, des polyanions ou des polycations, et la voie alterne, activée par

des polysaccharides, par certaines classes d'immunoglobulines agrégées et par certaines membranes (*E. coli* par exemple). Dans le cas de la voie alterne, c'est la fixation de C3 qui est l'élément initiateur, fixation covalente qui sera commentée dans la partie concernant la structure de C3. Après fixation de protéines complémentaires sur l'élément activateur, la réponse est amplifiée grâce à la formation



**Figure 2. Représentation schématique des différentes réactions conduisant à la formation d'une liaison ester entre C3 et une autre protéine : l'attaque nucléophile exercée par les groupements R-OH ou R-NH<sub>2</sub> provoque la rupture du thioester avec respectivement formation d'une liaison ester ou amide. En l'absence de protéines dans son environnement proche, C3 réagit avec l'eau et perd alors toute capacité de former ultérieurement une liaison covalente en présence de groupements nucléophiles.**

tion de complexes enzymatiques (C3 convertases) responsables du clivage de C3, point de rencontre entre ces deux cascades de réactions [2] (*figure 1*). Le dépôt de C3 à la surface des cellules est un élément primordial dans l'activation de la voie alterne du système complémentaire ; bien qu'incomplètement élucidé, on peut dire qu'il répond de façon générale, soit à la présence d'un système générateur (réponse inflammatoire et donc sécrétion d'enzymes, par exemple), soit à l'absence d'éléments de contrôle : MCP (*membrane control protein* ou

CD46) ou DAF (*decay accelerating factor* ou CD55).

Dans la plupart des cas, le clivage de C3 est une fin en soi, puisqu'il déclenche, comme nous le verrons ultérieurement, toute une série de réactions qui conduisent à l'élimination par phagocytose de la substance activatrice. Lorsque l'activateur est une cellule, le fonctionnement du complément peut se poursuivre par la formation d'un complexe d'attaque membranaire, véritable pore capable de détruire l'intégrité de la cellule étrangère par cytolysse et le plus sou-

vent d'activer la libération de médiateurs de l'inflammation par la cellule cible. Toutes ces étapes sont contrôlées par de nombreuses protéines, tant solubles que membranaires, qui protègent l'organisme d'un fonctionnement trop intense du complément, et empêchent, notamment, la lyse des cellules cibles du soi.

## Structure de C3

C3 est une glycoprotéine sérique abondante (1,3 mg/ml) formée de deux chaînes,  $\alpha$  (110 kDa) et  $\beta$  (75 kDa), reliées par un pont disulfure [3]. La caractéristique sans doute la plus importante de cette protéine réside dans sa capacité transitoire de se lier de façon covalente à de nombreuses autres molécules. Ce pouvoir lui est conféré par un thioester formé au niveau de la chaîne  $\alpha$  par une transestérification entre la cystéine 1010 et la glutamine 1013, au sein de la séquence consensus GCGEQ (Gly-Cys-Gly-Glu-Gln) : ce thioester se forme apparemment spontanément au cours de la biosynthèse de la protéine et provoque la perte du groupement aminé de la glutamine. Cette liaison est par la suite stabilisée à l'intérieur de la structure tridimensionnelle du C3 natif. Au moment de la formation de C3b, c'est-à-dire lorsque C3 est clivé au cours de l'activation du complément ou par action d'autres protéases (trypsine, élastase, etc.), un changement de conformation dans la protéine provoque l'exposition du thioester aux attaques nucléophiles permettant, en théorie, une réaction avec les groupements -OH ou -NH<sub>2</sub> (*figure 2*). Cependant, les travaux de Carroll [4] et de Law [5] ont montré que la présence d'une histidine en position 1126 sur la séquence de C3 oriente très fortement la réactivité du thioester vis-à-vis des hydroxyles et donc vers la formation de liaisons esters : ainsi, toute protéine ou surface activatrice du complément se trouvant dans l'environnement proche de C3 au moment de son clivage peut voir un de ses groupements hydroxyles réagir avec le thioester, ce qui a pour conséquence la formation d'une liaison covalente ; c'est le cas par exemple des complexes immuns qui, du fait qu'ils sont activateurs du complément, se recouvrent de C3b aussi bien au ni-



## RÉFÉRENCES

11. Tedder TF, Zhou LJ, Engel P. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today* 1994; 15: 437-41.
12. Barel M, Fiandino A, Lyamani F, Frade R. Epstein-Barr virus/complement fragment C3d receptor (CR2) reacts with p53, a cellular antioncogene-encoded membrane phosphoprotein: detection by polyclonal anti-idiotypic anti-CR2 antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 10054-8.
13. Barel M, Gauffre A, Lyamani F, Fiandino-Tirel A, Hermann J, Frade R. Involvement of intracytoplasmic C-terminal domain of Epstein-Barr virus/C3d receptor (CR2) in its interactions with two distinct regulatory proteins, the p53 anti-oncoprotein and the p68 calcium-binding protein. *Complement and Inflammation* 1991; 8: 126.
14. Changelian PS, Fearon DT. Tissue-specific phosphorylation of complement receptors CR1 and CR2. *J Exp Med* 1986; 163: 101-15.
15. Chatila TA, Geha RS, Arnaout MA. Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion. *J Cell Biol* 1989; 109: 3435-44.
16. Merrill JT, Slade SG, Weissmann G, Winchester R, Buyon JP. Two pathways of CD11b/CD18-mediated neutrophil aggregation with different involvement of protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Immunol* 1990; 145: 2608-15.
17. Carpentier JL, Lew DP, Paccaud JP, Gil R, Locapetta B, Kazatchkine M, Stendahl O, Pozzan T. Internalization pathway of C3b receptors in human neutrophils and its transmodulation by chemoattractant receptors stimulation. *Cell Regulation* 1991; 2: 41-55.
18. Bonnerot C, Friedmann H. Bases moléculaires de la diversité fonctionnelle des récepteurs des anticorps. *médecine/sciences* 1993; 9: 1236-42.
19. Graham IL, Lefkowitz JB, Anderson DC, Brown EJ. Immune complex-stimulated neutrophil  $LTB_4$  production is dependent on  $\beta_2$  integrins. *J Cell Biol* 1993; 120: 1509-17.
20. Aubry JP, Pochon S, Graber P, Jansen KU, Bonnefoy JY. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* 1992; 358: 505-7.

