

# DÉFICIT EN COMPLÉMENT, MALADIE LUPIQUE ET APOPTOSE

par

H. T. COOK\*

Le lupus érythémateux disséminé (LED) s'accompagne de la présence d'auto-anticorps circulants dirigés contre une batterie d'auto-antigènes qui peuvent être des molécules intracellulaires, membranaires ou des protéines plasmatiques. Les complexes immuns contenant ces auto-anticorps sont présents dans les tissus atteints et s'accompagnent de dépôts de protéines du système du complément dans le rein. La plupart des patients atteints de LED ont des dépôts de complexes immuns glomérulaires. La présence de dépôts glomérulaires contenant toutes les classes d'immunoglobulines et les composés du complément, démontrés par l'étude en immunofluorescence, est caractéristique de l'atteinte glomérulaire lupique. L'existence de dépôts d'IgA, d'IgG, d'IgM, de C1q, de C4 et de C3 est caractéristique du lupus et les dépôts de C1q et de C4 sont inhabituels dans d'autres types de glomérulonéphrite et doivent toujours conduire à discuter la possibilité d'un lupus.

Parallèlement à l'existence de dépôts de complément dans les tissus atteints, les taux de complément circulant sont diminués chez la plupart des patients. Ceci est particulièrement vrai pour les composants de la voie classique, C1q, C2 et C4. Le taux de C3 est plus rarement abaissé et les taux bas de C3 sont associés aux formes sévères de la maladie. Ces résultats suggèrent que le dépôt de complexes immuns dans les glomérules et dans d'autres tissus est capable d'activer le complément par la voie classique. Les composants du complément activé jouent un rôle lésionnel par la production des opsonines C3b et C3bi, des anaphylatoxines C3a et C5a et du complexe d'attaque membranaire C5b-9.

Toutefois, ce mécanisme peut difficilement être compatible avec le fait que les déficits héréditaires des composés précoces de la voie classique sont étroitement associés à une prédisposition au lupus. De plus, l'atteinte glomérulaire peut dans

\* Département d'Histopathologie, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, London W12 0NN, UK.

certaines modèles animaux être indépendante de l'activation du complément. Nous discuterons dans cette revue les résultats récents qui suggèrent que le complément joue un rôle protecteur contre le développement d'une maladie auto-immune telle que le lupus et nous proposerons que cet effet protecteur du complément semble être lié à son rôle dans la clairance des cellules apoptotiques qui sont la source de nombreux auto-antigènes au cours du lupus.

### **Déficit génétique en protéine du complément et lupus érythémateux disséminé (LED)**

L'association entre une susceptibilité accrue au lupus et les déficits héréditaires des composés précoces de la voie classique du complément C1q, C1r, C1s, C4 et C2 a été récemment largement revue par Pickering et al [1]. La fréquence de cette association est d'autant plus grande que la protéine déficitaire intervient précocement dans la cascade de la voie classique. L'association la plus forte est observée avec les déficits en C1q.

Quarante-deux sujets atteints de déficit homozygote en C1q ont été décrits aujourd'hui. Trente-neuf d'entre eux (93 p. 100) ont une maladie de type lupique fréquemment sévère [2]. L'atteinte cutanée est observée chez 37 de ces 42 sujets, l'atteinte glomérulaire chez 16 et une atteinte neurologique centrale chez 8. Dans la plupart des cas, l'atteinte glomérulaire est une atteinte proliférative mésangiale [3].

Le déficit génétique de la voie classique le plus fréquent est le déficit homozygote en C2. Sa prévalence dans les populations caucasoïdes de l'Ouest de l'Europe est estimée à 1/20 000. À la différence des autres déficits des composés précoces de la voie classique du complément, la plupart des sujets atteints de déficit homozygote en C2 sont bien portants. Il existe cependant chez ces sujets une fréquence accrue de maladies lupiques qui touche environ 10 p. 100 des sujets déficients en C2. L'existence d'un déficit homozygote en C2 est rencontrée chez environ 1 p. 100 des patients atteints de lupus. Les manifestations du lupus chez les patients ayant un déficit en C2 sont comparables à celles qui sont observées dans les formes spontanées. Toutefois, dans les formes avec déficit en C2, l'atteinte rénale et l'atteinte cérébrale semblent moins fréquentes alors que les signes articulaires et cutanés sont plus fréquents.

