

REMERCIEMENTS

Au moment d'écrire ces lignes, on se dit que l'arrivée est à la fois toute proche et encore bien loin ; un peu comme lorsque vous entamez les 195 derniers mètres d'un marathon qui vous paraissent être une éternité. Je continuerais la comparaison entre le déroulement d'une thèse et la préparation d'un marathon : un long entraînement ponctué de hauts et de bas, un « mur des 30 km » pendant lequel vous vous demandez dans quelle galère vous vous êtes embarqués et enfin seulement, le soulagement et la satisfaction d'avoir franchi la ligne d'arrivée.

Au terme de cette thèse, je tiens, tout d'abord, à remercier les Professeurs Freddy Coignoul et Daniel Desmecht pour m'avoir accueilli au sein du service de Pathologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège. C'est à ce dernier, mon promoteur, que j'adresse plus particulièrement toute ma gratitude. Il m'a proposé un job alors que j'étais encore étudiant, m'a convaincu de réaliser cette thèse, m'a encadré tout au long de ce parcours et m'a prodigué de nombreux et précieux conseils.

Je tiens également à remercier Laurent Zecchinon pour son implication dans notre projet de recherches. Cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est sans son apport et son aide. Les sept ans passés dans le même bureau nous ont permis d'effectuer du bon boulot mais aussi de passer d'agréables instants. Merci aussi à Philippe Vanden Bergh, le troisième larron de la *β_2 -integrin dream team* avec qui nous avons passé de grands moments que ce soit au labo, au Québec ou au delphinarium d'Harderwijk.

La personne suivante à qui j'adresse toute ma reconnaissance est Etienne Baise pour tout ce qu'il m'a appris. Il fut d'abord mon bourreau de défense de TFE de graduat, ensuite mon maître de stage d'ingénieur et pour terminer un mentor scientifique dont les connaissances n'ont pas de limite.

Merci à mon pote Greg Pire pour son soutien moral et sans qui je n'aurais pas atterri dans le service pour effectuer mon stage de fin d'études.

Je voudrais également remercier Stéphanie Glineur, qui a dû me supporter pendant un an et demi dans le même bureau, pour toutes nos discussions ainsi que son aide tant au niveau moral que scientifique et ce même à des milliers de kilomètres.

Pour la relecture du manuscrit, j'exprime mes sincères remerciements à Nathalie Guillaume.

Je tiens à dire merci à Dominique Cassart (Mamy ou la « sale ruche » ;-)) pour m'avoir nourri à coups de pizzas et de brochettes mais aussi pour nos discussions footballistiques de mauvaise foi du lundi matin.

Je ne voudrais pas oublier mes deux acolytes du midi (ou plutôt midi moins le quart) : Aurore Broers et François Cornet. Merci à vous pour votre jovialité.

Au cours de mes neuf années passées au sein du laboratoire, j'ai vu passer pas mal de monde. Je tiens donc à remercier tous les membres (présents et passés) du service de Pathologie pour leur apport dont notamment Adélite, Amélie, Annabelle, Anne C., Anne T., Benoît, Calixte, Carine, Cédric, Christine, Dao, Déborah, Els, Hoang, Hussein, Joël, Karine, NAM, Martin, Marie-Pierre, Michael B., Michael L., Michael S., Michel, Mélanie, Mutien, Nathalie, Nidal, Patricia, Patrick, Pedro, Raphaël, Sandra, Sandy, Sébastien, Soumya, Tam, Thierry J., Thierry F. et Vanessa ainsi que les stagiaires qui ont travaillé sur le sujet : Arnaud, Benjamin, Dimitri et Gaëtan.

Je remercie également les personnes suivantes pour nous avoir donné accès au sang de différentes espèces : pour les moutons, le Professeur Pascal Leroy ; pour la chèvre, le Professeur Jean-François Beckers et pour les dauphins et marsouins, le Dr. Niels Van Elk du delphinarium d'Harderwijk.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude au Service Public Fédéral de la Santé publique et au Service Public de Wallonie de l'Agriculture pour leur financement.

Enfin, je voudrais remercier mes amis et mes parents pour leur soutien indéfectible tout au long de mes études.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

<i>A. pyogenes</i>	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Apx	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> RTX toxin
BHV-1	<i>Bovine herpesvirus-1</i>
BLAD	<i>Bovine leukocyte adhesion deficiency</i>
BPI-3	<i>Bovine parainfluenza-3</i>
BRSV	<i>Bovine respiratory syncytial virus</i>
BVD-MD	<i>Bovine viral diarrhoea-mucosal disease</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDS	<i>Coding DNA sequence</i>
CR3, 4	<i>Complement receptor 3, 4</i>
CSE	Cellule souche embryonnaire
D	Acide aspartique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
F	Phénylalanine
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
G	Glycine
h	heure
Hly	Hémolysine
I	Isoleucine
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IgG	Immunoglobuline G
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
L	Leucine
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LKT	<i>Leukotoxin</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysine
<i>M. haemolytica</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
Mac-1	<i>Macrophage antigen-1</i>
min	Minute
MM	Masse moléculaire

N	Asparagine
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
PAF	Paraformaldéhyde
Pb	Paire de bases
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
PS	Peptide signal
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
RTX	<i>Repeats in toxin</i>
s	Seconde
ZFN	<i>Zinc finger nuclease</i>

TABLE DES MATIÈRES

RESUME	1
SUMMARY	3
POSITION DE LA QUESTION	4
OBJECTIFS	5
 PREMIERE PARTIE : DONNEES DE LA LITTERATURE	 6
 1. Les pneumonies des bovins domestiques.....	 7
1.1. Impact économique	7
1.2. Présentation clinique	8
1.3. Prophylaxie et traitement.....	9
2. La mannheimiose	10
2.1. <i>Mannheimia haemolytica</i>	10
2.2. Facteurs de virulence.....	11
2.3. Lésions macro- et microscopiques	12
3. La leucotoxine de <i>M. haemolytica</i>	13
3.1. Organisation structurale du gène	13
3.2. Contrôle de l'expression.....	13
3.3. Organisation structurale de la protéine	14
3.4. Cellules cibles.....	17
4. LFA-1, le récepteur de la leucotoxine.....	18
4.1. Les β_2 -intégrines	18
4.2. Organisation structurale de la β_2 -intégrine LFA-1	21
4.3. Fonctions biologiques de la β_2 -intégrine LFA-1	46
4.4. La sous-unité CD18, récepteur universel des toxines RTX.....	57
4.5. La pathogénie de la mannheimiose	74
5. La plateforme d'attachement de la leucotoxine sur le CD18	98
5.1. Implication du CD18	98
5.2. Implication du segment N-terminal : le peptide signal	99
5.3. Implication du segment C-terminal : le domaine EGF-3.....	101
5.4. Les arguments qui alimentent la controverse	101