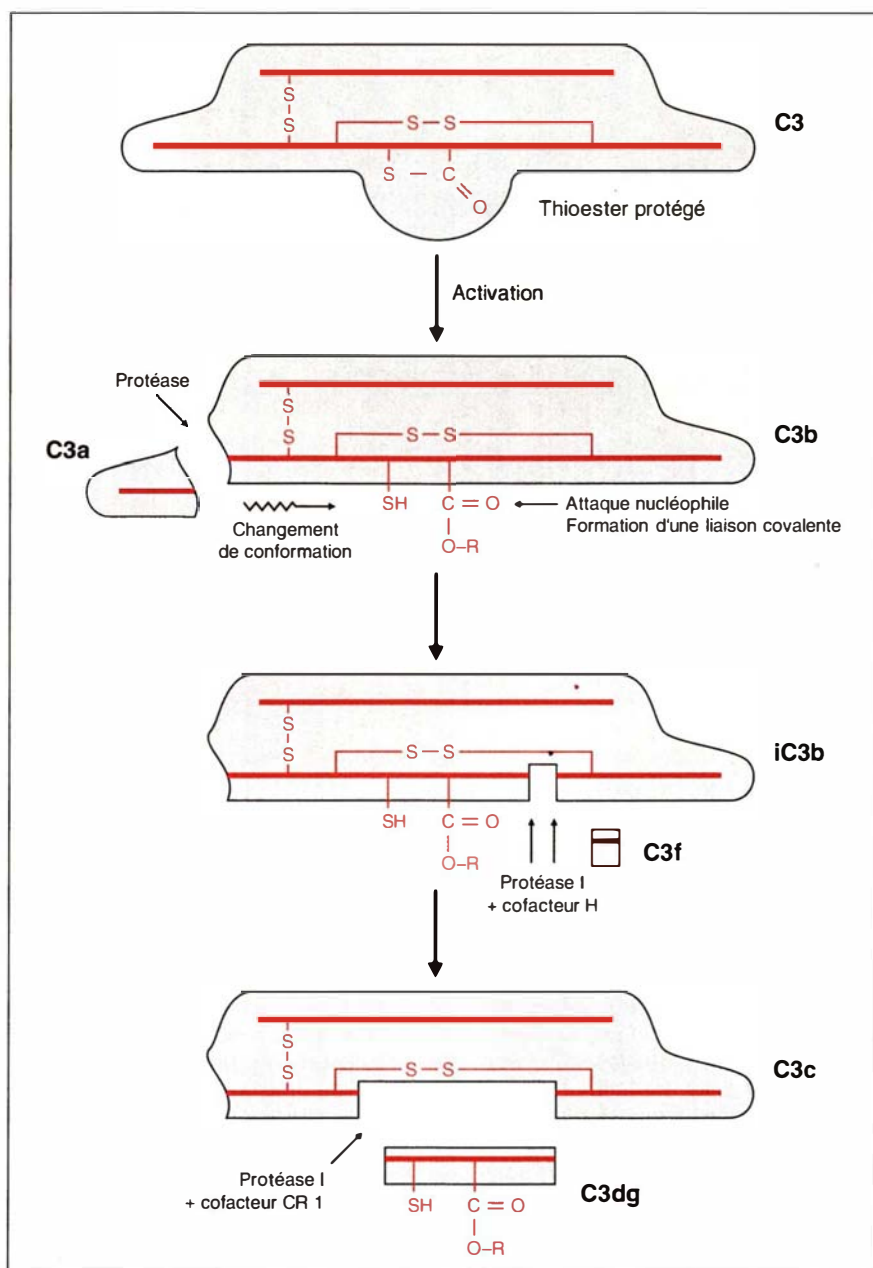


Figure 3. **Représentation schématique des différentes étapes de clivages protéolytiques de C3.** L'activation de C3 par les convertases du système complémentaire ou par d'autres protéases provoque la formation de C3b et C3a. C3b est dégradé en iC3b et C3f par l'action de la protéase I en présence du cofacteur H, iC3b étant lui-même clivé en C3dg et C3c en présence de I et du cofacteur CR1.

veau de l'antigène que de l'anticorps [6]. La capacité de C3 de former une liaison ester est restreinte dans le temps (demi-vie inférieure à la seconde) car les molécules d'eau peuvent elles aussi exercer une attaque nucléophile et rompre le thioester; cela a pour conséquence une perte totale des capacités de C3 de former une liaison covalente avec des protéines, le C3b formé restant en solution. La fonction thiol libérée peut, également, être impliquée dans la formation de liaison covalente, soit directement au cours de la rupture du thioester [7], soit ultérieurement, après oxydation du -SH par exemple [8]. C3 n'est pas la seule protéine à pouvoir se lier de façon covalente à d'autres molécules: elle partage cette aptitude avec C4 (protéine du système complémentaire), l' $\alpha$ -2-macroglobuline et la PZP (*pregnancy zone protein*), ces deux dernières protéines étant des inhibiteurs de protéases. Toutes ces molécules contiennent la même séquence GCGEQ autorisant la transestérification. Cependant, C3 est la seule protéine à posséder des récepteurs ayant une telle diversité de fonctions et dont la répartition couvre l'ensemble des cellules impliquées dans la réponse immunitaire: C3 est la seule protéine dont la double interaction soit aussi fondamentale pour la réponse immunitaire.