Contrairement à la forte association entre lupus et déficit des composés précoces de la voie classique du complément, l'association avec le déficit en C3 est beaucoup plus faible. Un déficit en C3 homozygote a été observé chez 23 sujets dans 16 familles différentes. Une maladie de type lupique était présente chez seulement trois de ces patients. Les facteurs antinucléaires étaient négatifs dans les trois cas. Des infections bactériennes récidivantes et sévères, notamment par des germes encapsulés, sont habituelles dans les déficits en C3. L'existence d'une glomérulonéphrite avec prolifération mésangiale, probablement liée aux infections récidivantes, a été décrite dans 4 cas.

Il existe donc une association certaine entre le déficit en composés précoces de la voie classique du complément et le développement de maladies de type lupique avec dépôts glomérulaires de complexes immuns.

Quelles sont les raisons de cette association ? Une possibilité serait que l'anomalie du complément soit responsable d'un défaut d'élimination des complexes immuns. Le complément joue un rôle en maintenant les complexes immuns sous forme soluble. Ceci permet leur transport dans la circulation, à distance des sites

de l'inflammation. Chez les primates, le récepteur CR1 des érythrocytes lie les immuns complexes couverts de C3b et permet aux cellules phagocytaires mononucléées de transporter ces complexes jusqu'au foie, la rate et la moelle osseuse. En l'absence d'activation du complément, les complexes immuns pourraient être éliminés moins efficacement et se déposer dans les tissus. Ce mécanisme pourrait aggraver les lésions tissulaires du lupus. À l'inverse le rôle du déficit en complément dans l'apparition des auto-anticorps observés chez les patients atteints de lupus n'a pas été établi. Les relations entre auto-immunité et déficit en complément sont susceptibles de bénéficier de l'étude des modèles animaux et, en particulier, des souris déficientes pour certains composants du complément.

### Souris déficientes en complément

Des souris déficientes en C1q ont été obtenues par recombinaison homologue du premier exon de la chaîne C1qA [4]. Ceci a donné une souris qui n'a pas de transcript C1qA détectable en Northern blot et qui n'a pas de protéine C1q circulante détectable soit par Western blot, soit par ELISA ou par tests fonctionnels. Ces souris gardent une voie alterne normale.

Les souris déficientes en C1q ont tendance à développer une maladie auto-immune de type lupique. Nous avons étudié une importante cohorte de 226 souris *C1qa*<sup>-/-</sup> et de 108 souris contrôle de type sauvage, de background génétique 129 × C57BL/6. Les souris de type sauvage ayant ce background génétique ont une prédisposition à l'auto-immunité. Cette prédisposition était augmentée par le déficit en C1q. Ainsi, à l'âge de 8 mois, 54 p. 100 des souris déficientes en C1q avaient des facteurs antinucléaires (FAN) élevés et 25 p. 100 avaient des signes histologiques de glomérulonéphrite par dépôts de complexes immuns alors que ces anomalies histologiques n'étaient observées que chez 4 p. 100 des souris-contrôles ( $p < 0,0001$ ). Les lésions glomérulaires chez ces souris consistaient en une prolifération cellulaire principalement mésangiale mais également capillaire. Des croissants cellulaires étaient observés chez les souris les plus sévèrement atteintes. Il existait des dépôts d'IgG et de C3 et l'étude en microscopie électronique confirmait la présence de dépôts denses aux électrons mésangiaux, sous-endothéliaux et extramembraneux. La présence de C3 dans les glomérules et l'absence de C1q suggéraient qu'il existait chez ces souris une activation de la voie alterne.

La grande quantité de corps apoptotiques présents dans les glomérules atteints constitue un fait frappant. L'augmentation des corps apoptotiques chez les souris déficientes en C1q n'était pas seulement liée à l'inflammation glomérulaire. En effet, le nombre de corps apoptotiques présents dans les glomérules non lésés chez les souris déficitaires en C1q était significativement élevé par rapport à celui observé dans les glomérules des souris contrôle. Ceci suggérait qu'il existait chez les souris déficientes en C1q un défaut de clairance des cellules apoptotiques. Les relations possibles entre ce défaut de clairance et la survenue de l'auto-immunité sont discutées plus bas.

Lorsque le déficit en C1q était induit chez des souris de lignée pure C57BL/6, il n'existait pas de signe de maladie auto-immune ou de glomérulonéphrite. Cependant, le déficit en C1q entraînait une augmentation de la fréquence des auto-anticorps et des lésions de glomérulonéphrite lorsque ces souris étaient croisées avec des souris de la lignée MRL/Mp (observation non publiée). Ces souris MRL/Mp, comme les souris hybrides 129 × 57BL/6, ont tendance à développer des maladies

auto-immunes. Ceci indique que, chez la souris au moins, le déficit en C1q n'est pas suffisant à lui seul pour entraîner une réponse auto-immune mais que ceci requiert la présence d'autres facteurs génétiques prédisposants.