DEUXIEME PARTIE : CONTRIBUTIONS PERSONNELLES 102

6.	Caractérisation de la sous-unité CD11a de la β_2-intégrine LFA-1 des ruminants	103
6.1.	Dans l'espèce bovine.....	103
6.2.	Dans l'espèce ovine.....	109
6.3.	Dans l'espèce caprine.....	116
7.	Contribution à l'inventaire des sous-unités CD18 « sensibles » et « résistantes ».....	123
8.	Vers l'identification de la plateforme d'attachement de la leucotoxine dans le CD18...	130
8.1.	Inventaire des résidus critiques chez les ruminants	130
8.2.	Réfutation du rôle-clé du peptide signal en cellules P815.....	137
8.3.	Inhibition compétitive alléguée entre peptide signal membranaire et soluble.....	140

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 143

9.	Discussion générale	144
10.	Perspectives.....	149
10.1.	A moyen terme : chimiothérapie et sélection	149
10.2.	A long terme : transgénèse	149

QUATRIÈME PARTIE : BIBLIOGRAPHIE 152

RÉSUMÉ

Les ruminants en général, les bovins élevés en conditions intensives en particulier, sont enclins aux pneumonies bactériennes. De la revue de littérature qui débute la thèse, il ressort que *Mannheimia haemolytica* est indubitablement le microbe le plus fréquemment isolé et celui dont la virulence pour le système respiratoire des bovins est la plus manifeste. En parcourant la littérature vétérinaire, il apparaît aussi que la plupart des auteurs considèrent que *M. haemolytica* n'est étroitement associée à une maladie que chez les ruminants. En outre, au moment de débiter cette thèse, on savait (i) que la maladie expérimentale induite par *M. haemolytica* est moins grave chez des animaux déplétés de leurs PMNs, (ii) que le facteur de virulence principal de *M. haemolytica* est sa leucotoxine (LKT), (iii) que cette LKT cause la nécrose des leucocytes des ruminants *in vitro* mais pas celle des leucocytes des autres espèces et (iv) que des anticorps monoclonaux dressés contre la β_2 -intégrine LFA-1 protègent les leucocytes des ruminants contre la nécrose induite par la LKT. Le modèle en vogue quand nous avons débuté les recherches présentées ici (2002) stipulait que la LKT de *M. haemolytica* est un ligand spécifiquement dressé contre la β_2 -intégrine LFA-1 exprimée à la surface des leucocytes des ruminants et que la liaison déclenche une cascade d'événements menant à la nécrose des leucocytes concernés, ce qui, *in vivo*, libère un cocktail de molécules qui sont responsables de l'exacerbation des lésions pulmonaires chez les ruminants.

L'objectif de la thèse était de mieux comprendre la nature de l'interaction entre la LKT et la β_2 -intégrine LFA-1 et, si possible, d'identifier la plateforme de liaison de la LKT sur l'une des deux sous-unités constitutives du LFA-1 (les glycoprotéines CD11a et CD18). Dès le début, l'angle d'attaque choisi fut de confronter les β_2 -intégrines LFA-1 de différentes espèces puisque, selon la littérature disponible, seuls les LFA-1 des ruminants semblaient pouvoir fonctionner comme récepteurs de la LKT.

Nous avons d'abord voulu identifier celle des deux sous-unités constitutives de la β_2 -intégrine LFA-1 qui fonctionne comme récepteur effectif. Dans ce but, nous souhaitions (i) exprimer des hétérodimères bispécifiques (CD11a de ruminant/CD18 de non-ruminant et inversement) à la surface de cellules dépourvues de β_2 -intégrines (K562) et (ii) mesurer si nous conférions ou non une sensibilité à la LKT en exprimant tel ou tel hétérodimère CD11a/CD18 bispécifique. Comme les séquences des gènes encodant les CD11a des ruminants n'étaient pas disponibles et que nous devions en disposer pour générer notre propre jeu de plasmides d'expression capables d'encoder les CD11a des ruminants, nous nous sommes lancés dans le séquençage des séquences codantes des bovins, ovins et caprins par RACE-PCR, ce qui a donné lieu à trois premières publications. Nous nous sommes attelés à un travail similaire pour les CD18 ovin et caprins, la séquence bovine ayant déjà été rendue publique à la faveur des travaux antérieurs menés pour identifier la mutation causale du syndrome BLAD. Notre jeu de plasmides d'expression nous a ensuite permis d'exclure l'intervention de la sous-unité CD11a.

Nous avons ensuite voulu contribuer à l'identification du module interne aux CD18 des ruminants spécifiquement ciblé par la LKT. Nous avons d'abord choisi de tester l'hypothèse « du résidu causal unique ». Pour ce faire et dans la foulée de notre angle d'attaque initial, nous avons inventorié, au sein de la portion extracellulaire du CD18, les résidus simultanément (i) conservés chez les ruminants et (ii) systématiquement différents chez les non-ruminants. Ce faisant, nous avons élaboré une liste de 17 résidus typiquement « ruminants ». Ensuite, nous avons généré un jeu de 17 plasmides d'expression encodant chacun un CD18 bovin artificiel dans lequel l'un des 17 résidus « ruminant » était substitué par le résidu « non-ruminant » correspondant. Ensuite, nous avons cotransfecté un plasmide encodant le CD11a bovin et l'un des plasmides du jeu de 17 précité en cellules LKT-résistante K562, nous avons confirmé l'expression membranaire des 17 hétérodimères CD11a/CD18 correspondants et nous avons montré que tous conféraient une sensibilité à la LKT. Nous avons donc réfuté formellement l'hypothèse « du résidu causal unique ».

