

Les récepteurs des anaphylatoxines C3a (C3aR) et C5a (C5aR)

Sakina Sayah
Patrick Leon
Philippe Chan
Marc Fontaine

L'ancienneté du système du complément, dont le rôle principal est la défense antibactérienne de l'organisme, a fait envisager l'implication de certains de ses composants dans des fonctions non immunes au sein des tissus. Les anaphylatoxines C3a et C5a, peptides libérés lors de l'activation du complément, sont des médiateurs prépondérants de l'inflammation. La distribution très large de leurs récepteurs respectifs, C3aR et C5aR, indique que ces deux peptides pourraient exercer d'autres activités au sein des tissus. Le C5aR, présent à la surface de cellules non myéloïdes dans le foie, le poumon et le cerveau, semble jouer un rôle majeur dans la défense antimicrobienne au sein du poumon. Inversement, l'interaction de C5a avec son récepteur aurait un effet délétère dans le rein et les articulations lors de glomérulonéphrites ou d'arthrites inflammatoires. Le clonage récent de l'ADNc du C3aR a déjà permis d'entrevoir une large distribution cellulaire et tissulaire de ce récepteur, non limitée aux cellules immunes.

Le complément est un des plus anciens systèmes de défense de l'organisme contre les agents pathogènes, un système primitif du complément ayant été décrit chez les invertébrés [1]. Outre le rôle premier du complément dans l'élimination des micro-organismes, il est maintenant admis que ce système participe non seulement à de nombreuses fonctions dans les réponses immunes et inflammatoires, mais également à des phénomènes d'activation et de prolifération cellulaire hors du système immunitaire [2]. Chez les vertébrés supérieurs, le complément est composé d'une vingtaine de protéines plasmatiques s'organisant en deux voies d'activation (voie classique et

voie alterne), et une voie effectrice qui aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire. A ces composants solubles, s'ajoutent cinq protéines membranaires régulatrices et plusieurs récepteurs spécifiques de fragments du complément [3]. Une des conséquences biologiques majeures de l'activation du système du complément est la libération de trois peptides cationiques C3a, C4a et C5a, regroupés sous le terme d'anaphylatoxines. Ces peptides ont ainsi été nommés à la suite d'études qui ont démontré que leur injection chez l'animal induisait une réponse anaphylactique. Les fragments C3a, C4a et C5a sont des produits biologiquement actifs provenant respectivement du clivage des protéines C3, C4 et C5

ADRESSES

S. Sayah: *allocataire MESR*. P. Leon: *docteurant*. P. Chan: *ingénieur de recherche à l'Inserm*. M. Fontaine: *directeur de recherche à l'Inserm*. Institut fédératif de recherches multidisciplinaires sur les peptides IFRMP n° 23, Inserm U. 78, 543, chemin de la Bretèque, BP 73, 76233 Bois-Guillaume Cedex, France.

TIRÉS À PART

S. Sayah.

du complément (*figure 1*). Les anaphylatoxines C3a et C5a sont les deux plus importantes compte tenu de leurs activités biologiques. Outre leur capacité d'induire un choc anaphylactique, ces peptides interviennent dans la réponse inflammatoire en provoquant la contraction des muscles lisses, la vasodilatation et l'augmentation de perméabilité vasculaire.

L'anaphylatoxine C5a est également un puissant agent chimiotactique pour les neutrophiles et les monocytes. Relâchée au niveau du site lésé, C5a provoque, notamment, la libération d'histamine par les mastocytes, la production d'anions superoxydes et la libération d'enzymes hydrolytiques par les neutrophiles, et favorise la phagocytose par les macrophages. En augmentant la libération de protéines toxiques et de réactifs oxygénés, C5a active également les éosinophiles [4]. Enfin, la stimulation de macrophages par C5a entraîne la sécrétion d'interleukine-1 [5]. Les propriétés de l'anaphylatoxine peuvent être partiellement inhibées après clivage de l'arginine carboxy-terminale par une carboxypeptidase sérique (génération du C5a-desarg). L'anaphylatoxine C5a exerce ses effets biologiques par liaison à un récepteur spécifique, le C5aR, présent à la surface des polynucléaires et des monocytes. Le clonage de l'ADNc du C5aR chez l'homme et la souris a déclenché de nombreuses recherches sur les caractéristiques biochimiques de la liaison C5a-C5aR, et l'étude des diverses voies de transmission des signaux intracellulaires induits par la liaison de C5a à son récepteur. En effet, les résultats obtenus dans ce domaine élargissent considérablement le champ d'action de l'anaphylatoxine C5a. Le récepteur C5aR ayant été caractérisé à la surface des polynucléaires et des monocytes, l'idée générale restait celle d'une expression restreinte aux cellules de la lignée myéloïde [9-11]. Récemment, le C5aR a été décrit à la surface de cellules non myéloïdes du foie et du poumon [12], et au niveau des cellules gliales du système ner-

veux central, astrocytes et microglie [13-15]. La mise en évidence du C5aR sur de nouveaux types cellu-

lares, ainsi que les résultats obtenus par l'équipe de Höpken *et al.* (Boston, MA, USA) sur des souris généti-