### Fragments de C3 et récepteurs

L'activation de C3, telle qu'elle est abordée dans le paragraphe précédent, correspond à un premier clivage protéolytique exercé au niveau de la chaîne  $\alpha$  et libérant un fragment du côté N-terminal appelé C3a (10kDa). Le reste de la molécule (C3b), soluble ou liée, subit par la suite une série de protéolyses conduisant à la formation des fragments iC3b, C3c, C3d et C3dg (*figure 3*). Ces fragments présentent pour la plupart des activités et des interactions qui leur sont propres; ils peuvent, en effet, se lier à différents récepteurs (CR1, 2, 3, 4 et 5, *Tableau 1*), eux-mêmes répartis sur de très nombreux types cellulaires, et catalyser tout un ensemble de réponses; les fragments C3b, iC3b et C3d ont une capacité de lien bifonctionnel puisque, outre la fixation sur les récepteurs, ils sont

Tableau I				
RÉCEPTEURS DES FRAGMENTS DE C3				
Récepteur	Composition	PM (kDa)	Ligand	Localisation
CR1	1 chaîne polymorphique: CD35	160, 190, 220, 250	C3b, (iC3b, C3c)	Érythrocytes, lymphocytes B et T, monocytes, macrophages, cellules folliculaires dendritiques, neutrophiles, éosinophiles
CR2	1 chaîne: CD21	145	C3d, C3dg (iC3b)	Lymphocytes B, cellules folliculaires dendritiques, thymocytes
CR3	2 chaînes $\alpha$ : CD11b $\beta$ : CD18	165 95	iC3b (C3d)	Monocytes, macrophages, cellules folliculaires dendritiques, neutrophiles, éosinophiles, cellules K et NK, lymphocytes T
CR4	2 chaînes $\alpha$ : CD11c $\beta$ : CD18	150 95	iC3b	Monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules K et NK
CR5	1 chaîne	95	C3dg, C3d	Lymphocytes B, neutrophiles, plaquettes

porteurs du lien covalent décrit précédemment: toute protéine qui aura réagi avec le thioester au moment de la transition C3/C3b pourra donc interagir avec des cellules pour lesquelles elle n'a, *a priori*, aucune affinité, et cela *via* les récepteurs spécifiques des fragments de C3.

Les récepteurs les plus étudiés au niveau structural sont certainement CR1 et CR2. Bien que leur répartition cellulaire et leur affinité pour les fragments de C3 soient différentes, ils présentent une très forte analogie: ces deux récepteurs sont formés de domaines appelés SCR (*short consensus repeat*) d'environ 60 acides aminés, possédant un squelette bien précis formé de 4 cystéines reliées selon le schéma 1-3 et 2-4; d'autres acides aminés sont fortement conservés tels les prolines, tryptophanes, tyrosines et glycines. Ces domaines ont 60 % à 100 % d'ana-

logie entre eux et sont répétés un grand nombre de fois (16 fois pour CR2 et 30 fois pour CR1); de plus, dans le cas de CR1, les SCR sont regroupés par 7 formant des LHR (*long homologous repeat*) (*figure 4*). D'autres protéines du complément qui interagissent avec C3 possèdent également des SCR (C4bp, MCP, DAF, B et C2). Les différentes formes alléliques de CR1 correspondent à des variations dans le nombre des SCR.

La constante d'affinité de CR1 pour C3b monomérique est faible ( $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) mais augmente lorsque C3b est polymérisé ( $4 \text{ à } 7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ); le clivage de C3b en iC3b provoque une perte d'affinité de la protéine pour CR1 (100 fois) mais en parallèle augmente l'affinité pour CR2 (10 fois). En ce qui concerne les fragments iC3b et C3dg, ils se fixent de façon identique sur CR2; comme CR1 est

## RÉFÉRENCES

21. Erdei A, Bajtay Z, Fabry Z, Sim RB, Gergely J. Appearance of acceptor-bound C3b on HLA-DR positive macrophages and on stimulated U937 cells; inhibition of Fc-receptors by the covalently fixed C3 fragments. *Mol Immunol* 1988; 25: 295-303.
22. Erdei A, Melchers F, Schulz T, Dierich M. The action of human C3 in soluble or cross-linked form with resting and activated murine B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1985; 15: 184-8.
23. Servis C, Lambris JD. C3 synthetic peptides support growth of human CR2-positive lymphoblastoid B cells. *J Immunol* 1989; 142: 2207-12.
24. Maison CM, Villiers CL, Colomb MG. Secretion, cleavage and binding of complement component C3 by the human monocytic cell line U937. *Biochem J* 1989; 261: 407-13.
25. Bartok I, Erdei A, Mouzaki A, Osawa H, Szölösi J, Eigentler A, Diamantstein T, Dierich M, Gergely J. Interaction between CR3 and IL-2; inhibition of C3b binding to CR1 by IL-2. *Immunol Lett* 1989; 21: 131-8.
26. Arvieux J, Yssel H, Colomb MG. Antigen-bound C3b and C4b enhance antigen-presenting cell function in activation of human T-cell clones. *Immunology* 1988; 65: 229-35.
27. Klaus GGB, Humphrey JH. The generation of memory cells. 1 the role of C3 in the generation of B memory cells. *Immunol Today* 1986; 7: 163-5.
28. Böttger EC, Metzger S, Bitter-Suermann D, Stevenson G, Kleindienst S, Burger R. Impaired humoral immune response in complement C3-deficient guinea pigs: absence of secondary antibody response. *Eur J Immunol* 1986; 16: 1231-5.
29. Hebell T, Ahearn JM, Fearon DT. Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science* 1991; 254: 102-5.