Nous avons alors entrepris de construire trois jeux de cinq plasmides d'expression encodant des CD18 bovins partiellement substitués, et ce, en tenant compte des données de la littérature, qui suggéraient l'intervention soit du peptide signal, soit du module EGF-3.

Globalement, nous en avons conclu que c'est la nature du module EGF-3 qui impose à un CD18 quelconque la faculté de déclencher ou non un processus de nécrose en présence de LKT. En ce sens, nous avons répertorié des modules EGF-3 « résistants » (homme, souris et alpaga), semi-résistants (porc et dauphin) et sensibles (ruminants). De plus, associé à un module EGF-3 LKT-sensible, la nature du peptide signal altère l'intensité de la LKT-sensibilité, mais sans être capable de l'abolir.

SUMMARY

Domesticated bovines are known since decades to be prone to bacterial pneumonias. Among the causative agents, a consensus emerged stating that *Mannheimia haemolytica* is the most frequent bacterium isolated from bovine lungs throughout the world. Moreover, it appeared that its virulence specifically targets ruminant lungs *in vivo* and ruminant leucocytes *in vitro*. When the thesis was started, the two main actors underlying this species-specific virulence were known: the leukotoxin (LKT) on the pathogen side and the β_2 -integrin LFA-1 on the host side. The objective of the thesis was to contribute to the understanding of the LKT/LFA-1 interaction at the molecular level. Using a between-species perspective, we showed that (i) the CD11a subunit of the LFA-1 heterodimer was not involved in the LKT-specificity for ruminant LFA-1, (ii) the EGF-3 module within the CD18 controls the susceptibility of any given CD18 to LKT and (iii) a non cleavable signal peptide conjugated to a LKT-susceptible EGF-3-containing CD18 exacerbates LKT pronecrotic effects.

POSITION DE LA QUESTION

Les ruminants en général, les bovins élevés en conditions intensives en particulier, sont enclins aux maladies respiratoires. Elles engendrent l'administration à grande échelle de substances médicamenteuses en élevage bovin posant non seulement le délicat problème de leur rémanence ou de la présence de leurs résidus dans les produits de consommation mais également celui de l'impact des antibiotiques, clairement établi, sur l'émergence de maladies dues à la prépondérance de souches multirésistantes. Cette situation est particulièrement préoccupante dans notre pays puisque des études démontrent que la Belgique fait partie des six pays européens qui consomment le plus d'antibiotiques.

Parmi les maladies respiratoires, ce sont les pneumonies qui exercent, de loin, l'impact le plus flagrant : quelles que soient les conditions, elles sont responsables d'environ 75% des maladies diagnostiquées. Sur le plan de la morbidité, les taux moyens varient entre 15 et 45% (Kelly, 1986) et sur celui de la létalité, les pneumonies sont directement incriminées dans 45 à 55% des cas de maladie respiratoire. D'un autre côté, la mise en œuvre des traitements médicamenteux censés guérir les maladies respiratoires génère approximativement 8% des coûts de production totaux, sans tenir compte des pertes encourues du fait de performances zootechniques (gain quotidien moyen, indice de consommation et production laitière) moindres.

Comme responsables de ces pneumonies bactériennes, la littérature scientifique vétérinaire incrimine *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, *Streptococcus spp.* et *Staphylococcus spp.* De la revue de littérature qui débute la thèse, il ressort que *M. haemolytica* est indubitablement le microbe le plus fréquemment isolé et celui dont la virulence pour le système respiratoire des bovins est la plus manifeste. En parcourant la littérature vétérinaire, il apparaît aussi que la plupart des auteurs considèrent que *M. haemolytica* n'est étroitement associée à une maladie que chez les ruminants. En outre, au moment de débiter cette thèse, on savait (i) que la maladie expérimentale induite par *M. haemolytica* est moins grave chez des animaux déplétés de leurs PMN, (ii) que le facteur de virulence principal de *M. haemolytica* est sa leucotoxine (LKT), (iii) que cette LKT cause la nécrose des leucocytes des ruminants *in vitro* mais pas celle des leucocytes des autres espèces et (iv) que des anticorps monoclonaux dressés contre la β_2 -intégrine LFA-1 protègent les leucocytes des ruminants contre la nécrose induite par la LKT. Le modèle en vogue quand nous avons débuté les recherches présentées ici (2002) stipulait que la LKT de *M. haemolytica* est un ligand spécifiquement dressé contre la β_2 -intégrine LFA-1 exprimée à la surface des leucocytes des ruminants et que la liaison déclenche une cascade d'événement menant à la nécrose des leucocytes concernés, ce qui, *in vivo*, libère un cocktail de molécules qui sont responsables de l'exacerbation des lésions pulmonaires chez les ruminants.

OBJECTIFS

L'objectif global de la thèse était de contribuer à identifier le support matériel de la spécificité de la virulence de la leucotoxine (LKT) de *Mannheimia haemolytica* envers les leucocytes des ruminants. Cet objectif global a été scindé en une série d'objectifs intermédiaires. D'abord, il a fallu agréger les ressources théoriques et matérielles pour se donner les moyens d'identifier celle des deux sous-unités constitutives de l'hétérodimère LFA-1 qui était enrôlée dans une interaction moléculaire décisive avec la LKT. Ensuite, la sous-unité CD18 ayant été identifiée, le second objectif intermédiaire a consisté à générer un jeu de CD18 chimériques en s'inspirant des CD18 d'autres espèces, réputées « sensibles » ou « résistantes » à la LKT, dans le but d'identifier le ou les domaines ultimes qui sont nécessaires et suffisants pour conférer une sensibilité ou, inversement, conférer une résistance à l'action pronécrotique de la LKT.