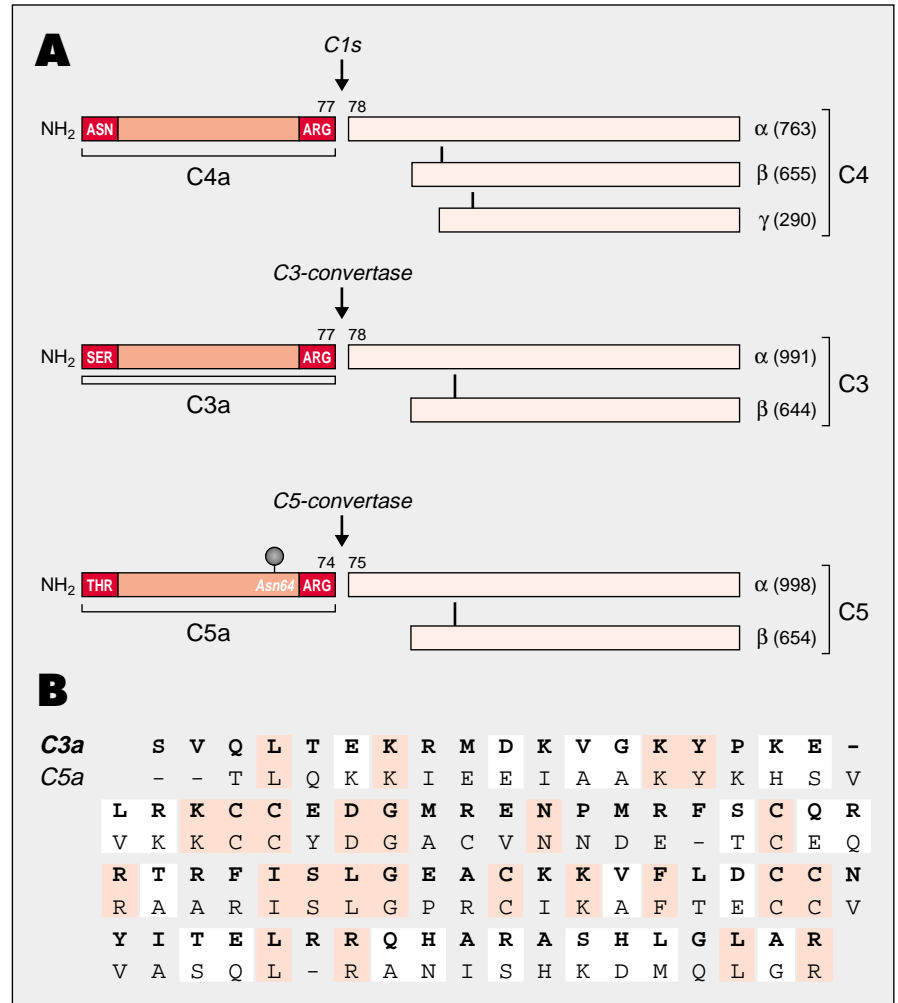


Figure 1. Formation des anaphylatoxines. A. Les anaphylatoxines C4a, C3a et C5a sont libérées par clivage de la chaîne α des composants C4, C3 et C5 du complément. Le schéma représentant les chaînes de C4, C3 et C5 n'étant pas proportionnel à leur longueur, le nombre d'acides aminés est indiqué pour chaque chaîne entre parenthèses. L'anaphylatoxine C4a, libérée après action du composant C1s du complément, correspond aux 77 acides aminés aminotermiaux du C4. L'anaphylatoxine C3a, peptide de 77 acides aminés, est détachée du C3 par une C3-convertase. L'anaphylatoxine C5a, peptide de 74 acides aminés, est formée par clivage du C5 après action d'une C5-convertase. Alors que C3a et C4a sont des peptides non glycosylés, C5a contient un résidu oligosaccharidique au niveau de l'asparagine 64 (indiqué par un cercle). Les trois anaphylatoxines possèdent une arginine carboxy-terminale, responsable de leur propriété spasmogénique. Les anaphylatoxines C3a et C5a sont les plus importantes compte tenu de leurs fonctions biologiques. À même concentration C5a est 10 à 20 fois plus actif que C3a et présente un spectre d'activités biologiques beaucoup plus large. Cependant, lors de l'activation du complément, C3a représente l'anaphylatoxine la plus concentrée dans la phase fluide. B. Comparaison de la séquence peptidique des anaphylatoxines C3a et C5a humaines. Les homologies conservatives sont indiquées par des cadres rosés et les homologies substitutives par des cadres vides. Code à une lettre des acides aminés: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: Tyr.

quement déficientes en C5aR [16] laissent entrevoir de nouveaux rôles biologiques pour l'anaphylatoxine C5a au sein des différents tissus de l'organisme.

Bien que moins active, C3a représente l'anaphylatoxine libérée en plus grande quantité lors de l'activation du complément. De nombreux effets *in vivo* et *in vitro* de C3a ont été montrés, incluant l'agrégation des plaquettes de cobaye et la libération de sérotonine, la libération d'histamine par les mastocytes et les basophiles, et la production de superoxyde par les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles. C3a stimule également la production de leucotriènes par les basophiles et provoque la libération d'interleukine-1 par les monocytes [4, 17]. C3a est un agent chimiotactique moins puissant que C5a puisque cet effet n'est observé que sur les éosinophiles. Enfin, il a été montré que C3a inhibe *in vitro* l'activité des cellules NK [18]. Contrairement au C5a qui conserve quelques propriétés d'activation cellulaire après clivage de l'arginine carboxy-terminale, l'action de la carboxy-peptidase N sérique (génération du C3a-desarg) inactive presque totalement C3a. Des travaux mentionnent, cependant, que C3a-desarg possède toujours la capacité de moduler l'activité des cellules NK [18]. Le manque d'outils moléculaires a longtemps freiné les études concernant son récepteur, le C3aR. Cependant, ses premiers travaux qui ont suivi le clonage de l'ADNc du C3aR montrent une distribution très large du C3aR au sein des tissus et laissent présager la découverte de nouvelles fonctions pour l'anaphylatoxine C3a.

Généralités sur le C5aR

Le C5aR, protéine de 350 acides aminés chez l'homme, appartient à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Le gène du C5aR a été cloné chez l'homme et la souris au début des années 1990 [6-8] et son ADNc a été récemment séquencé par notre équipe chez le rat [14]. Le C5aR est relativement bien conservé entre les trois espèces. Le gène possède une structure à deux exons. La séquence codante se

trouve exclusivement sur le deuxième exon, le premier exon ne contenant que le codon ATG d'initiation [7]. Le clonage de la séquence codante du récepteur a permis la fabrication de mutants de l'ADNc du C5aR (délétions, molécules chimeres, mutagenèse dirigée) qui ont contribué à l'apport de nombreuses connaissances quant aux domaines structuraux et fonctionnels du C5aR. Le modèle courant propose un motif de liaison à deux sites [19]. Une partie du domaine amino-terminal extracellulaire du C5aR serait reconnue par les acides aminés amino-terminaux du ligand C5a. Cette première interaction serait suivie d'une seconde interaction entre la partie carboxy-terminale du C5a avec un second site encore mal défini sur le récepteur.