Le ciblage génique a été utilisé pour produire des souris déficitaires à la fois en C2 et en facteur B de la voie alterne [5] (souris *H2-BfC2*<sup>-/-</sup>). Ces souris sont générées sur un background génétique mixte 129 × C57BL/6 et ont également été croisées avec *C1qa*<sup>-/-</sup> pour générer des souris *C1qa/H2-BfC2*<sup>-/-</sup> déficitaires dans les trois composants du complément. À l'âge de 8 mois, les facteurs antinucléaires de classe IgG étaient présents chez 40 p. 100 des souris *C1qa/H2-BfC2*<sup>-/-</sup> et seulement chez 4 p. 100 des souris de type sauvage et chez 1 p. 100 des souris *H2-BfC2*<sup>-/-</sup>. Une glomérulonéphrite était présente chez 64 p. 100 des souris *des C1qa/H2-Bf/c2*<sup>-/-</sup> à 8 mois alors qu'elle n'était observée que chez 8 p. 100 des *H2-BfC2*<sup>-/-</sup> et chez aucune des souris de type sauvage. Ces résultats montrent, que sur ce background génétique, les déficits en facteur C2 et en facteur B ne prédisposent pas à l'auto-immunité mais que le déficit en C1q est capable d'entraîner une réponse auto-immune, même en l'absence d'une activation du C3. Les souris déficitaires en C1q, C2 et facteur B ont, comme les souris déficitaires en C1q de façon isolée, un nombre augmenté de corps apoptotiques glomérulaires. Ceci suggère que le rôle du C1q dans la clairance des cellules apoptotiques est indépendant de l'activation du C3.

Ces souris permettent également de préciser le rôle du complément dans le développement de l'inflammation glomérulaire. Les souris déficitaires en C1q avaient des lésions de glomérulonéphrite proliférative avec dépôts d'IgG et de C3 glomérulaires. Les souris déficitaires en C1q, C2 et facteur B montraient des dépôts glomérulaires d'IgG abondants mais pas de C3 détectable. Malgré cela, ces souris avaient une hypercellularité glomérulaire modérée ou sévère avec des dépôts denses aux électrons en microscopie électronique, à la fois mésangiaux et sous-endothéliaux. Ainsi, la glomérulonéphrite lupique peut se développer indépendamment de l'activation du complément. Ces résultats vont dans le même sens que ceux qui ont suggéré que les récepteurs pour le fragment Fc jouaient un rôle primordial dans le développement de la néphrite lupique. Les souris NZB/NZW constituent un modèle de néphrite lupique spontanée. Ces souris produisent des anticorps anti-ADN et ont une glomérulonéphrite qui conduit à la mort vers l'âge de 6 mois. Ces souris sont croisées avec des souris dépourvues de la chaîne gamma du récepteur pour le Fc. Elles sont alors incapables de mettre en jeu l'activation dépendante du Fc $\gamma$ RI ou Fc $\gamma$ RIII [6]. Chez les souris NZB/NZW dépourvues de la chaîne gamma du récepteur Fc, il existait une augmentation significative de la survie et une diminution de la fréquence de la protéinurie. Dans ces modèles de souris lupiques, les glomérules montraient des lésions histologiques et une prolifération cellulaire moindre, malgré que les dépôts d'IgG et de C3 observés dans les deux groupes étaient équivalents. Ces résultats suggèrent que le mécanisme principal des lésions glomérulaires est le dépôt des IgG avec activation du récepteur Fc qui est présent à la fois à la membrane des leucocytes circulants, mais également à la membrane des cellules glomérulaires mésangiales résidentes. L'activation du C3 ne semble ni nécessaire, ni suffisante pour produire des lésions histologiques typiques de glomérulonéphrite lupique.