PREMIÈRE PARTIE :
DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

1. Les pneumonies des bovins domestiques

1.1. Impact économique

Si l'Homme a rapidement compris qu'il était plus rentable pour lui de se livrer à des activités d'élevage plutôt que de chasse, il s'est cependant rendu compte au fil du temps qu'une bonne santé des populations animales de rente, si elle était un gage de qualité et de profit, n'était pas chose aisée. L'abattage sanitaire, la quarantaine, la restriction des importations, la vaccination et les traitements médicamenteux ont donc depuis toujours œuvré en vue, sinon d'une éradication, au moins d'un contrôle des maladies rencontrées. Dans le même ordre d'idées, l'administration, à grande échelle, de substances antibiotiques permet de lutter contre les agents pathogènes qui trouvent dans les conditions d'élevage concentrationnaires une niche de choix extrêmement propice à la contagion.

Ces pratiques séculaires présentent malheureusement des inconvénients majeurs dont la prise de conscience est pourtant relativement récente : tout d'abord, la pression de sélection appliquée par l'Homme envers les animaux d'élevage s'exerce unilatéralement en faveur des critères relatifs aux productions alors que les bovins n'ont jamais été soumis à des pressions d'infection plus agressives qu'aujourd'hui. Ensuite, il est maintenant unanimement reconnu que l'administration à grande échelle de substances médicamenteuses en élevage bovin pose non seulement le délicat problème de leur rémanence ou de celle de leurs résidus dans les produits de consommation mais également celui de l'impact des antibiotiques, clairement établi, sur l'émergence de maladies dues à la prépondérance de souches multirésistantes (Ferber, 2000; Angulo *et al.*, 2004; Molbak, 2004). Cette situation est particulièrement préoccupante dans notre pays puisque des études démontrent que la Belgique fait partie des six pays européens qui consomment le plus d'antibiotiques (Goossens *et al.*, 2005; Ferech *et al.*, 2006; van de Sande-Bruinsma *et al.*, 2008).

Le secteur des productions animales s'oriente donc de plus en plus d'une part vers une meilleure connaissance des maladies prédominantes et, d'autre part, vers la sélection d'animaux plus résistants à celles-ci. Du point de vue sociétal, l'intérêt est multiple puisque se donner les moyens de renoncer à injecter systématiquement des antibiotiques, des anti-inflammatoires et des bronchodilatateurs dès lors que des bovins manifestent des signes cliniques ne peut qu'aller dans le sens (i) d'une diminution du risque d'émergence de bactéries multirésistantes pathogènes (notamment pour l'Homme), (ii) d'une plus-value de la qualité de la viande en termes de contenu en résidus et (iii) d'une amélioration du bien-être et de la santé des animaux (iv) sans aucun impact négatif sur la rentabilité des exploitations, ni sur le prix de la viande à l'étal.

Diminuer l'importance des maladies bovines est donc devenu une priorité absolue, puisque l'on sait que ce sont les coûts liés aux maladies qui ont l'impact le plus important sur la rentabilité des fermes et ce, indépendamment du cours du marché (Gardner *et al.*, 1996). Ces coûts sont, sans la moindre équivoque, surtout causés par les maladies respiratoires dont l'incidence chez les veaux est de 25% durant la première année. Les mâles sont plus touchés que les femelles, à la fois durant les

périodes de présevrage et d'engraissement (Martin, 1981; Muggli-Cockett *et al.*, 1992; Griffin *et al.*, 2000; Speer *et al.*, 2001).

Parmi les maladies respiratoires, ce sont les pneumonies qui exercent, de loin, l'impact le plus flagrant : quelles que soient les conditions, elles sont responsables d'environ 75% des maladies diagnostiquées (Jensen *et al.*, 1976; Roth, 1986; Edwards, 1996). Sur le plan de la morbidité, les taux moyens varient entre 15 et 45% (Kelly, 1986) et sur celui de la létalité, les pneumonies sont directement incriminées dans 45 à 55% des cas de maladie respiratoire (Perino, 1992; Vogel et Parrott, 1994; Edwards, 1996). D'un autre côté, la mise en œuvre des traitements médicamenteux censés guérir les maladies respiratoires génère approximativement 8% des coûts de production totaux (Martin, 1981; Griffin *et al.*, 1995; Griffin, 1997), sans tenir compte des pertes encourues du fait de performances zootechniques (gain quotidien moyen, indice de consommation et production laitière) moindres. Par ailleurs, la race Blanc Bleu Belge, numéro un chez nous, se distingue des autres races bovines par des capacités pulmonaires et cardiaques largement inférieures à celles des autres bovins (Lekeux *et al.*, 1994). Ces déficits tant anatomiques que fonctionnels en font des animaux moins résistants en cas de maladie respiratoire avec une morbidité associée de 36% (Bureau *et al.*, 2001). De plus, la même enquête démontre que le taux de mortalité associé aux maladies respiratoires pendant la première année de vie vaut 2,1% en spéculation Blanc Bleu Belge alors qu'il n'est que de 1,4% dans les autres races (Muggli-Cockett *et al.*, 1992; Bureau *et al.*, 2001).

1.2. Présentation clinique

Les pneumonies se manifestent de multiples façons chez les bovins, en fonction de l'âge de l'animal, de l'agent pathogène et du stade de la maladie. Parmi les premiers signes cliniques, on retrouve notamment la fièvre, ce qui correspond pour les bovins à une température supérieure à 40°C (température normale : 38,0°C à 39,3°C). Les animaux malades peuvent être atteints de dépression : ils baissent la tête, ont un regard abattu et restent à l'écart des autres bovins. Ces deux premiers symptômes peuvent engendrer une diminution de l'appétit, ce qui se traduit par un flanc creusé en raison d'un déficit de fibres dans le tube digestif. On retrouve également des sécrétions sereuses, d'abord nasales, puis oculaires. Cet écoulement nasal peut devenir purulent selon l'état d'avancement de la maladie, voire peut être souillé de sang s'il y a irritation sévère des voies respiratoires. Les animaux malades peuvent avoir une démarche raide due à des douleurs musculaires et articulaires provoquées par une charge d'endotoxines accrue. Ils salivent et bâillent plus que d'habitude. Parce que l'animal ne se sent pas bien, il aura tendance à moins se lécher les poils et le museau. Ce phénomène, associé à une légère déshydratation, provoque un assèchement du pourtour de la bouche, ce qui conduit à un museau croûteux. La respiration devient rapide et superficielle. Une légère toux apparaît également.