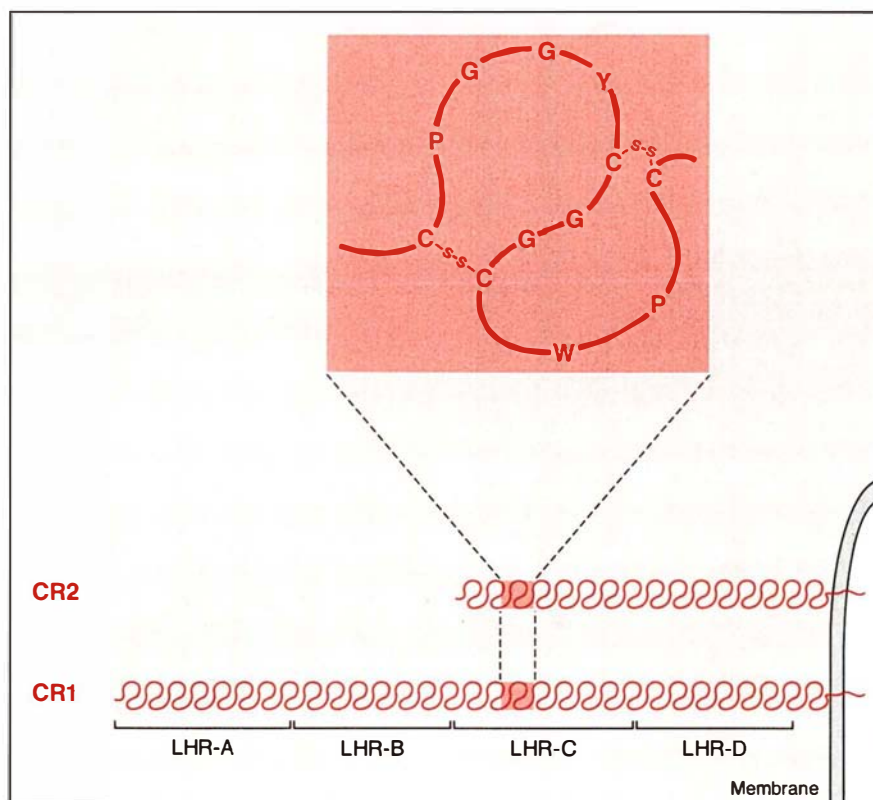


Figure 4. **Représentation schématisique de CR1 et CR2** : détail d'une région SCR (short consensus repeat) avec indication des acides aminés fortement conservés dans le cas de ces deux récepteurs. CR1 et CR2 sont constitués respectivement de 30 et 16 SCR regroupés dans le premier cas en 4 zones de forte analogie ou LHR (long homologous repeat).

cofacteur de la protéase I pour la transformation de C3b en iC3b, nous pouvons envisager la séquence d'interactions suivante: (1) fixation de C3b sur CR1, (2) clivage par I, (3) transfert sur CR2. Bien que l'expression de CR1 à la surface des érythrocytes soit faible, il revêt une grande importance du fait du nombre élevé de ces cellules; dans ce cas, les récepteurs sont regroupés en amas, favorisant ainsi les interactions avec les fragments de C3 se présentant sous forme de polymères (C3b-complexes immuns par exemple). Les globules rouges transfèrent vers le foie ces complexes où, là encore, CR1 sert de cofacteur à I pour la transformation de C3b en iC3b, ce qui permet la capture de ces complexes par les cellules de Kupffer qui possèdent des récep-

teurs de type CR3 et CR4. Au cours de ces processus, il semble que CR1 soit aussi éliminé de la surface des globules rouges, ce qui fait que, lorsque la formation des complexes immuns est continue, leur transfert est de moins en moins efficace à cause du manque en CR1. Dans le cas de déficit complémentaire, l'absence d'interaction de ces complexes avec les globules rouges (faute de C3b fixé) se traduit par des dépôts dans certains tissus (rein, peau, muscle...) où ils déclenchent des réactions inflammatoires.

CR3 et CR4 sont les seuls récepteurs dont la fixation du ligand (iC3b) est dépendante de la présence de calcium; CR5, quant à lui, a été décrit beaucoup plus récemment [9] et n'a pas encore été étudié en détail.



## **Fragments de C3 et signalisation intracellulaire**

Le groupe de Fearon (Baltimore, MD, USA) [10] a montré qu'à la surface des lymphocytes B, CR2 est associé à une autre molécule, CD19, impliquée dans les modifications du calcium intracellulaire: la réticulation des molécules CD19 ou CR2, qu'elle soit le résultat de l'ajout d'anticorps spécifiques ou de polymères de C3d (dans le cas de CR2), provoque l'activation d'une phospholipase C et conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium; ce phénomène entre en synergie avec la réticulation des Ig de surface (sIg) [10, 11], mais les effets restent fondamentalement différents, puisque la fixation des anticorps sur les sIg entraîne les cellules dans un processus de division, conséquence absente dans le cas de CD19 et CR2. D'autres éléments sont à prendre en considération, tels que l'association de CD19 avec Leu-13 ou avec TAPA-1 (CD81), ce dernier ayant été décrit comme capable de s'associer aux molécules de classe II. Le groupe de Frade a, par ailleurs, démontré que CR2 peut interagir au niveau intracellulaire avec la protéine fixatrice de calcium P68 [12] et avec l'anti-oncoprotéine p53 [13] et, par ce biais, déclencher une entrée des cellules dans le cycle de division cellulaire. Toutes ces interactions restent cependant les éléments d'un puzzle non encore assemblé.

La phosphorylation, en présence d'un ester de phorbol, de la partie intracellulaire des récepteurs des fragments de C3 a été démontrée dans le cas de CR1 et de CR2 [14]; une certaine spécificité cellulaire apparaît, puisque CR1 est phosphorylé lorsqu'il est situé à la surface des macrophages et des neutrophiles et non à la surface des lymphocytes B, alors que CR2 ne l'est que dans ce dernier cas. Le rôle exact de ces phosphorylations n'est pas encore bien défini, mais elles semblent être un préalable aux internalisations lors de la fixation des ligands respectifs (C3b et C3dg); la relation entre ces deux phénomènes n'est, cependant, pas totalement établie. Dans le cas de CR3, une activation cellulaire (par un ester de phorbol) est aussi nécessaire pour que la