Le déficit en C4 est capable d'entraîner une réponse auto-immune chez la souris. Chen et al [7] ont étudié des souris C4 déficientes sur un background hybride B6/129. Ces auteurs ont trouvé que toutes les souris femelles et la plupart des souris mâles développaient des facteurs antinucléaires vers l'âge de 10 mois. Une

glomérulonéphrite par dépôts de complexes immuns (IgG et C3) était observée chez la moitié des souris femelles C4 déficientes. L'effet du déficit en C4 a également été étudié chez des souris déficientes en Fas [8]. Les souris C57BL/6.*lpr/lpr* déficientes en Fas développent une maladie d'allure lupique, de gravité modérée et produisent des auto-anticorps sans atteinte glomérulaire. Lorsque les souris déficientes en C4 sont croisées avec les souris C57BL/6.*lpr/lpr*, ces souris ont une augmentation des taux de facteurs antinucléaires et d'anticorps anti-ADN natifs associés à une prolifération cellulaire glomérulaire avec des dépôts glomérulaires d'IgG et de C3. À l'inverse, les souris déficientes en C3, croisées de la même manière, ne produisent pas d'auto-anticorps et n'ont que des dépôts discrets d'IgG glomérulaires. Il n'existe aucune observation montrant la prédisposition auto-immune des souris déficientes en C3.

### Apoptose et LED

Il est de plus en plus vraisemblable que les cellules apoptotiques sont la source des auto-antigènes qui induisent la production d'auto-anticorps chez des sujets génétiquement prédisposés au lupus. Les auto-antigènes peuvent être classés en 3 catégories. Premièrement, les antigènes intracellulaires qui incluent différentes nucléoprotéines, certaines d'entre elles contenant de l'ADN (nucléosomes) et d'autres contenant de l'ARN (notamment les petites ribonucléoprotéines, les ribonucléoprotéines cytoplasmiques, le complexe ribonucléoprotéine cytoplasmique Ro/La et les ribosomes). Deuxièmement, les antigènes membranaires, notamment les phospholipides de la membrane cellulaire telles que la phosphatidylsérine. Troisièmement, certaines protéines plasmatiques telles que la bêta-2-glycoprotéine 1 et le C1q. La question importante est donc de comprendre pourquoi une famille particulière de protéines est cible auto-antigénique dans le LED. Il est possible qu'il s'agisse d'un groupe de protéines qui deviendrait accessible à la surface de la cellule apoptotique et qui, en interagissant les unes avec les autres, pourrait jouer un rôle au cours de l'apoptose.

Cette hypothèse a été confortée par l'observation que les kératinocytes humains en culture, irradiés par des rayons UV, expriment des antigènes de surface qui sont capables de lier les auto-anticorps circulants présents chez les patients atteints de LED [9]. En effet, les antigènes SSA/Ro, RNP et Sm sont rendus accessibles à la surface de ces cellules par le traitement UV et sont alors capables de lier les auto-anticorps correspondants. Ces cellules traitées par les UV gardent leur intégrité membranaire mais sont clairement engagées dans la voie de l'apoptose. Il est intéressant de noter que la quantité d'irradiations UV nécessaire pour entraîner l'expression de ces antigènes sur les kératinocytes en culture était plus faible lorsque les cellules cultivées provenaient de patients ayant un LED en rémission par rapport à des cellules cultivées à partir de sujets normaux [10].

La translocation des antigènes intracellulaires à la surface des kératinocytes irradiés par les UV a été étudiée en détail par Rosen et collaborateurs [11]. Ces auteurs ont montré qu'après 6 heures d'irradiation UV, les kératinocytes montraient des modifications morphologiques du type apoptotique. Au cours de l'apoptose, on observe une succession d'évènements : condensation nucléaire, soufflure membranaire, contraction cytoplasmique, isolement des composants cellulaires par les membranes suivi de leur extrusion de la cellule sous forme de corps apoptotique. L'examen morphologique des kératinocytes apoptotiques a montré qu'il existait

deux types de boursouflures membranaires : les unes nombreuses, de petite taille, et les autres plus rares, de grande taille. Les boursouflures de petite taille sont fortement marquées par l'iodure de propidium et ce marquage peut être aboli par la ribonucléase, ce qui indique un contenu en ARN.

L'étude en immunofluorescence a montré que ces petites boursouflures contenaient de grandes quantités de protéines Ro, alors que le marquage cytoplasmique observé dans des cellules normales était beaucoup moins intense. Les petites boursouflures contiennent également des protéines du réticulum endoplasmique et des granules compatibles avec des ribosomes en microscopie électronique. À l'inverse, les boursouflures membranaires de plus grande taille contenaient des fragments nucléaires condensés et de l'ADN. Ces boursouflures fixaient les anticorps anti-La et anti-U1-RNP et également les anticorps dirigés contre le triméthylguanosine (TMG) qui sont fréquemment observés dans le lupus et qui reconnaissent les modifications en 5' de l'ARN lors de l'épissage. Au total, cette étude a montré que la plupart des auto-antigènes du lupus était localisée dans des structures de surface des cellules apoptotiques.