1.3. Prophylaxie et traitement

Les principaux agents biologiques responsables des pneumonies des bovins incluent (i) le nématode *Dictyocaulus viviparus*, (ii) les virus BHV-1 (*bovine herpesvirus-1*), BRSV (*bovine respiratory syncytial virus*), BPI-3 (*bovine parainfluenza-3*), BVD-MD (*bovine viral diarrhoea-mucosal disease*), adénovirus et coronavirus et (iii) les bactéries *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Mycoplasma dispar*, *Streptococcus spp.* et *Staphylococcus spp.* (Dungworth, 1992; Lopez, 2001). Ces auteurs s'accordent cependant pour dire que, quelle que soit la cause initiale de l'atteinte pulmonaire (environnementale, virale, bactérienne ou parasitaire), c'est *M. haemolytica* que l'on retrouve le plus systématiquement comme agent compliquant. Tout se passe comme si les facteurs environnementaux et les agents microbiens faisaient le « lit » de *M. haemolytica* dans les poumons, cette dernière faisant à son tour le « lit » d'autres bactéries au premier rang desquelles on retrouve *P. multocida* et *A. pyogenes*.

L'utilisation d'antibiotiques à grande échelle en prophylaxie, métaphylaxie ou stimulation de croissance a favorisé l'émergence de souches de *M. haemolytica* résistantes à une large gamme d'antimicrobiens comme les bêta-lactames, les tétracyclines, les sulfonamides et les aminoglycosides (Watts *et al.*, 1994; Martel *et al.*, 1995; Hormansdorfer et Bauer, 1996; Caprioli *et al.*, 2000; Kehrenberg *et al.*, 2001). La plupart des gènes de résistance, dont certains ont pu être clonés et séquencés (Highlander, 2001), sont associés à des éléments génétiques mobiles et peuvent donc être aisément échangés entre bactéries (Kehrenberg *et al.*, 2001).

En résumé, diminuer l'impact de la mannheimiose tout en réduisant l'administration massive d'antibiotiques est une priorité tant du point de vue économique que de ceux de la santé publique et du bien-être animal.

2. La mannheimiose

2.1. *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica est un coccobacille à gram négatif, faiblement hémolytique, dont la filiation taxonomique complète est la suivante : super-royaume des *Bacteria* ; phylum des *Proteobacteria* ; classe des *Gamma-Proteobacteria* ; ordre des *Pasteurellales* ; famille des *Pasteurellaceae* ; genre *Mannheimia* (NCBI taxonomy browser, sans date). Depuis sa découverte en 1885 par Théodore Kitt, elle changea plusieurs fois « d'identité » : baptisée *Bacterium bipolare multocidum* (Kitt, 1885), on la connut ensuite un certain temps sous le nom de *Pasteurella bovisseptica* (Jones, 1921) avant d'être renommée *Pasteurella haemolytica* en 1932 (Newson, 1932) et classifiée en deux biotypes, A et T, sur base de leur capacité à fermenter respectivement l'arabinose ou le thréhalose (Smith, 1961). Treize sérotypes A et quatre sérotypes T furent identifiés (Younan et Fodor, 1995), ces derniers étant reclassifiés d'abord en tant que *Pasteurella threhalosi* en 1990 (Bingham *et al.*, 1990; Sneath et Stevens, 1990) et ensuite, plus récemment, en tant que *Bibersteinia threhalosi* (Blackall *et al.*, 2007). En 1999, des études basées sur des hybridations ADN-ADN et du séquençage de l'ARN 16S ont conduit à renommer les sérotypes A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16 et A17, basés sur les différences phénotypiques des polysaccharides capsulaires, en tant que *Mannheimia haemolytica* (en hommage au biologiste allemand Walter Mannheim dont les recherches ont significativement contribué à la connaissance de la taxonomie de la famille des *Pasteurellaceae*) alors que le dernier sérotype, A11, devenait *Mannheimia glucosida* (Younan et Fodor, 1995; Angen *et al.*, 1999).

Des douzes sérotypes décrits, A1 et A2 prévalent de par le monde. A1 est connu comme l'agent causal majeur de la mannheimiose bovine, aussi connue sous le nom de pasteurellose ou fièvre des transports (*shipping fever*), même si d'autres sérotypes comme A6, A7, A9, A11 et A12 peuvent aussi être isolés (Quirie *et al.*, 1986). A1 et A2 sont tous deux capables de coloniser le tractus respiratoire supérieur des bêtes bovine et ovine mais sont souvent spécifiques. Ainsi, les bovins sains sont fréquemment porteurs du sérotype A2 dans leur tractus respiratoire supérieur mais sous l'effet d'un stress ou d'une coinfection, A1 remplace rapidement A2 en tant que sérotype principal (Frank et Smith, 1983), probablement suite à un transfert horizontal à partir d'animaux infectés (Highlander, 2001). La prévalence du sérotype A6 serait croissante au Royaume-Uni (Donachie, 1998) et aux Etats-Unis (Purdy *et al.*, 1997; Al-Ghamdi *et al.*, 2000) avec environ 30% des souches sérotypées. Néanmoins, sur base des profils des lipopolysaccharides et des protéines de la membrane externe de chaque sérotype, il a été conclu que, exception faite de la nature de leur capsules, les sérotypes A1 et A6 étaient extrêmement similaires (Davies et Donachie, 1996; Morton *et al.*, 1996).

La pathogénie des pneumonies à *M. haemolytica* fait intervenir différents paramètres comme des virus (*bovine parainfluenza virus 3*, *bovine herpes virus 1* et *bovine respiratory syncytial virus*), des bactéries (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* et *Arcanobacterium pyogenes*), l'environnement (charge élevée en poussières, changements d'alimentation, températures

excessives,...), l'administration de glucocorticoïdes, le creux immunitaire ou encore le stress associé au sevrage, à l'écorchage ou au transport, qui prédisposent l'animal (Yates, 1982; Dungworth, 1992; Lopez, 2001). Ces différents facteurs semblent altérer l'épithélium du tractus respiratoire supérieur de manière à permettre à la bactérie de le coloniser et de migrer du nasopharynx aux poumons où elle cause une pneumonie bronchoalvéolaire qui s'accompagne d'une morbidité et d'une mortalité élevées (Jensen *et al.*, 1976; Vogel et Parrott, 1994; Edwards, 1996).