Les réponses cellulaires induites par l'anaphylatoxine C5a sont brèves (2-3 minutes) en dépit de la présence continue de l'agoniste. Cette atténuation du signal ou désensibilisation est une étape-clé dans le contrôle des réponses cellulaires aux agents chimiotactiques. Le phénomène de désensibilisation homologue est généralement associé à une phosphorylation rapide du récepteur par une protéine-kinase, ce qui a été observé pour le C5aR en réponse à une stimulation par C5a. Ce phénomène est rapide (30 secondes après le début de la stimulation par l'agoniste), réversible, de demi-vie courte (30 minutes) et serait indépendant du couplage aux protéines G. Les protéines responsables de ce phénomène n'ont pas encore été caractérisées. Cependant, des sites phospho-accepteurs ont pu être identifiés : une protéine-kinase C pourrait intervenir au niveau de la troisième boucle intracellulaire et une kinase de type GRK (kinase spécifique des récepteurs couplés aux protéines G, *m/s n° 12, vol. 13, p. 1461*) pourrait agir sur les résidus sérine de la partie carboxy-terminale du C5aR [20].

Les études portant sur les signaux intracellulaires déclenchés par la liaison de l'anaphylatoxine à son récepteur ont montré l'activation de plusieurs voies de transduction (*figure 2*). Les récepteurs des substances chimiotactiques sont généralement couplés négativement aux adénylyl cyclases, et leur stimulation par leur

ligand entraîne une baisse de la concentration en AMPc intracellulaire. Cependant, C5a induit une élévation transitoire de la concentration en AMPc dans les neutrophiles [21]; les mécanismes proposés, l'activation indirecte de l'adénylyl cyclase par une protéine-kinase C ou l'inhibition d'une phosphodiesterase, restent hypothétiques.

La stimulation de neutrophiles et de cellules de la lignée monocyttaire humaine U937 par C5a induit la libération d'inositol trisphosphate IP3 et l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Ce flux calcique est également observé sur des cellules NIH-3T3 (2A3) préalablement transfectées par l'ADNc du C5aR [22, 23]. L'inhibition de la réponse calcique et de la stimulation du métabolisme des phospho-inositides par l'ajout de toxine pertussique indique que ces deux réponses résultent du couplage du C5aR à une protéine Gi et suggère que le flux calcique est la conséquence directe de l'activation d'une phospholipase C. Les neutrophiles répondent également à l'anaphylatoxine par la stimulation de la voie de la protéine-kinase activée par les mitogènes ou MAP-kinase [24]. La MAP-kinase est connue pour phosphoryler de nombreuses protéines potentiellement importantes dans l'activité chimiotactique des neutrophiles.

A la suite de l'observation de l'induction d'une hyperpolarisation des cellules monocytaires par les facteurs chimiotactiques, Ichinose *et al.* ont étudié l'effet de la stimulation de macrophages de souris par C5a sur la polarisation membranaire [25]. L'anaphylatoxine induit un premier courant lent hyperpolarisant suivi d'un second courant oscillant. Les auteurs ont identifié ces deux courants à l'aide d'inhibiteurs de canaux ioniques comme étant des courants potassiques sortants. Ce courant est inhibé par la toxine pertussique, ce qui implique un couplage entre une protéine Gi et les canaux ioniques.

Expression cellulaire et tissulaire du C5aR

Compte tenu des effets biologiques de l'anaphylatoxine C5a dans le cadre de la réponse immune et inflammatoire, il était admis que son

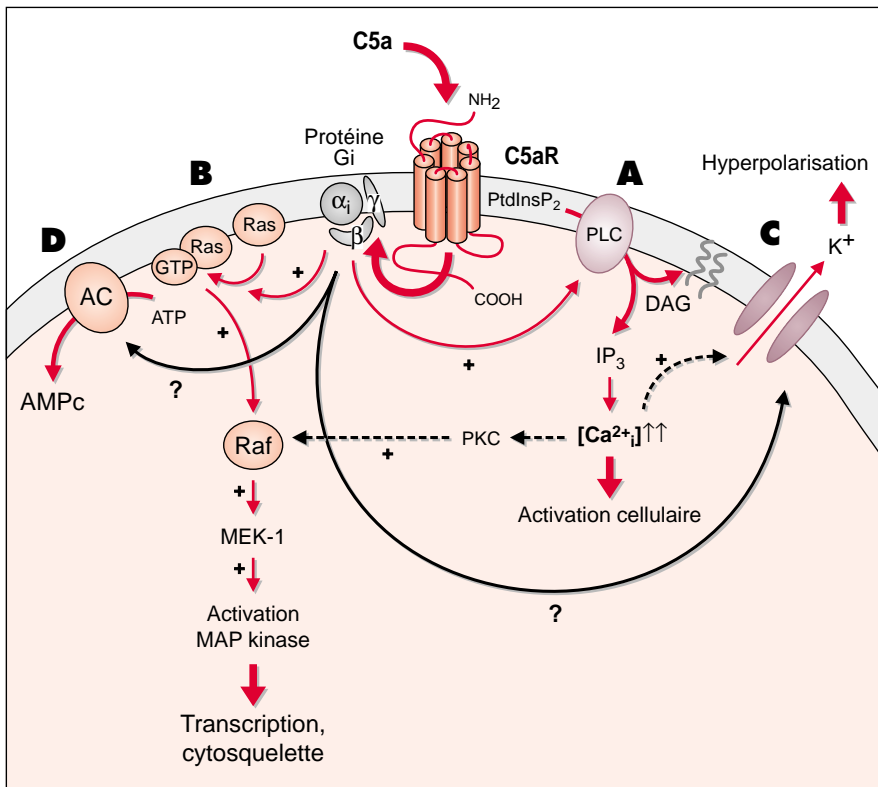


Figure 2. **Principales voies de transmission du signal activées par la liaison de C5a à son récepteur.** Le C5aR appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G de type G_i . La plupart des voies de transmission activées par la liaison de C5a au C5aR sont en effet inhibées par la toxine pertussique. **A.** La liaison de l'anaphylatoxine C5a à son récepteur induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Ce flux calcique résulte de l'activation d'une phospholipase C (PLC), qui clive les phosphatidyl-inositols PtdInsP₂ en inositol triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). **B.** La stimulation du C5aR par son ligand provoque l'activation de la voie de la MAP-kinase, qui se traduit par la phosphorylation successive des protéines Ras, Raf et MEK-1 et aboutit à l'activation de la MAP-kinase. Une possible interaction entre cette voie de transmission et la précédente est indiquée par des pointillés. **C.** L'hyperpolarisation observée après stimulation des cellules monocytaires par C5a résulte de l'ouverture de canaux potassiques. Les messagers intermédiaires de cette voie de transmission ne sont pas encore définis. **D.** Dans les neutrophiles, la concentration intracellulaire en AMPc augmente transitoirement après stimulation des cellules par C5a. Les messagers de cette réponse intracellulaire demeurent inconnus.