fixation de iC3b monomère aux monocytes ou aux neutrophiles entraîne une phagocytose; cette activation conduit à la phosphorylation de la chaîne  $\beta$  du récepteur, chaîne commune à LFA-1, CR3 et CR4, alors que la chaîne  $\alpha$  n'est pas phosphorylée [15]. En revanche, la réticulation des récepteurs de type CR3 en présence d'anticorps ou de polymères de iC3b induit des phosphorylations intracellulaires dépendantes de la protéine kinase C (PKC), puisque inhibées par la staurosporine [16], et entraîne une sécrétion d'ions superoxydes ( $O_2^-$ ) et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) dans le cas des neutrophiles. Le plus souvent, l'activation des cellules provoque une augmentation du nombre de récepteurs exprimés: les monocytes au repos, comme les éosinophiles et les neutrophiles, expriment peu de CR1 (de l'ordre de 5 000 molécules par cellule) alors qu'après ajout de peptides chimiotactiques (C5a, FMLP, formyl-méthionine-leucine-phénylalanine) ou d'ester de phorbol, leur nombre augmente rapidement, pouvant atteindre, par exemple, 30 000 CR1 par cellule dans le cas des monocytes. L'infection des lymphocytes B par le virus d'Epstein Barr (EBV) provoque aussi une forte augmentation du nombre de CR1 qui passe de 10 000 récepteurs par cellule à 50 000, et de CR2 qui peut atteindre 100 000 molécules par cellule. De même, l'infection de cellules T par HTLV-1 induit l'expression de CR2. L'internalisation des récepteurs de C3 et leur trafic intracellulaire ou recyclage éventuel ont été peu étudiés jusqu'à maintenant, si ce n'est dans le cas de CR1 qui a été décrit comme entrant dans la cellule par des voies indépendantes des puits à clathrine et requérant l'intégrité des microfilaments [17].

En dehors des transmissions intracellulaires du signal, la fixation des fragments de C3 sur leurs récepteurs respectifs a aussi des conséquences au niveau des autres récepteurs membranaires. En effet, de nombreuses expériences indiquent une relation étroite entre les récepteurs du complément et ceux des parties Fc des immunoglobulines: ainsi, CR3 et Fc $\gamma$ RIIIb « cocappent » lors des interactions avec leur ligand, effet inhibé par des saccharides interagissant avec une partie fixatrice des lectines sur

CR3; plus récemment, on a montré que les formes solubles des récepteurs CD16 (Fc $\gamma$ RIII) et CD32 (Fc $\gamma$ RII) [18] se lient aux récepteurs CR3 et CR4 et entrent, de ce fait, en compétition pour la fixation de iC3b sur ces derniers (J. Galon, C. Sautes, Institut Curie, communication personnelle). De même, CR3 et Fc $\gamma$ RII coopèrent pour la synthèse de leukotrienne B4; différents auteurs [19] ont montré que les complexes immuns doivent se fixer à la fois sur les récepteurs des parties Fc des immunoglobulines et sur les récepteurs de type CR3 pour être phagocytés: en effet, des anticorps monoclonaux anti-CR3 peuvent bloquer la phagocytose dépendante des récepteurs Fc. En ce qui concerne les lymphocytes B, il a été démontré que CR2 se lie aux récepteurs des IgE (CD23), l'association de ces deux récepteurs semblant contrôler la production de ce type d'immunoglobulines [20].

Dans une autre série d'expériences, il a été montré que la fixation des fragments de C3 sur les macrophages inhibe la fixation des immunoglobulines sur leurs récepteurs Fc [21], ce qui a pour conséquence de diminuer l'activité cytotoxique dépendante des anticorps de ces mêmes macrophages. Tous ces exemples démontrent que la production des fragments de C3 est un élément important dans la régulation de la réponse immune.

## **Fragments de C3 et cellules impliquées dans la réponse immune**

De façon générale, la fixation de C3 ou de ses fragments sur une cellule n'a pas les mêmes conséquences selon qu'il est à l'état monomère ou polymère (Tableau II), ce dernier état correspondant à la fixation de plusieurs molécules de C3b sur un même support (complexes immuns, bactéries, cellules...): ainsi, C3b polymérisé a-t-il la capacité d'induire l'entrée de cellules B en phase S, ce que ne peut pas C3b monomère; en revanche, ce dernier est capable d'inhiber une prolifération induite par des anticorps anti-Ig de surface [22]. Par la suite, les récepteurs mis en jeu et les zones d'interactions de C3 ont été précisés grâce à l'utilisation de peptides de synthèse [23].

## RÉFÉRENCES

30. Thornton BP, Vetvicka V, Ross GD. Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. *J Immunol* 1994; 152: 1727-37.

31. Chu CT, Oury TD, Enghild JJ, Pizzo SV. Adjuvant-free *in vivo* targeting. Antigen delivery by  $\alpha$ 2-macroglobulin enhances antibody formation. *J Immunol* 1994; 152: 1538-45.

32. Santoro L, Drouet C, Reboul A, Mach JP, Colomb MG. Covalent binding of C3b to monoclonal antibodies selectively up-regulates heavy chain epitope recognition by T cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1620-6.

33. Rey-Millet CA, Villiers CL, Gabert FM, Chesné S, Colomb MG. C3b covalently associated to tetanus toxin modulates TT processing and presentation by U937 cells. *Mol Immunol* 1994; 31: 1321-7.

34. Erdei A, Füst G, Gergely J. The role of C3 in the immune response. *Immunol Today* 1991; 12: 332-7.

35. Dierich MP, Ebenbichler CF, Marschang P, Füst G, Thielens NM, Arlaud GJ. HIV and human complement: mechanisms of interaction and biological implication. *Immunol Today* 1993; 14: 435-40.

36. Delibrias CC, Kazatchkine MD, Fischer E. Evidence for the role of CR1 (CD35), in addition of CR2 (CD21), in facilitating infection of human T cells with opsonized HIV. *Scand J Immunol* 1993; 38: 183-9.

37. Yefenof E, Magyarlaci T, Fenyo EM, Wahren B, Klein E. Alternative complement pathway activation by CD4<sup>+</sup> T cells of HIV infected individuals: a possible role in AIDS pathogenesis. *Int Immunol* 1994; 6: 1361-6.