2.2. Facteurs de virulence

Plusieurs facteurs de virulence sont décrits. Ils incluent les adhésines qui sont impliquées dans la colonisation initiale et l'établissement dans le nasopharynx par adhérence à la surface épithéliale (Clarke *et al.*, 2001). Cette liaison permet de résister aux flux d'air, aux mécanismes immunitaires innés et adaptatifs et à la clearance mucociliaire. La capsule intervient dans l'invasion des poumons en permettant l'adhérence à l'épithélium respiratoire (Morck *et al.*, 1988). *M. haemolytica* possède de nombreuses protéines de la membrane externe (OMP, *outer membrane protein*) (Pandher *et al.*, 1999). Certaines sont régulées par le fer et sont physiologiquement et pathologiquement importantes car elles jouent un rôle dans le principal mécanisme d'absorption de cet élément (Ogunnariwo *et al.*, 1997). De plus, elles sont des agents chimiotactiques pour les neutrophiles et inhibent leurs mécanismes de phagocytose (Iovane *et al.*, 1998). Parmi ces OMP, l'OmpA, protéine hautement conservée, permet la liaison aux récepteurs des cellules-hôtes du tractus respiratoire supérieur (Davies et Lee, 2004; Kisiela et Czuprynski, 2009). Beaucoup de protéases sont associées à *M. haemolytica*. Une glycoprotéase permet la lyse des IgG1, premier anticorps du tractus respiratoire inférieur (Lee et Shewen, 1996). Par ailleurs, une neuraminidase clive les acides sialiques des glycoconjugués, ce qui réduit la viscosité du mucus et permet une interaction plus intime de la bactérie avec la surface des cellules épithéliales (Krivan *et al.*, 1988). Le lipopolysaccharide (LPS) contribue aux lésions pulmonaires par une variété de mécanismes complexes incluant la stimulation des leucocytes à produire des cytokines proinflammatoires, l'activation des cascades du complément et de la coagulation et la cytolysse (Lafleur *et al.*, 2001; Malazdrewich *et al.*, 2001; McClenahan *et al.*, 2008). La leucotoxine (LKT) constitue le facteur de virulence majeur. Elle sera examinée séparément (cf. paragraphe 3).

2.3. Lésions macro- et microscopiques

Macroscopiquement, ce type de pneumonie est caractérisé par une consolidation avec hépatisations rouge et grise des parties antéro-ventrales des poumons, parfois accompagnées de zones de pleurésie fibrineuse (figure 1) (Zecchinon *et al.*, 2005).



Figure 1: Pneumonie antéro-ventrale hémorragique et nécrosante avec pleurésie aiguë fibrineuse viscérale où *Mannheimia haemolytica* a pu être mise en évidence. Grandes plages de nécrose observées sur un lobe diaphragmatique gauche coupé transversalement dans son tiers proximal.

Microscopiquement, de larges zones de nécrose, ceinturées par des amas de neutrophiles dégénérés (ou pyocytes) en quantités très importantes, constituent la signature de *M. haemolytica* (figure 2). L'ampleur de cette nécrose est en fait concomitante à la cytolysse d'un nombre anormalement élevé de neutrophiles et de macrophages qui, via le déversement d'une multitude de composés toxiques (enzymes, histamine, prostaglandines,...) *in situ*, aggravent les lésions pulmonaires (Yates, 1982; Slocombe *et al.*, 1985; Dungworth, 1992; Lopez, 2001; Zecchinon *et al.*, 2005).

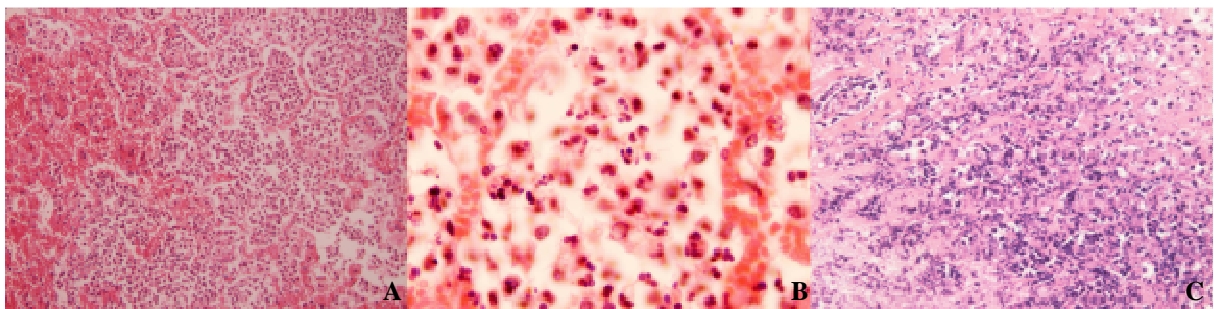


Figure 2 : Altérations histologiques pulmonaires typiques d'une infection à *Mannheimia haemolytica* (hématoxyline-éosine). On constate une infiltration massive dans les alvéoles de leucocytes (A, grossissement 200x), s'avérant être des polymorphonucléaires neutrophiles (B, grossissement 400x) qui vont rapidement se nécroser en masse (C, grossissement 200x) pour former un foyer purulent.

Sur un plan biologique plus général, il faut constater que *M. haemolytica* n'est pas responsable de pneumonies chez les animaux non-ruminants, ce qui suggère l'existence d'une virulence qui s'exprime spécifiquement envers ces derniers.