récepteur n'était présent qu'à la surface des polynucléaires, des monocytes et des macrophages [9-11]. Pourtant, une des récentes avancées concernant le C5aR est la découverte de son expression par des cellules non myéloïdes (Tableau I). Les premiers résultats dans ce domaine ont été apportés en 1995 par l'équipe de Haviland *et al.* (Birmingham, AL, USA) [12]. Ces études portant sur la distribution tissulaire du C5aR ont permis tout d'abord de mettre en évidence l'ARNm du récepteur dans

une lignée cellulaire dérivée d'un hépatome humain, la lignée HepG2. Ce résultat a été confirmé *in vivo*, les auteurs ayant caractérisé le C5aR dans le foie humain par hybridation *in situ* et immunohistochimie au niveau de cellules non parenchymateuses. Le C5aR a également été mis en évidence dans le poumon humain sur les cellules endothéliales, les cellules du muscle lisse vasculaire et sur les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires. L'ARNm du C5aR a été détecté, en outre, au sein de mul-

tiples organes du babouin (rate, rein, cœur et intestin) par la même équipe, suggérant une expression quasi ubiquitaire du récepteur. La même année, les travaux de notre équipe ont permis de démontrer la présence du C5aR au niveau des cellules gliales [13]. Des expériences d'immunofluorescence et de cytométrie en flux ont révélé le C5aR à la surface de lignées astrocytaires humaines et d'astrocytes fœtaux humains. Des expériences de RT-PCR et *Western blot* nous ont permis de montrer que le récepteur glial est identique au récepteur leucocytaire. Par ailleurs, nous avons également détecté le C5aR dans le système nerveux central de rat et dans des cultures primaires d'astrocytes de rat nouveau-né. Le C5aR astrocytaire est fonctionnel puisque la stimulation des astrocytes par C5a induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, mesurée par microfluorimétrie [14]. L'expression du C5aR a également été démontrée sur des cultures primaires de microglie humaine [15]. A l'inverse, le C5aR n'a pas pu être caractérisé à la surface des neurones et des oligodendrocytes [26]. Des études ont montré un effet de l'anaphylatoxine C5a sur des cellules endothéliales, suggérant l'existence du C5aR à la surface de ces cellules [27]. Enfin, l'équipe de Werfel *et al.* (Hanovre, Allemagne) a récemment démontré l'expression du C5aR par les cellules dermiques et épidermiques d'origine humaine [28]. L'expression du C5aR par des cellules non myéloïdes laisse entrevoir de nouveaux rôles pour l'anaphylatoxine C5a (Tableau I). Même si les fonctions biologiques de C5a au niveau de ces types cellulaires restent encore à élucider, quelques études mettent en évidence une action spécifique de l'anaphylatoxine. Ainsi, Mac Coy *et al.* (Saint-Louis, MI, USA) ont démontré que C5a induit des changements dans la synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation sur une lignée d'hépatome humain. La stimulation des cellules HepG2 par C5a (10^{-9} M) provoque l'augmentation de synthèse des protéines du complément C3 et facteur B, de l' α 1-antichymotrypsine, et la diminution concomitante de la synthèse de transferrine et d'albu-

Tableau I		
EXPRESSION DU C5aR PAR DES CELLULES DE LA LIGNÉE MYÉLOÏDE		
Macrophages	[9]	Chimiotactisme Polarisation Production de radicaux libres Libération d'enzymes lysosomales
Polynucléaires	[10]	Adhérence cellulaire Chimiotactisme (neutrophiles, éosinophiles) Libération d'histamine et de sérotonine (basophiles, mastocytes) Libération de protéines toxiques et de réactifs oxygénés (éosinophiles)
Cellules de Kupffer	[30]	Formation de thromboxane A2 et prostaglandines D2, E2 et F2
Microglie	[15]	Chimiotactisme <i>Phagocytose ? Mitose ?</i>
EXPRESSION DU C5aR PAR DES CELLULES NON MYÉLOÏDES		
Cellules endothéliales	[27]	Expression de la P-sélectine Sécrétion du facteur de von Willebrand <i>Perméabilité vasculaire ?</i>
Épithélium pulmonaire	[12]	
Hépatocytes	[12]	Modulation de la synthèse des protéines de la phase aiguë
Astrocytes	[13, 14]	<i>Gliose astrocytaire ?</i> <i>Libération de médiateurs inflammatoires ?</i>
Cellules dermiques et kératinocytes	[28]	

Le C5aR a été mis en évidence au niveau des cellules sanguines, mais également plus récemment à la surface de cellules non myéloïdes. Le(s) rôle(s) attribué(s) à l'anaphylatoxine C5a figure(nt) en face de chaque type cellulaire exprimant le récepteur (les rôles indiqués en italique correspondent à des fonctions hypothétiques de C5a).

mine [29]. Par ailleurs, des cocultures hépatocytes de rat/cellules de Kupffer de rat voient leur activité glyco-gène-phosphorylase augmentée après ajout de C5a recombinant [30]. Dans le système nerveux central, les rôles de C5a restent encore peu étudiés. Des résultats préliminaires laissent cependant penser que le C5aR pourrait intervenir dans le cerveau en conditions pathologiques. Une application de C5a induit la formation de lamellipodes sur des cellules microgliales en culture, suivie d'une migration chimiotactique de ces cellules selon le gradient de C5a [31]. Une augmentation de l'expression du récepteur dans le système nerveux central en conditions inflammatoires a également été montrée,

au niveau des astrocytes et de la microglie et, à un moindre taux, au niveau des cellules endothéliales [32]. Ainsi, une libération de C5a au cours d'un processus inflammatoire pourrait activer les astrocytes et la microglie pour les guider vers le site lésé.