Par ailleurs, en plus des anticorps reconnaissant les antigènes intracellulaires, un tiers environ des patients atteints de LED ont des anticorps dirigés contre des phospholipides et particulièrement contre la phosphatidylsérine, un phospholipide de la membrane cellulaire négativement chargé. Cet antigène est présent dans le feuillet interne de la membrane cellulaire des cellules normales et subit une translocation active vers la couche externe de la membrane dans les cellules lors de l'apoptose [12, 13]. La phosphatidylsérine, présente à la surface des cellules apoptotiques, joue un rôle important comme molécule de reconnaissance lors de l'élimination de ces cellules.

Le pouvoir immunogène des cellules apoptotiques et leur capacité à induire la production des auto-anticorps ont été démontrés chez la souris immunisée par des cellules apoptotiques [14]. Des souris ont été immunisées de façon hebdomadaire durant 4 semaines par des thymocytes syngéniques apoptotiques ou par des thymocytes ou des cellules spléniques normales. Les souris injectées par des cellules apoptotiques produisaient des anticorps contre l'ADN simple brin et la cardioline. Ces souris avaient également des dépôts d'IgG glomérulaires. Ces dépôts n'étaient pas observés chez les souris non immunisées contrôles ou chez les souris immunisées par des cellules spléniques. Cependant, on observait quelques dépôts glomérulaires d'IgG chez les souris immunisées par des thymocytes lysés, mais il n'y avait pas de protéinurie chez aucune des souris étudiées.

Ainsi, il existe des éléments de preuve que les antigènes reconnus au cours du LED sont exprimés à la surface des cellules apoptotiques et que, dans certaines circonstances d'immunisation par ces cellules, une auto-immunité peut être induite.

Dans la mesure où il existe un renouvellement rapide des cellules apoptotiques dans l'organisme, la question se pose de savoir quelles anomalies conduisent à une réponse auto-immune contre des antigènes aussi largement répandus. Il est possible que les antigènes des cellules apoptotiques soient modifiés et qu'apparaissent des néo-épitopes [15]. Il est également possible que les cellules apoptotiques soient présentées avec les antigènes viraux et que la proximité d'antigènes self et non self conduise à la rupture de tolérance [16]. Une autre possibilité est qu'il existe une anomalie de fonction des mécanismes conduisant à l'élaboration des cellules apoptotiques. Les mécanismes permettant l'élimination des cellules apoptotiques

sont extrêmement efficaces. Ils permettent une élimination rapide sans induire de réponse inflammatoire. C'est en effet une caractéristique particulière de l'apoptose qui, à l'inverse de la nécrose, est un événement silencieux, en ce sens qu'elle n'induit pas d'inflammation. Il existe de nombreuses molécules à la surface des cellules apoptotiques qui permettent leur reconnaissance, à la fois par des phagocytes spécialisés mais également par d'autres types cellulaires. De nombreux récepteurs permettant l'élimination des cellules apoptotiques ont été identifiés. Ces récepteurs incluent le récepteur pour la phosphatidylsérine [17], le récepteur pour la vitronectine ( $\alpha_v\beta_3$ ), CD36 [19], CD14 [20], le scavenger receptor A [21]. Comme nous le discuterons plus bas, le complément semble également jouer un rôle important dans l'élimination des cellules apoptotiques.

Un défaut de clairance des cellules apoptotiques par les mécanismes physiologiques normaux pourrait avoir deux conséquences susceptibles de promouvoir une réponse auto-immune. Premièrement, le défaut de phagocytose des cellules apoptotiques par des cellules résidentes (comme par exemple les cellules mésangiales glomérulaires) ou par les macrophages tissulaires, peut conduire les débris cellulaires apoptotiques à être phagocytés par les cellules dendritiques et ainsi présentés aux lymphocytes T. Les cellules dendritiques immatures sont capables d'ingérer les cellules apoptotiques et de présenter les antigènes dérivés de ces cellules aux lymphocytes T restreints aux complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II [22, 23]. Toutefois, si les cellules dendritiques immatures sont bien capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T, elles nécessitent pour cela d'autres signaux capables d'induire leur maturation ainsi que l'expression du MHC et des molécules de co-stimulation. Ces signaux incluent les médiateurs de l'inflammation, notamment les molécules typiquement associées avec les infections comme le LPS, les cytokines du type TNF- $\alpha$  et interféron- $\gamma$ . La phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages entraîne une diminution de synthèse des médiateurs inflammatoires ainsi qu'une synthèse accrue de molécules anti-inflammatoires comme le TGF $\beta$ 1, la PGE $_2$  et l'IL-10 [24, 25]. Il est possible que le défaut de clairance des cellules apoptotiques par les mécanismes normaux puisse également conduire à un défaut de la génération de cytokines immunosuppressives qui sont normalement produites. Dans certaines circonstances, ceci pourrait conduire à la fois à la phagocytose des cellules apoptotiques par les cellules dendritiques et à la maturation des cellules dendritiques en cellules capables de présenter les antigènes cellulaires apoptotiques aux cellules T, éventuellement conduisant finalement au développement d'une réponse auto-immune.