3. La leucotoxine de *M. haemolytica*

3.1. Organisation structurale du gène

L'organisation génomique de l'opéron *LKT* (*LKTCABD*) de *M. haemolytica* est similaire à celle de l'hémolysine d'*Escherichia coli* (*hlyCABD*) ; il contient quatre gènes (figure 3) (Narayanan *et al.*, 2002). Le premier (*LKTC*) code pour une protéine responsable de l'activation de la toxine par acylation (*LKTC*). La leucotoxine structurelle (*LKTA*) est synthétisée à partir du gène *LKTA*. Les deux derniers gènes (*LKTB/D*) codent pour, respectivement, un *ATP-binding cassette* (ABC) *transporter* et une *membrane fusion protein* (MFP) responsables du transport et de la sécrétion de la *LKTA* (Strathdee et Lo, 1989; Highlander *et al.*, 1990). Deux sortes de transcrits sont produits dont le principal, long de ~3,5 kb, code uniquement pour *LKTC* et le second (~7,5 kb), plus rare, pour *LKTCABD* en entier (Strathdee et Lo, 1989; Highlander *et al.*, 1993). Un cinquième gène (*tolC*), situé en dehors de l'opéron *LKT*, code pour une protéine (TolC) jouant un rôle important au niveau de la sécrétion de la toxine (Linhartova *et al.*, 2010).

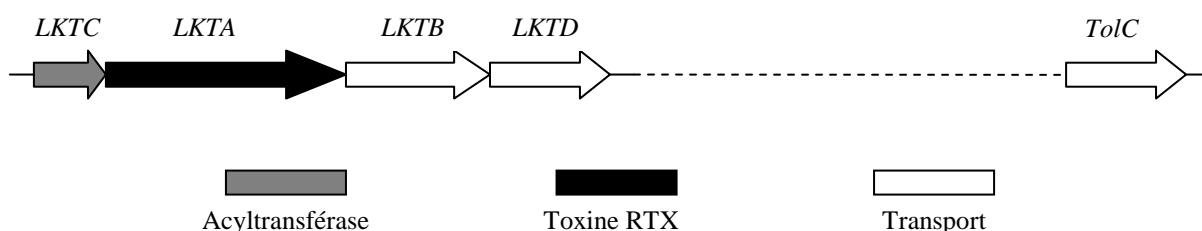


Figure 3 : Représentation graphique du cluster de gènes dénommé *LKT* de *Mannheimia haemolytica* (Genbank no. accession : NZ_AASA000000000). Les flèches représentent les régions codantes et le sens de transcription.

3.2. Contrôle de l'expression

La région promotrice est complexe. L'expression de la *LKT* est régulée au niveau transcriptionnel par différents facteurs cis- et trans-régulateurs (Strathdee et Lo, 1989; Highlander *et al.*, 1990; Highlander *et al.*, 1993; Highlander, 2001; Marciel et Highlander, 2001). L'activité du promoteur de l'opéron atteint son maximum au début de la phase logarithmique de croissance de la bactérie et décline quand les cellules atteignent la fin de celle-ci (Fedorova et Highlander, 1997) ; la production de *LKT* se faisant en parallèle (Baluyut *et al.*, 1981; Berggren *et al.*, 1981; Waurzyniak *et al.*, 1994). La synthèse et la production de la toxine est observée chez toutes les souches de *M. haemolytica*, mais il existe une variation d'intensité selon le sérotype considéré (Davies et Baillie, 2003).

La croissance bactérienne et la production de *LKT* sont co-régulées par différents facteurs comme le fer, la température (Marciel et Highlander, 2001) et l'oxygène (O_2). L'importance du rôle de l' O_2 a été démontrée suite à la suppression ou à l'augmentation de la transcription de la *LKT*,

respectivement en aérobiose ou en anaérobiose, par le facteur de transcription FnrP (*fumarate and nitrate reduction protein*), un homologue du Fnr (régulateur transcriptionnel de la respiration anaérobie d'*E. coli*) (Uhlich *et al.*, 1999; Uhlich *et al.*, 2000). De plus, des résultats similaires de régulation anaérobie ont également été obtenus chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kolodrubetz *et al.*, 2003). A première vue, une augmentation de production de toxines en conditions anaérobiques semble étonnante pour un pathogène respiratoire. Néanmoins, cela peut apparaître comme un avantage évolutif puisque les lésions pulmonaires sont antéro-ventrales, une région connue pour son oxygénation moindre pendant la progression de la maladie. Ainsi, l'augmentation des lésions génère des milieux moins oxygénés, ce qui engendre une plus grande production de LKT et, donc, amplifie la maladie.

3.3. Organisation structurale de la protéine

La leucotoxine est une protéine de 102 kDa, composée de 953 acides aminés, sécrétée en phase logarithmique de croissance par une variété de bactéries Gram-. Elle appartient à la famille des toxines dites « RTX » (pour *repeats in toxins*), lesquelles comprennent toutes, près de leur extrémité C-terminale, des régions hautement conservées consistant en répétitions d'un nonapeptide de type X-(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D (avec X = n'importe quel résidu), liant les ions Ca^{2+} , dont le nombre varie de 6 (comme la LKTA) à 41 (Lo, 1990 ; Coote, 1992 ; Jeyaseelan *et al.*, 2002 ; Mena-Rojas *et al.*, 2004) (figure 4). Du côté C-terminal, on retrouve également une séquence-signal de sécrétion, composée de 70 acides aminés, reconnue par le complexe LKTB/LKTD/TolC (Yin *et al.*, 1995). Quant à la région N-terminale, composée de résidus hydrophobes, elle serait impliquée dans la liaison au récepteur ainsi que dans la formation de pores (Narayanan *et al.*, 2002). L'acylation de la lysine 554 (ajout de groupements d'acides gras par la transacylase LKTC) augmente l'hydrophobicité de la LKT, ce qui permet son insertion dans la membrane des cellules ciblées et la formation des pores transmembranaires (Thumbikat *et al.*, 2003).