Des souris déficientes en C5aR sont particulièrement sensibles aux infections pulmonaires

Récemment, l'équipe de Höpken *et al.* (Boston, MA, USA) a créé des souris génétiquement déficientes en C5aR, afin de déterminer la contribution du récepteur dans un modèle d'inflammation pulmonaire [16]. Les auteurs ont testé la résistance des

souris mutantes à une injection intratrachéale de *Pseudomonas aeruginosa*. A la suite de l'instillation du pathogène, les souris déficientes en C5aR succombent dès le deuxième jour, après avoir développé une pneumonie. Les souris normales, à l'inverse, résistent parfaitement à l'infection. Afin de déterminer si la susceptibilité excessive des mutantes était due à un défaut d'élimination du micro-organisme, des homogénats de poumon ont été étudiés 6 heures et 24 heures après infection. Alors que les souris normales ont totalement éliminé le micro-organisme à 24 heures, survie et croissance bactérienne sont observées dans les poumons des souris transgéniques. Par ailleurs, des cas de surinfections bactériennes à staphylo-

coques et streptocoques sont observés chez les souris mutantes à la suite de l'inoculation d'une dose sublétale du pathogène. Ces résultats suggèrent un rôle essentiel du C5aR dans l'élimination des micro-organismes et la défense antibactérienne au sein du poumon. A l'inverse, lorsque les souris déficientes en C5aR sont infectées par injection intrapéritonéale de *Pseudomonas aeruginosa*, l'élimination du micro-organisme est totale à 24 heures. Ainsi, alors que le C5aR semble avoir une fonction prépondérante dans la défense muqueuse pulmonaire, ce dernier résultat propose un rôle accessoire du récepteur dans le péritoine. La neutralisation de l'interaction C5a-C5aR apparaîtrait donc comme une stratégie thérapeutique de prévention de la colonisation bactérienne dans le poumon.

L'administration d'un anti-C5 réduit les dommages causés par l'inflammation

L'utilisation d'anticorps dirigés contre le composant C5 du complément permet le blocage du clivage du C5 et empêche ainsi la libération de l'anaphylatoxine C5a et la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9. L'équipe de Wang *et al.* (Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, CT, USA) a obtenu des résultats très intéressants en étudiant les effets d'un anticorps monoclonal anti-C5 de souris (BB5.1) dans deux modèles de maladies inflammatoires [33, 34].

Les souris (NZB/W)F1 issues du croisement NZBxNZW développent spontanément une maladie auto-immune voisine du lupus érythémateux disséminé (LED) et succombent généralement de glomérulonéphrite à 12 mois. L'injection intrapéritonéale de 1 mg de BB5.1 dès la 18^e semaine de vie des souris améliore considérablement le taux de survie (80% à 12 mois et plus). En outre, la lésion se trouve sensiblement réduite chez les souris traitées avec une faible altération de l'architecture tubulaire et glomérulaire, et des dépôts modérés de matrice mésangiale. Ainsi, l'absence des effets pro-inflammatoires de C5a et C5b-9 atténue considérablement le développement de la glomérulonéphrite.

Le second modèle étudié est celui de l'arthrite induite par le collagène de type II, modèle murin de l'arthrite rhu-

matoïde humaine. L'administration intrapéritonéale de 750 µg de BB5.1 au 21^e jour suivant l'immunisation par le collagène empêche le développement de l'arthrite. L'examen histologique confirme l'absence de phénomène inflammatoire au niveau des articulations des souris traitées. Par ailleurs, l'administration quotidienne de 3 mg de BB5.1 après l'apparition des premiers signes cliniques de l'arthrite entraîne un arrêt dans la progression de l'inflammation articulaire. L'étude histologique montre une prolifération synoviale modérée et l'absence d'infiltration leucocytaire. Ces dernières observations démontrent l'efficacité de l'anti-C5 à la fois dans la prévention et dans le traitement de l'arthrite inflammatoire.

Au regard de ces expériences, les composants C5a et C5b-9 du complément apparaissent comme des médiateurs essentiels du mécanisme inflammatoire, sans toutefois assigner un rôle prépondérant à l'un des deux médiateurs. Ces résultats laissent entrevoir des possibilités thérapeutiques de traitement de maladies inflammatoires rénales et articulaires (glomérulonéphrites à complexes immuns, en particulier associées au LED, et arthrite rhumatoïde).

Clonage du récepteur de l'anaphylatoxine C3a

Si le C5aR a déjà fait l'objet de nombreuses études, il n'en est pas de même pour le C3aR. Même si C3a n'est pas l'anaphylatoxine la plus active, il est important de bien connaître ses propriétés biologiques et son récepteur dans la mesure où elle représente l'anaphylatoxine la plus concentrée dans la phase fluide. Contrairement au C5aR dont le clonage de l'ADNc a permis une avancée rapide des connaissances, les données sur le C3aR sont longtemps restées controversées, notamment concernant la densité cellulaire du C3aR, son poids moléculaire et les paramètres de liaison. Ainsi, l'équipe de Legler *et al.* (Berne, Suisse) a décrit deux classes de récepteurs pour le C3a, respectivement de forte (54-61 kDa) et faible affinité (86-107 kDa) [35]. Des sites de liaison spécifiques pour le C3a ont été décrits sur les neutrophiles humains, les lignées cellulaires de monocytes

(U937) et granulocytes (HL-60) humains et les plaquettes de cobaye [36, 37]. Des travaux alliant des expériences de compétition et de désensibilisation fonctionnelle étaient consistants avec la présence d'un récepteur de C3a différent du C5aR. La sensibilité de l'activité fonctionnelle à la toxine pertussique suggérait, là aussi, un site de liaison composé d'un récepteur couplé à une protéine G [38].