### **Rôle du complément dans l'élimination des cellules apoptotiques**

Le complément pourrait jouer un rôle dans la clairance des cellules apoptotiques comme le suggère l'observation que le C1q a la propriété de se lier à la surface des cellules apoptotiques [26]. Korb et Ahearn ont induit l'apoptose de kératinocytes humains en culture et ont montré que ces cellules, incubées avec du sérum humain, pouvaient lier le C1q. Observé en microscopie confocale, le C1q se localisait à la surface des boursofflures membranaires apoptotiques. La liaison membranaire était également observée après incubation avec du C1q purifié, montrant que cette liaison était indépendante de l'anticorps. Nous avons récemment démontré *in vitro* que le C1q se liait aux kératinocytes apoptotiques de la peau des souris irradiées par les UV (Pickering et al, texte soumis).

Comme nous en avons discuté plus haut, les souris déficitaires en C1q ont un nombre accru de corps apoptotiques dans les glomérules. Ceci suggère qu'il existe chez ces souris une défaillance de la clairance tissulaire normale rapide des cellules apoptotiques. Nous avons donc étudié *in vivo* la clairance des cellules apoptotiques chez ces souris et chez les souris déficitaires en C3 et en C4 [27]. Nous avons injecté des cellules apoptotiques dans la cavité péritonéale et mesuré la vitesse à laquelle ces cellules étaient ingérées, soit par des macrophages péritonéaux résidents soit par des macrophages inflammatoires qui avaient rejoint la cavité péritonéale, après injection de thioglycollate, 4 jours auparavant. Nous avons observé que les macrophages inflammatoires induits éliminaient très rapidement les cellules apoptotiques. En effet, après 15 minutes, 50 p. 100 environ des macrophages péritonéaux avaient ingéré des corps apoptotiques et le nombre de cellules apoptotiques libres dans la cavité péritonéale était inférieur au tiers de celui présent au moment de l'injection. Chez les souris déficitaires en C1q, la vitesse d'ingestion des cellules apoptotiques et le nombre de macrophages ayant ingéré des corps apoptotiques étaient réduits au cours des 30 premières minutes suivant l'injection. Il est important de noter que ce phénomène était indépendant de la lignée génétique de la souris étudiée (C57BL/6, 129 Sv ou C57BL/6 × 129/Sv) et que le déficit en C1q n'avait pas d'effet sur le recrutement des macrophages dans la cavité péritonéale. Lorsque les thymocytes de souris apoptotiques étaient utilisés comme cellules cibles, nous avons observé que la vitesse de phagocytose était diminuée chez les souris déficientes en C1q ainsi qu'en C4, mais que ce déficit était plus important chez les souris déficientes en C1q. Ceci implique que, quoique capable d'intervenir par le biais d'une activation de la voie classique, le C1q pourrait également jouer un rôle spécifique indépendant de cette activation. Nous avons confirmé que le déficit en C1q était directement en cause dans la diminution de l'ingestion des cellules apoptotiques en montrant que ce défaut pouvait être corrigé, chez les animaux déficients en C1q, par la pré-incubation des cellules apoptotiques dans du sérum normal, mais pas dans du sérum déficient en C1q. Il n'a pas été possible d'étudier le rôle du C3 dans l'élimination des cellules apoptotiques dans ces modèles puisque les souris déficitaires en C3 ne sont pas capables de recruter des neutrophiles ou des macrophages à la suite d'une injection intrapéritonéale de thioglycollate. Nous avons donc étudié l'ingestion des thymocytes apoptotiques par des macrophages péritonéaux résidents chez les souris de type sauvage ou chez les souris déficitaires en C1q, C3 ou C4. Dans ces expériences, seules les souris déficitaires en C1q avaient un défaut constant d'élimination des cellules apoptotiques confirmant à nouveau un rôle indépendant du C1q. Ces observations sont la première démonstration de l'existence d'un défaut de phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages dans un modèle *in vivo* chez un mammifère. Ces résultats apportent des éléments supplémentaires, confortant l'hypothèse que le défaut d'élimination des cellules apoptotiques chez les souris déficientes en C1q pourrait être en cause dans le développement d'une réponse auto-immune dirigée contre une famille d'antigènes présente à la surface des cellules apoptotiques.