38. Carroll MC, Ma M, Kelsoe GK, Ahearn J. Examination of the role of CR1/CR2 in acquired immunity. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 18.

39. Anderson DJ, Abbott AF, Jack, RM. The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10051-5.

Tableau II  
MODIFICATIONS INDUITES PAR LES FRAGMENTS DE C3

Fragment	Expériences réalisées en présence de fragments	
	monomériques	polymériques
C3b	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Production de lymphokines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilitation de l'élimination des complexes immuns</li> <li>• Focalisation des antigènes sur les tissus lymphoïdes</li> <li>• Stimulation de la prolifération des lymphocytes B</li> <li>• Stimulation de la prolifération des lymphocytes T dépendante de IL2</li> <li>• Accroissement de la cytotoxicité K et NK</li> </ul>
iC3b	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phagocytose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phagocytose</li> <li>• Augmentation de la cytotoxicité dépendante des anticorps</li> </ul>
C3dg	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition de la prolifération des lymphocytes B</li> <li>• Inhibition de la prolifération des lymphocytes T</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulation de la prolifération des lymphocytes B</li> </ul>

Nous avons montré que les macrophages, après activation, possèdent la double capacité de sécréter et de cliver C3 grâce à des protéases que ces cellules possèdent à leur surface (élastase, cathepsine G), ce qui conduit à la fixation directe des fragments produits à la surface des cellules [24]. Ces résultats laissent à penser qu'une coopération est possible entre les macrophages et les lymphocytes B par l'intermédiaire du C3 déposé qui pourrait intervenir lors d'interactions cellules/cellules comme lors de la présentation des antigènes avec, pour conséquence, une induction de la prolifération des cellules B. En ce qui concerne les lymphocytes T, il a été montré que C3b agrégé stimule la prolifération des lymphocytes T en synergie avec l'IL2; cette stimulation est restreinte aux T *helper*, ce qui résulte sans doute d'une différence dans la répartition ou l'activité des récepteurs présents sur ce type cellulaire, comparé aux T cytotoxiques. Il faut aussi tenir compte d'une interaction directe entre C3b et l'IL2 qui peut empêcher la fixation de C3b agrégé sur CR1 comme cela a été démontré [25]. A l'opposé

de ces résultats, un petit fragment de C3 (C3dg) a la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T, qu'elle résulte d'une stimulation antigénique ou mitogénique. Toutes ces observations ne permettent pas d'interpréter de façon évidente le rôle de C3 dans la prolifération des lymphocytes T, mais il se dégage cependant une capacité évidente de contrôle de leur prolifération par l'intermédiaire de CR1 et CR2, ces récepteurs ayant des rôles opposés, favorisant ou inhibant respectivement l'activation cellulaire. Par ailleurs, la prolifération des lymphocytes T en réponse à une présentation d'antigène par une cellule spécialisée (lymphocyte B par exemple) est fortement augmentée lorsque cet antigène est lié de façon covalente à des fragments de C3 [26]; cependant, ce phénomène (sur lequel nous reviendrons par la suite) résulte d'une série de réactions (internalisation, apprêtement de l'antigène, interaction des peptides avec les molécules de classe II...) qui font que le phénomène observé ne correspond pas forcément à une interaction directe entre C3 et les lymphocytes T.



L'établissement des cellules B mémoires en réponse à des antigènes dépendants des cellules T nécessite la présence de C3, comme l'ont montré des expériences réalisées avec des souris déficientes en cette protéine [27] : C3 doit impérativement être lié de façon covalente à l'antigène pour que celui-ci puisse être fixé par les cellules folliculaires dendritiques ; ces cellules, incapables de phagocytiser, sont en contact étroit avec les cellules B et le micro-environnement ainsi créé induirait leur différenciation en cellules mémoires. On peut envisager, par analogie avec d'autres expériences, que cette différenciation soit le résultat de divers signaux *via* les récepteurs du complément, les récepteurs Fc et les immunoglobulines de surface. D'autres observations devront être réalisées avant que puissent être interprétés de façon complète ces phénomènes.

### Rôle de C3 dans la réponse immune

Des expériences réalisées *in vivo* à l'aide d'animaux déficitaires en C3 ont montré une altération de la réponse immune, observée en particulier lorsque la quantité d'antigène injectée est faible. Ces modifications se traduisent par un taux d'anticorps spécifiques fortement réduit et une absence de commutation IgM/IgG [28]. L'utilisation de fortes quantités d'antigène induit, en revanche, une réponse normale. Des résultats globalement similaires ont été obtenus après injection de complexes CR2-Ig anti-CR2 à des souris non déficitaires en C3 : dans ces conditions, une diminution de la réponse aux antigènes injectés ultérieurement a été enregistrée, se traduisant par un taux très faible d'anticorps spécifiques de type M, G1, G2a, G2b et G3 ; ces résultats seraient dus à une compétition entre les récepteurs CR2 solubles injectés et les récepteurs membranaires normalement présents à la surface des cellules [29], diminuant les interactions entre les fragments de C3 et les cellules, ce qui empêche l'amplification de la réponse immune normalement induite par cette fixation. Ces données, non seulement mettent en évidence le rôle de C3, mais précisent aussi la nature des récepteurs impliqués dans ces interactions ; CR2

semble être l'intermédiaire prépondérant, tout au moins dans l'espèce murine.