Il a fallu attendre l'année 1996 pour que deux équipes clonent indépendamment l'ADNc du C3aR. L'équipe de Roglic *et al.* (La Jolla, CA, USA) a isolé, à partir d'une banque ADNc de cellules HL-60, un clone nommé AZ3B codant pour un récepteur orphelin couplé à une protéine G [39]. Un peu plus tard, l'équipe de Ames *et al.* (Hanovre, Allemagne) a cloné de la même manière un ADNc nommé HNFAG09 à partir d'une banque de neutrophiles humains [40]. Des expériences de liaison sur des cellules transfectées par HNFAG09 ont permis d'identifier ce clone comme étant le récepteur de l'anaphylatoxine C3a et ont démontré son identité avec le clone AZ3B précédemment isolé. Le C3aR est composé d'une séquence de 482 acides aminés organisés en sept domaines transmembranaires. Il a la particularité de posséder une large boucle extracellulaire de 172 acides aminés entre la quatrième et cinquième domaines transmembranaires, boucle qui ne compte que 32 acides aminés sur le C5aR (*figure 3*). Le caractère hydrophile de cette boucle laisse supposer qu'elle pourrait servir de site de liaison pour le C3a.

Les premières études ont déjà permis de montrer une expression cellulaire et tissulaire très large de l'ARNm du C3aR. Le transcrit a en effet pu être détecté au niveau des lignées cellulaires U937 et HL-60, mais également au niveau de nombreux tissus lymphoïdes et endocrines (rate, thymus, moelle osseuse, foie fœtal, pancréas, médulla et cortex rénaux, thyroïde, testicule, intestin grêle, estomac) (*Tableau II*) [41]. Ces résultats préliminaires laissent présager de nouveaux rôles pour l'anaphylatoxine C3a, s'ajoutant sans doute à une fonction prépondérante de médiateur dans les phénomènes inflammatoires au sein des tissus.

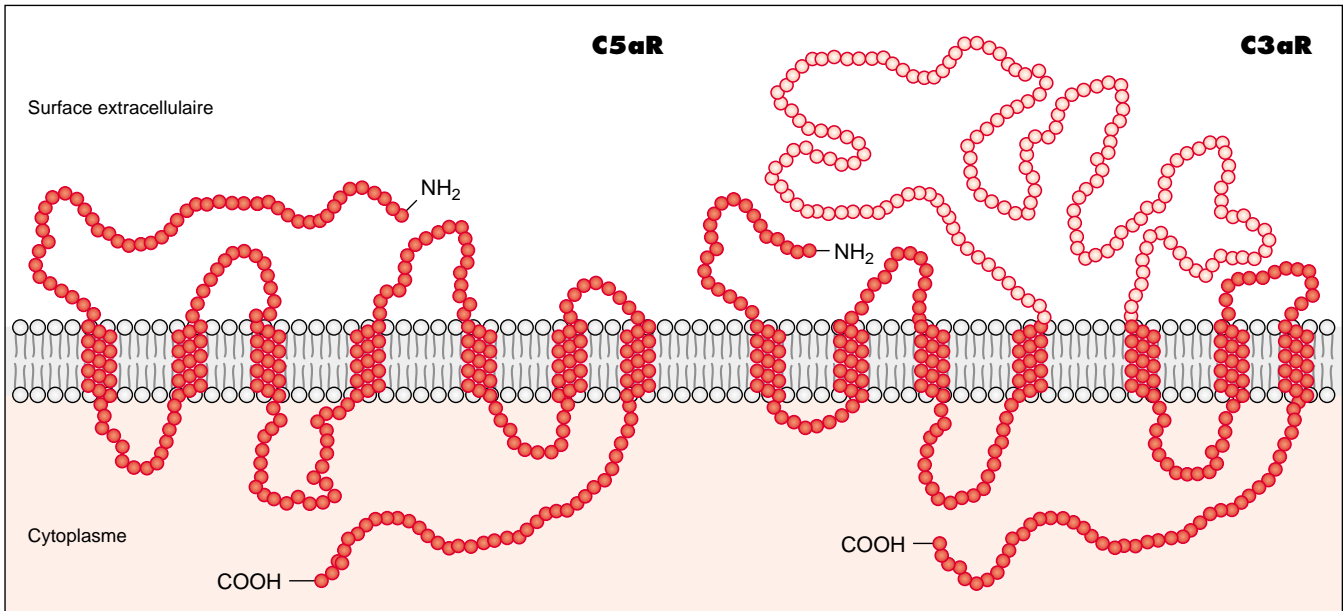


Figure 3. **Représentation schématique des récepteurs des anaphylatoxines C5a et C3a, le C5aR et le C3aR.** Le C5aR et le C3aR sont deux récepteurs à sept domaines transmembranaires, avec une extrémité amino-terminale extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale cytoplasmique. Le C5aR possède 350 acides aminés chez l'homme. Le C3aR est composé d'une séquence de 482 acides aminés chez l'homme et a la particularité de présenter une large boucle extracellulaire de 172 résidus amino-acides située entre les 4^e et 5^e domaines transmembranaires, boucle qui ne compte que 32 acides aminés sur le C5aR. Cette structure reste pour l'instant unique au sein de la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires.

Tableau II		
EXPRESSION DU C3aR PAR LES CELLULES SANGUINES		
Plaquettes de cobaye	[36]	Agrégation Libération de sérotonine
Polynucléaires	[36, 37]	Production de superoxyde Agrégation
Monocytes	[37, 41]	Sécrétion de glucosaminidase Production d'interleukine-1
EXPRESSION TISSULAIRE DE L'ARNm DU C3aR		
Tissus lymphoïdes : Rate, thymus, moelle osseuse, foie fœtal Tissus endocrines : Pancréas, surrénales (cortex et médulla), thyroïde, testicules, intestin grêle, estomac	[41]	

La présence du C3aR a été démontrée à la surface de cellules sanguines et l'ARNm du récepteur a été mis en évidence au niveau de tissus lymphoïdes et endocrines humains. Le(s) rôle(s) démontré(s) in vivo et in vitro figure(nt) en face des types cellulaires correspondants.