Nous avons également cherché s'il existait un défaut identique d'élimination des cellules apoptotiques chez les humains déficients en C1q. Nous avons mis en culture des macrophages dérivés de monocytes provenant de trois sujets ayant un déficit héréditaire en C1q. Nous avons étudié la phagocytose des cellules T Jurkat apoptotiques en comparaison avec des sujets normaux. Après 60 minutes, il existait une diminution significative de l'ingestion des cellules apoptotiques par les

macrophages déficitaires en C1q. Ce défaut était corrigé par l'addition de C1q purifié.

D'autres éléments permettent de penser que le défaut d'ingestion des cellules apoptotiques serait un phénomène général au cours du LED et qu'il ne serait pas limité aux cas où est observé un déficit en complément. Ainsi, Herrmann et al [28] ont montré qu'il existait une diminution de l'ingestion des cellules apoptotiques autologues aussi bien qu'hétérologues par les cellules mononucléées du sang périphérique en culture provenant de patients atteints de LED.

### Élimination des auto-antigènes et lupus

Les résultats que nous avons décrits ici confortent l'hypothèse que les déficits de la voie classique du complément, notamment du C1q, favorisent la survenue d'une maladie de type LED en raison d'un défaut de la clairance normale des cellules apoptotiques. D'autres modèles animaux mettent en évidence le rôle d'autres protéines impliquées dans l'élimination des débris cellulaires et dont le déficit pourrait conduire au développement d'une réponse auto-immune.

Le composant amyloïde P du sérum (SAP) est une protéine sérique qui se lie à la chromatine, favorise sa solubilisation et peut ainsi rendre la chromatine inaccessible à l'appareil immunitaire. *In vivo*, il a été démontré que la SAP se liait à la surface des cellules apoptotiques et des débris cellulaires libérés au cours de la nécrose cellulaire [29]. Les souris dont le gène de la SAP a été invalidé développent des auto-anticorps contre la chromatine, l'ADN et les histones. Ces souris ont une glomérulonéphrite proliférative par dépôts de complexes immuns [30]. Une prédisposition comparable à l'auto-immunité a été observée chez des souris déficientes en DNase1 [31]. La DNase1 est la nucléase du sérum la plus représentée. Elle est vraisemblablement nécessaire pour l'élimination de l'ADN provenant des antigènes nucléaires libérés par les cellules à renouvellement rapide. Des souris déficitaires en DNase1 ont une maladie lupique avec des facteurs antinucléaires circulants et une glomérulonéphrite par dépôts de complexes immuns. Finalement, des souris dépourvues d'IgM sécrétée, mais capables d'exprimer l'IgM de surface et de produire les autres classes d'immunoglobulines ont été développées [32, 33]. Ces souris produisent spontanément des IgG à activité auto-anticorps anti-ADN double brin et ont des dépôts glomérulaires d'IgG et de C3 [32]. Lorsque ces souris sont croisées avec la lignée de souris spontanément auto-immune MRL/*lpr*, elles ont aussi une plus grande fréquence des FAN et des lésions de glomérulonéphrite par rapport à la lignée parentale [33]. Ce fait pourrait être lié à ce que le mécanisme d'élimination des débris cellulaires par les anticorps IgM autoréactifs serait défaillant chez ces souris et favoriserait le développement d'une réponse auto-immune.

### Conclusion

Les travaux récents ont fondamentalement renouvelé notre compréhension du rôle du complément dans le lupus. Le complément était traditionnellement considéré comme un médiateur de la lésion tissulaire. Cependant, il est maintenant clair qu'au moins dans le glomérule, les lésions typiques de glomérulonéphrite lupique peuvent se développer en l'absence d'activation du complément. Il existe maintenant des

preuves que le complément joue également un rôle protecteur dans le LED et qu'il appartient à un plus grand groupe de protéines dont la fonction est de faciliter l'élimination des débris provenant des cellules apoptotiques et des cellules mortes. Cette élimination prévient l'induction d'une réponse auto-immune à l'encontre de ces débris.

## Remerciements

Nous remercions très vivement le Professeur Philippe Lesavre qui a bien voulu se charger de la traduction de ce texte.