En dehors des effets décrits dans les paragraphes précédents, du fait de leur capacité de se lier de façon covalente aux complexes immuns, les fragments de C3 peuvent favoriser l'interaction des antigènes avec les cellules présentatrices : ainsi, nous avons pu montrer par des expériences réalisées *in vitro*, utilisant des antigènes complexés ou non à C3b, que la réponse proliférative des lymphocytes T résultant de l'apprêtement de cet antigène par des lymphocytes B est obtenue pour des concentrations beaucoup plus faibles (jusqu'à 100 fois) lorsque les complexes antigène-C3b sont utilisés. Au cours de la réponse primaire, la sécrétion d'IgM spécifiques de l'antigène provoque la formation de complexes immuns fortement activateurs du complément et induit la fixation covalente de C3b sur l'antigène impliqué dans ces complexes. L'équipe de Ross (Louisville, KY, USA), en posant comme hypothèse la possibilité d'une réaction des antigènes avec des anticorps de faible activité mais à spectre large, a envisagé la formation de complexes immuns et donc la fixation de C3b même au cours de la réponse immune primaire [30]. En utilisant de la KLH comme antigène modèle, elle a montré la formation de complexes immuns puis la fixation de C3b sur ces complexes ; ce travail a été prolongé par la mise en évidence d'une plus grande fixation sur les cellules B et, dans ces conditions, d'une meilleure présentation de l'antigène. Ses résultats mettent aussi l'accent sur la nécessité d'une double signalisation *via* les récepteurs de C3 et les parties Fc des immunoglobulines, afin d'éviter les phénomènes d'anergie au niveau des lymphocytes T (figure 5).

Grâce à un modèle similaire, Chu *et al.* (Durham, NC, USA) [31] ont montré que l' $\alpha$ -2-macroglobuline (protéine très proche de C3) a un effet adjuvant *in vivo* lorsqu'elle est liée de façon covalente à un antigène ; ces expériences, réalisées chez le lapin, montrent que l' $\alpha$ -2-macroglobuline est capable de cibler l'antigène sur les cellules immunes par l'intermédiaire de ses récepteurs (CD91) et, de ce fait, accroît la réponse anti-

corps. Si la liaison covalente avec l'antigène se forme de manière identique pour l' $\alpha$ -2-macroglobuline et C3, la réactivité est cependant généralement restreinte aux protéases dans le premier cas alors que C3 peut se fixer sur tous les antigènes, quelle que soit leur nature ; C3 possède donc un spectre d'activité beaucoup plus large.

C3 peut donc, dans un premier temps, amplifier la focalisation de l'antigène sur les cellules présentatrices et, dans un second temps, modifier les étapes de l'apprêtement intracellulaire des antigènes ; cette affirmation est étayée par de récentes observations *in vitro* concernant la présentation d'immunoglobulines murines (utilisées comme antigènes) : des expériences, réalisées à l'aide de complexes covalents Ig-C3b, de lymphocytes B (cellules présentatrices d'antigène) et de clones T spécifiques, ont prouvé que seule la présentation correspondant aux épitopes de la chaîne lourde est amplifiée et non celle des épitopes situés sur la chaîne légère [32]. Or, il a été montré que dans ces complexes covalents Ig-C3b, seule la chaîne lourde fixe C3b ; ces observations suggèrent que l'influence de C3b s'étend aux étapes suivant l'internalisation et la réduction intracellulaire qui, seule, permet la séparation de la chaîne lourde et de la chaîne légère. Par ailleurs, nous avons pu montrer que le lien covalent entre C3b et l'antigène persiste en très grande partie dans les endosomes et, de façon plus restreinte, dans les lysosomes ; de plus, l'analyse de la répartition intracellulaire des antigènes après internalisation montre que l'entrée *via* les récepteurs de C3 oriente l'antigène en grande partie vers les compartiments endosomiques alors que l'accumulation des antigènes dans les lysosomes n'est pas modifiée par la fixation de C3b [33].

Quelques cas humains de déficit en C3 ont été décrits à propos desquels nous pouvons remarquer un déséquilibre sexuel puisqu'ils concernent un homme pour six femmes. Ces déficits sont en général associés à des maladies : infections pyogéniques particulièrement importantes chez les jeunes sujets, troubles liés à la présence de complexes immuns, lupus érythémateux systémique et glomérulo-

lonéphrite membranoproliférative. Ces déficits ne se traduisent pas par une modification quantitative des immunoglobulines mais qualitative (baisse des IgG particulièrement forte pour l'isotype IgG4).

## Conclusion et perspectives

Il est maintenant incontestable que le rôle de C3 et de ses fragments débordent le simple fonctionnement du système complémentaire puisqu'il intéresse de nombreuses phases de la réponse immune [34] : opsonisations, proliférations cellulaires, cytotoxicité ; C3 permet aussi la solubilisation des complexes immuns circulants, se fixe de façon covalente sur les antigènes, entraîne leur focalisation sur les lymphocytes B et intervient dans l'établissement de la mémoire immunologique. Mais il faut reconnaître que, si un schéma général d'interaction commence à se dessiner, il reste encore beaucoup d'inconnues. Il est aussi évident que, si la formation d'un lien covalent entre C3b et l'antigène potentialise la réponse immune, cette liaison peut aussi avoir des conséquences néfastes pour l'organisme. En effet, C3 favorise les interactions de l'antigène avec les cellules impliquées dans la réponse immune, mais cette relation privilégiée qui s'établit entre l'antigène et la cellule *via* le vecteur C3b peut faciliter l'invasion de l'organisme par des agents pathogènes. Ainsi, différents groupes ont montré que les protéines de l'enveloppe du virus HTLV-1 sont capables d'activer le complément [35], ce qui a pour conséquence une fixation de fragments de C3 sur le virus ; il en résulte une focalisation du virus à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> porteurs des récepteurs CR1 et CR2 [36], ce qui favorise l'infection de ces cellules. Ces résultats sont corroborés par des expériences réalisées à l'aide de différents modèles cellulaires : dans le cas de macrophages (U937), l'infection est inhibée par des anticorps anti-CR3 ; de même, des cellules T naturellement difficiles à infecter (RAJI) deviennent très sensibles au virus en présence de complément. A l'opposé de cet effet, C3 semble pouvoir aussi se déposer à la surface des cellules infectées et catalyser leur élimination par l'intermé-