Conclusion

Le système du complément joue un rôle majeur dans le processus inflammatoire et la défense antimicrobienne. La participation des protéines du complément à des fonctions non immunes est un

concept récent qui découle de l'observation des synthèses dites locales du complément [2]. Les derniers apports sur l'expression cellulaire des récepteurs des anaphylatoxines C3a et C5a illustrent parfaitement l'aspect multifonctionnel du complément. Le concept

d'une action restreinte aux réponses immunes humorales et cellulaires s'élargit peu à peu à des fonctions spécifiques inattendues au sein des tissus de l'organisme. C5a pourrait ainsi intervenir au niveau du foie en agissant sur le métabolisme des protéines de la phase aiguë lors d'une

infection ou d'une inflammation. Au niveau du système nerveux central, la libération locale de C5a dans le cadre de maladies neurodégénératives ou démyélinisantes pourrait activer les astrocytes et favoriser la gliose réactionnelle. Les résultats pertinents obtenus par l'équipe de Höpken *et al.* grâce à l'utilisation de souris génétiquement déficientes en C5aR renforcent le caractère prépondérant du rôle du C5aR et de C5a dans la défense antibactérienne dans le poumon [16]. Paradoxalement, les résultats obtenus par blocage de la libération de C5a dans le cas de la glomérulonéphrite ou de l'arthrite rhumatoïde seraient plutôt en faveur d'un rôle délétère de l'anaphylatoxine [33, 34]. L'interaction de C5a avec son récepteur paraît donc avoir des effets particuliers en fonction des tissus ou des conditions physiologiques étudiées et mérite d'être parfaitement comprise et maîtrisée afin d'envisager à long terme des possibilités d'intervention thérapeutique. Une avancée importante dans les études portant sur le système du complément est apportée par le clonage récent du C3aR. La mise au point d'outils moléculaires va maintenant faciliter l'approche dans les études structurales et fonctionnelles et, à plus long terme, la compréhension du rôle de C3a dans la pathogénie de la réponse inflammatoire ■

RÉFÉRENCES

- Farries TC, Atkinson JP. Evolution of the complement system. *Immunol Today* 1991; 12: 295-300.
- Gasque P, Legoedec J, Thomas A, Schouft MT, Chan P, Fontaine M. Nouvelles fonctions pour le système du complément. Apport de l'étude des synthèses locales. *Med Sci* 1996; 12: 941-7.
- Ripoche J, Demares MJ, Julien N, Lemerrier C, Dauchel H, Davrinche C, Daveau M, Fontaine M. Les protéines régulatrices du système du complément. *Med Sci* 1989; 5: 234-43.
- Frank MM, Fries LF. Complement interactions and functions: the role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 1991; 12: 322-6.
- Goodman MC, Chenoweth DE, Weigle WO. Induction of interleukin-1 secretion and enhancement of humoral immunity by binding of human C5a to macrophages surface C5a receptors. *J Exp Med* 1982; 156: 912-7.
- Gerard NP, Gerard C. The chemotactic receptor for human anaphylatoxin C5a. *Nature* 1991; 349: 614-7.
- Boulay F, Mery L, Tardif M, Brouchon L, Vignais P. Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry* 1991; 30: 2993-9.
- Gerard C, Bao L, Orozco O, Pearson M, Kunz D, Gerard NP. Structural diversity in the extracellular faces of peptidergic G-protein-coupled receptors. Molecular cloning of the mouse C5a anaphylatoxin receptor. *J Immunol* 1992; 149: 2600-6.
- Chenoweth DE, Goodman MG, Weigle WO. Demonstration of a specific receptor for human C5a anaphylatoxin on murine macrophages. *J Exp Med* 1982; 156: 68-78.
- Huey R, Hugli TE. Characterization of a C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes (PMN). *J Immunol* 1985; 135: 2063-8.
- Gerard NP, Hodges MK, Drazen JM, Weller PF, Gerard C. Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *J Biol Chem* 1989; 264: 1760-6.
- Haviland DL, MacCoy RL, Whitehead WT, Akama H, Molmenti EP, Brown A, Haviland JC, Parks WC, Perlmutter DH, Wetsel RA. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on non myeloid cells of the liver and lung. *J Immunol* 1995; 154: 1861-9.
- Gasque P, Chan P, Fontaine M, Ischenko A, Lamacz M, Götze O, Morgan BP. Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes: relevance to inflammation in the brain. *J Immunol* 1995; 155: 4882-9.
- Sayah S, Patte C, Gasque P, Chan P, Ischenko A, Vaudry H, Fontaine M. Characterization of rat C5a anaphylatoxin receptor (C5aR). Cloning of rat C5aR cDNA and study of C5aR expression by rat astrocytes. *Mol Brain Res* 1997; 48: 215-22.
- Lacy M, Jones J, Whittemore SR, Haviland DL, Wetsel RA, Barnum SR. Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *J Neuroimmunol* 1995; 61: 71-8.
- Höpken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C. The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature* 1996; 383: 86-9.
- Haeflner-Cavaillon N, Cavaillon JM, Laude M, Kazatchkine MD. C3a (C3adesarg) induces production and release of interleukin-1 by cultured human monocytes. *J Immunol* 1987; 139: 794-9.
- Charriaut C, Senik A, Kolb JP, Barel M, Frade R. Inhibition of *in vitro* killer activity by the third component of complement: role for the C3a fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 6003-7.
- Wetsel RA. Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 48-53.
- Giannini E, Brouchon L, Boulay F. Identification of the major phosphorylation sites in human C5a anaphylatoxin receptor *in vivo*. *J Biol Chem* 1995; 270: 19166-72.
- Iannone MA, Wolberg G, Zimmerman TP. Chemotactic peptide induces cAMP elevation in human neutrophils by amplification of the adenylate cyclase response to endogenously produced adenosine. *J Biol Chem* 1989; 264: 20177-89.
- Vanek M, Hawkins LD, Gusovsky F. Coupling of the C5a receptor to Gi in U937 cells and in cells transfected with C5a receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 832-9.
- Buhl AM, Avdi N, Worthen GS, Johnson GL. Mapping of the C5a receptor signal transduction network in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9190-4.
- Buhl AM, Osawa S, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase activation requires two signal inputs from the human anaphylatoxin receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 19828-32.
- Ichinose M, Hara N, Sawada M, Maeno T. Induction of two K⁺ currents by complement C5a in mouse macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1111: 165-70.
- Morgan BP, Gasque P. Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol Today* 1996; 17: 461-6.
- Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML, Johnson KJ, Glovsky MM, Eddy SM, Ward P. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 94: 1147-55.
- Werfel T, Zwirner J, Oppermann M, Sieber A, Begeman G, Drommer W, Kapp A, Götze O. CD88 antibodies specifically bind to C5aR on dermal CD117+ and CD14+ cells and react with a desmosomal antigen in human skin. *J Immunol* 1996; 157: 1729-35.
- MacCoy R, Haviland DL, Molmenti EP, Ziambaras T, Wetsel RA, Perlmutter DH. N-formylpeptide and complement C5a receptors are expressed in liver cells and mediate hepatic acute phase gene regulation. *J Exp Med* 1995; 182: 207-17.
- Hespling U, Püschel GP, Jungermann K, Götze O, Zwirner J. Stimulation of glycogen phosphorylase in rat hepatocytes via prostanoids release from Kupffer cells by recombinant rat anaphylatoxin C5a but not by native human C5a in hepatocyte/Kupffer cell co-cultures. *FEBS Letters* 1995; 372: 108-12.
- Nolte C, Möller T, Walter T, Kettenmann H. Complement 5a controls motility of murine microglial cells *in vitro* via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton. *Neuroscience* 1996; 73: 1091-107.