## BIBLIOGRAPHIE

1. PICKERING MC, BOTTO M, TAYLOR PR ET AL. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency and apoptosis. *Adv Immunol*, 2000; **76**: 227-324.
2. WALPORT MJ, DAVIES KA, BOTTO M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology*, 1998; **199**: 265-285.
3. LHOTTA K, THOENES W, GLATZL J ET AL. Hereditary complete deficiency of the fourth component of complement: effects on the kidney. *Clin Nephrol*, 1993; **39**: 117-124.
4. BOTTO M, DELL'AGNOLA C, BYGRAVE A ET AL. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nature Genet*, 1998; **19**: 56-59.
5. TAYLOR PR, NASH JT, THEODORIDIS E ET AL. A targeted disruption of the murine complement factor B gene resulting in loss of expression of three genes in close proximity, factor B, C2 and D17H6S45. *J Biol Chem*, 1998; **273**: 1699-1704.
6. CLYNES R, DUMITRU C, RAVETCH JV. Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science*, 1998; **279**: 1052-1054.
7. CHEN ZB, KORALOV SB, KELSOE G. Complement C4 inhibits systemic autoimmunity through a mechanism independent of complement receptors CR1 and CR2. *J Exp Med*, 2000; **192**: 1339-1351.
8. PRODEUS AP, GOERG S, SHEN LM ET AL. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity*, 1998; **9**: 721-731.
9. LEFEBER WP, NORRIS DA, RYAN SR ET AL. Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J Clin Invest*, 1984; **74**: 1545-1551.
10. GOLAN TD, ELKON KB, GHARAVI AE ET AL. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest*, 1992; **90**: 1067-1076.
11. CASCIOLA-ROSEN LA, ANHALT G, ROSEN A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*, 1994; **179**: 1317-1330.
12. FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA ET AL. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 1992; **148**: 2207-2216.
13. CASCIOLA-ROSEN L, ROSEN A, PETRI M ET AL. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; **93**: 1624-1629.
14. MEVORACH D, ZHOU JL, SONG X ET AL. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med*, 1998; **188**: 387-392.
15. CASCIOLA-ROSEN LA, ANDRADE F, ULANET D ET AL. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med*, 1999; **190**: 815-825.

16. ROSEN A, CASCIOLA-ROSEN L, AHEARN J. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med*, 1995; **181**: 1557-1561.
17. FADOK VA, BRATTON DL, ROSE DM ET AL. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 2000; **405**: 85-90.
18. SAVILL J, DRANSFIELD I, HOGG N ET AL. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature*, 1990; **343**: 170-173.
19. REN Y, SILVERSTEIN RL, ALLEN J ET AL. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med*, 1995; **181**: 1857-1862.
20. DEVITT A, MOFFATT OD, RAYKUNDALIA C ET AL. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, 1998; **392**: 505-509.
21. PLATT N, SUZUKI H, KURIHARA Y ET AL. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; **93**: 12456-12460.
22. ALBERT ML, PEARCE SF, FRANCISCO LM ET AL. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36 and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1998; **188**: 1359-1368.
23. INABA K, TURLEY S, YAMAIDE F ET AL. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med*, 1998; **188**: 2163-2173.
24. FADOK VA, BRATTON DL, KONOWAL A ET AL. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2 and PAF. *J Clin Invest*, 1998; **101**: 890-898.
25. VOLL RE, HERRMANN M, ROTH EA ET AL. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 1997; **390**: 350-351.
26. KORB LC, AHEARN JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes. Complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol*, 1997; **158**: 4525-4528.
27. TAYLOR PR, CARUGATI A, FADOK VA ET AL. A hierarchical role for classical pathway complement protein in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med*, 2000; **192**: 359-366.
28. HERRMANN M, VOLL RE, ZOLLER OM ET AL. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1998; **41**: 1241-1250.
29. HINTNER H, BOOKER J, ASHWORTH J ET AL. Amyloid P component binds to keratin bodies in human skin and to isolated keratin filament aggregates in vitro. *J Invest Dermatol*, 1988; **91**: 22-28.
30. BICKERSTAFF MC, BOTTO M, HUTCHINSON WL ET AL. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. *Nature Med*, 1999; **5**: 694-697.
31. NAPIREI M, KARUNSKY H, ZEVIK B ET AL. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nature Genet*, 2000; **25**: 177-181.
32. EHRENSTEIN MR, COOK HT, NEUBERGER MS. Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M predisposes to development of IgG autoantibodies. *J Exp Med*, 2000; **191**: 1253-1257.
33. BOES M, SCHMIDT T, LINKEMANN K ET AL. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; **97**: 1184-1189.