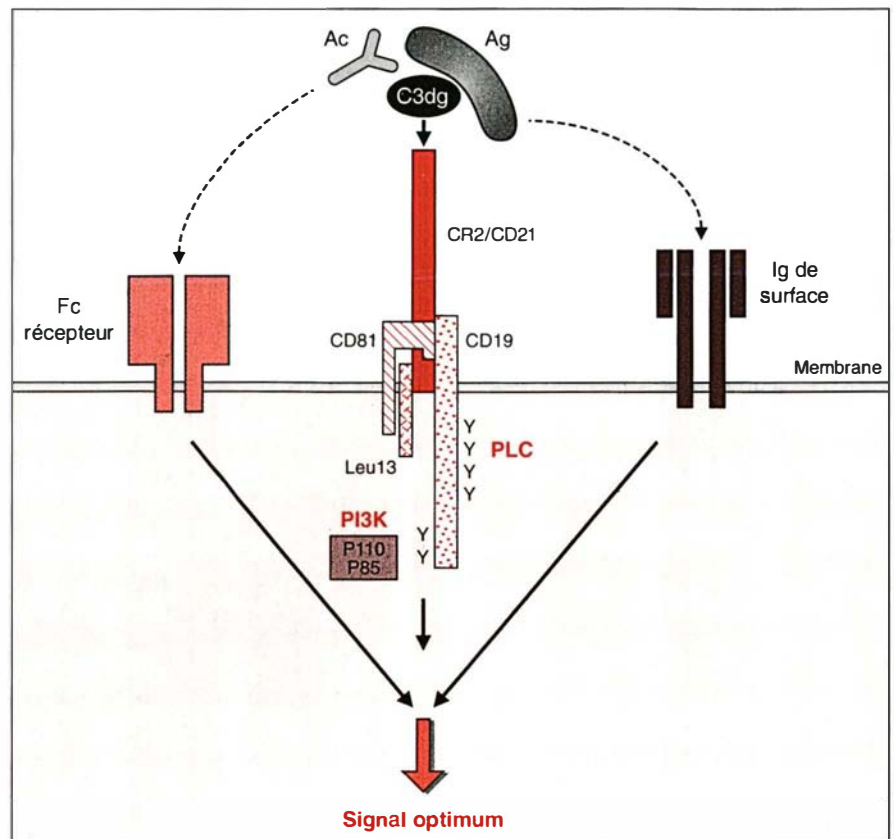


Figure 5. Représentation schématique des interactions entre CR2 et CD19, CD81 et Leu-13. Le signal correspondant d'une part à la double fixation des fragments de C3 et de l'antigène sur CR2 et les Ig de surface ou (et) d'autre part à la fixation simultanée de C3dg et des anticorps respectivement sur CR2 et les récepteurs Fc provoque une réponse optimale au niveau cellulaire. PLC : phospholipase C, PI3K : inositol-3 phosphokinase.

diaire de la voie alterne du complément [37].

En ce qui concerne le virus d'Epstein Barr, si C3 n'est pas directement impliqué, une des protéines de l'enveloppe (gp350) est capable de mimer son action et d'induire la fixation du virus sur CR2, provoquant son internalisation et donc l'infection.

Tous ces exemples démontrent qu'il est important d'approfondir nos connaissances sur C3 et sur tout ce qui est en relation avec cette protéine. L'établissement de nouveaux modèles utilisant des animaux transgéniques [38] autorisera des expériences *in vivo* qui devraient permettre d'étudier, par exemple, l'établissement des cellules mémoires ou

le rôle de C3 dans l'établissement du répertoire T. L'amélioration des connaissances concernant les différentes capacités de C3 peut aussi avoir un intérêt en dehors du monde de l'immunologie, puisqu'à différentes reprises les fragments de C3 ont été décrits comme intervenant dans d'autres systèmes, tels que la fécondation, par exemple [39].

L'interaction de C3 avec l'antigène observée même au cours de la réponse primaire est le premier élément d'une cascade de réactions qui permet la focalisation à la surface des cellules immunocompétentes, puis l'internalisation et enfin l'apprêtement de l'antigène. Toutes ces étapes doivent être analysées de façon précise

car, s'il est évident que C3 n'est pas toujours indispensable à la réponse immune, il est tout aussi évident que cette protéine représente un élément amplificateur important capable d'induire une réponse en présence de faibles concentrations d'antigène. Mieux comprendre le rôle de C3, c'est également mieux comprendre comment l'organisme se défend précocement. Cela devrait permettre de définir des outils capables d'amplifier la réponse immune et utilisables par exemple au niveau des vaccins ■

#### Remerciements

L'auteur remercie les Drs Pascale Briand, Maurice Colomb et Marie-Bernadette Villiers pour la lecture de ce manuscrit.

#### TIRÉS À PART

C. Villiers.

## Summary

### C3, a complement protein with many functions

C3 is an important protein of the complement system involved in both classical and alternative pathways. Activation of C3 results from its proteolytic cleavage which induces structural modifications in the molecule; the ensuing disruption of an intra-molecular thioester allows C3 to bind covalently, through nucleophilic groups (-OH or -NH<sub>2</sub>), to acceptors such as bacteria, cell surface, immune complexes or other proteins. Thus, covalent binding of C3 to antigen, already demonstrated in immune complexes, has important consequences on the immune response. The result of these interactions is an increased antigen-binding on, and antigen-uptake by antigen presenting cells through receptors (CR1 to CR5) specific for C3 fragments. Furthermore, C3 fragments modify the processing of these antigens in the endosomes and lysosomes: all these results are in favour of an involvement of C3 and its fragments in the

immune response. This is confirmed by experiments carried out with deficient animals indicating that C3 is implicated at different levels, such as the IgM/IgG switch and the establishment of B cell memory. C3 is also involved in the clearance of immune complexes, in phagocytosis and in cell cytotoxicity. Even the B and T cell proliferation may be increased or inhibited in relation to the aggregation or proteolysis of the C3 fragments. Due to its capacity to interact with cell receptors, C3 may also increase HIV infection of macrophages and T lymphocytes after opsonisation of the virus. The results clearly indicate that C3 and its proteolytic fragments play a role, not only in the complement system, but also in the establishment of the immune response, as an adjuvant capable of increasing the interactions between the antigen and the cells involved in its detection and elimination.