RÉFÉRENCES

32. Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Götz O, Morgan BP. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is upregulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol* 1997; 150: 31-41.
33. Wang Y, Rollins SA, Madri JA, Matis LA. Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8955-9.
34. Wang Y, Hu Q, Madri JA, Rollins SA, Chodera A, Matis LA. Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/W F1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8563-8.
35. Legler DF, Loetscher M, Jones SA, Dahinden CA, Arock M, Moser B. Expression of high- and low-affinity receptors for C3a on the human mast cell line, HMC-1. *Eur J Immunol* 1996; 26: 753-8.
36. Gerardy-Schahn R, Ambrosius D, Saunders D, Casareto M, Mittler C, Karwarth G, Gørgen S, Bitter-Suermann D. Characterization of the C3a receptor-proteins on guinea pig platelets and human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* 1989; 19: 1095-102.
37. Klos A, Bank S, Gietz C, Bautsch W, Köhl J, Burg M, Kretzschmar T. C3a receptor on dibutyryl-cAMP-differentiated U937 cells and human neutrophils: the human C3a receptor characterized by functional responses and 125I-C3a binding. *Biochemistry* 1992; 31: 11274-82.
38. Norgauer J, Dobos G, Kownatzki E, Dahinden C, Burger R, Kupper R, Gierschik P. Complement fragment C3a stimulates Ca²⁺ influx in neutrophils via a pertussis-toxin-sensitive G protein. *Eur J Biochem* 1993; 217: 289-94.
39. Roglic A, Prossnitz ER, Cavanagh SL, Pan Z, Zou A, Ye RD. cDNA cloning of a novel G-protein-coupled receptor with a large extracellular loop structure. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1305: 39-43.
40. Ames RS, Li Y, Sarau HM, Nuthulaganti P, Foley JJ, Ellis C, Zeng Z, Su K, Jurewicz AJ, Hertzberg RP, Bergsma DJ, Kumar C. Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 20231-4.
41. Crass T, Raffetseder U, Martin U, Grove M, Klos A, Köhl J, Bautsch W. Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U937 cells. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1944-50.

Summary

C3a and C5a anaphylatoxins receptors

The complement is one of the oldest defence systems of the body. Although this system is primarily known for its killing function of pathogens, it can also be involved in immune and inflammatory reactions such as phagocytosis of foreign particles or recruitment of immune cells through chemoattractant peptides. Recent data emerging from studies on local biosynthesis of complement suggest the involvement of some complement components in non immune functions in tissues. The C3a and C5a anaphylatoxins, two inflammatory peptides released during complement activation, might have putative roles in tissues, in addition of their proinflammatory properties. This hypothesis arises from the observation that the expression of their respective receptors, C3aR and C5aR, initially thought to be restricted to immune cells, appears to be enlarged to several tissues of the body. The C5aR is present on the surface of non myeloid cells of the liver and lung and on brain cells. C5a anaphylatoxin could thus be implicated in physiological processes and interfere during pathological conditions in these tissues. The C5aR seems to play a predominant role in mucosal defence in lung. On the contrary, binding of C5a to its receptor seems to have a deleterious effect in kidney and joints during glomerulonephritis and inflammatory arthritis. Thus, a complete knowledge of the C5aR biology appears to be predominant in the inflammatory processes understanding. Dealing with the C3aR, data are more limited. However, the recent cDNA cloning of the human C3aR has already allowed the demonstration of a very large tissue expression of this receptor. Taken together, these observations argue for new physiological roles of C3a and C5a anaphylatoxins in tissues, in addition of their more classical inflammatory functions during pathological conditions.

Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire Colloque du groupe thématique Phosphorylation des protéines Arcachon 21-23 septembre 1998

Le colloque couvrira les différents aspects de l'étude des protéine-kinases et des phosphoprotéines phosphatases.

THÈMES ABORDÉS

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Signalisation | <input type="checkbox"/> Interactions cellulaires |
| <input type="checkbox"/> Différenciation | <input type="checkbox"/> Trafic intracellulaire |
| <input type="checkbox"/> Prolifération | <input type="checkbox"/> Études structurales |
| <input type="checkbox"/> Dynamique cellulaire | <input type="checkbox"/> Etc. |

Les présentations auront lieu sous la forme de communications orales brèves ou d'affiches. La participation de jeunes chercheurs est vivement encouragée.

INSCRIPTIONS ET INFORMATIONS

La date limite de préinscription est le 15 janvier 1998. Renseignements auprès du Pr Bernard Ducommun IPBS - Cnrs, 205, route de Narbonne 31077 Toulouse Cedex, France Tél. : 05 61 17 59 31 Fax : 05 61 17 59 05 sfbm98@ipbs.fr L'accès à Arcachon est simple : gare SNCF-TGV à proximité du palais des congrès, aéroport de Bordeaux-Mérignac à 30 mn.

COMITÉ D'ORGANISATION

Pr Bernard DUCOMMUN (Toulouse),
Dr Michèle CAIZERGUES-FERRER (Toulouse)
Dr Michel VERON (Paris)