Le tableau 1 recense les toxines RTX les mieux caractérisées à ce jour. La LKTA de *M. haemolytica* partage avec deux de ces toxines (la LtxA d'*A. actinomycetemcomitans* et l'ApXIIIa d'*A. pleuropneumoniae*) un ensemble de caractéristiques biologiques : tout d'abord, chacune d'elles est sécrétée par une bactérie qui n'est pathogène que pour une espèce donnée, causant respectivement une pneumonie bronchoalvéolaire fibrino-hémorragique chez les ruminants, une parodontite agressive chez l'Homme et une pleuropneumonie fibrino-hémorragique chez le porc. Dans les trois cas, les lésions sont caractérisées par des foyers de nécrose de coagulation multifocaux, lesquels sont engendrés par la présence d'un nombre exceptionnellement élevé de neutrophiles et macrophages dégénérés ou en voie de nécrose. Enfin, les trois toxines sont reconnues comme des facteurs de virulence majeurs puisque (i) leur administration, sous forme native ou recombinante purifiée, reproduit fidèlement les signes cliniques et les lésions sévères typiques (Kamp *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1998b; Ambagala *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999; Jeyaseelan *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Cudd *et*

al., 2001; Jeyaseelan *et al.*, 2001; Deshpande *et al.*, 2002; Davies et Baillie, 2003) alors que (ii) les bactéries ne produisant plus les toxines perdent leur pouvoir pathogène (Tatum *et al.*, 1998). Ainsi, l'inactivation de la LKTA par *gene knock-out* cause une disparition partielle de la virulence puisqu'on n'observe presque plus l'apparition des lésions typiques alors que la faculté de colonisation du tractus respiratoire supérieur des veaux reste intacte (Highlander *et al.*, 2000).

Il est de plus intéressant de constater que si la leucotoxine doit son nom à la spécificité de liaison qu'elle exhibe vis-à-vis des leucocytes de plusieurs espèces de mammifères, elle n'induit la mort cellulaire que lorsqu'elle est fixée à ceux des ruminants (Kaehler *et al.*, 1980; Shewen et Wilkie, 1982; Silflow et Foreyt, 1994; Dassanayake *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Fett *et al.*, 2008), suggérant que la spécificité d'interaction entre la LKTA et les leucocytes des ruminants pourrait être tenue pour responsable de la cytotoxicité spécifique de *M. haemolytica* envers ces derniers.

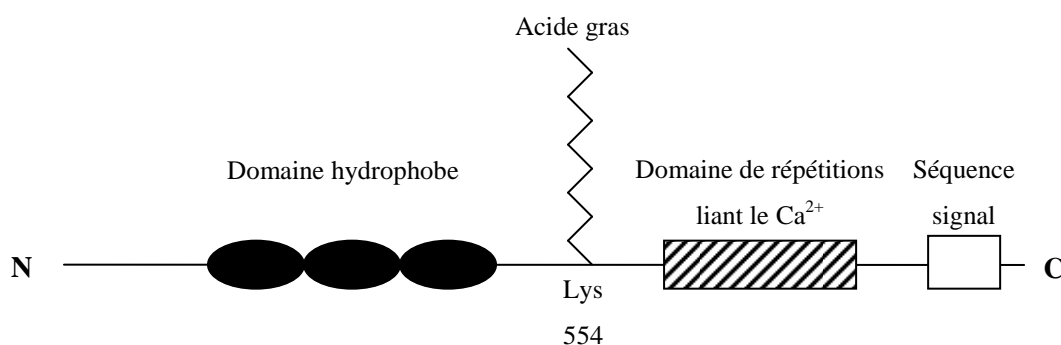


Figure 4 : Représentation graphique de la structure en domaines de la protéine LKTA.

Tableau 1: Inventaire des toxines RTX les mieux caractérisées (Linhartova *et al.*, 2010)

Toxine RTX	Bactérie	MM (kDa)	Cibles cellulaires et spécificité d'espèce	Références
HlyA	<i>Escherichia coli</i> uropathogène	110	Spectre large	(Goebel et Hedgpeth, 1982)
EhxA	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique	107	Erythrocytes et leucocytes humains et bovins	(Schmidt <i>et al.</i> , 1995)
CyaA	<i>Bordetella pertussis</i>	177	Essentiellement les phagocytes myéloïdes humains CD11b ⁺	(Glaser <i>et al.</i> , 1988)
LKTA	<i>Mannheimia haemolytica</i>	102	Leucocytes et plaquettes bovins, faible activité hémolytique	(Lo <i>et al.</i> , 1987)
PILKTA	<i>Mannheimia varigena</i>	102	Leucocytes porcins	(Chang <i>et al.</i> , 1993)
PaxA	<i>Pasteurella aerogenes</i>	107,5	Activité hémolytique	(Kuhnert <i>et al.</i> , 2000)
PvxA	<i>Proteus vulgaris</i>	110	Erythrocytes	(Welch, 1987)
MmxA	<i>Morganella morganii</i>	110	Erythrocytes	(Koronakis <i>et al.</i> , 1987)
LtxA	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	114	Leucocytes humains et de primates	(Lally <i>et al.</i> , 1989)
ApxIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	110	Spectre large	(Frey <i>et al.</i> , 1991)
ApxIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	102,5	Leucocytes porcins, faible activité hémolytique	(Chang <i>et al.</i> , 1989)
ApxIIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	120	Leucocytes porcins, activité hémolytique	(Jansen <i>et al.</i> , 1993)
ApxIVa	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	200	Faible activité hémolytique	(Schaller <i>et al.</i> , 1999)
ApxI	<i>Actinobacillus suis</i>	110	Lymphocytes et érythrocytes équins et porcins	(Schaller <i>et al.</i> , 2000)
ApxII	<i>Actinobacillus suis</i>	102,5	Lymphocytes et érythrocytes équins et porcins	(Burrows et Lo, 1992)
ApxII	<i>Actinobacillus porcitonisillarum</i>	102,5	Lymphocytes et érythrocytes	(Kuhnert <i>et al.</i> , 2005)
AqxA	<i>Actinobacillus equuli</i>	110	Lymphocytes et érythrocytes équins et porcins	(Berthoud <i>et al.</i> , 2002)
VcRtxA	<i>Vibrio cholerae</i>	484	Fibroblastes rénaux simiens et cellules épithéliales laryngées humaines	(Lin <i>et al.</i> , 1999)
VvRtxA	<i>Vibrio vulnificus</i>	550	Cellules épithéliales intestinales humaines	(Chen <i>et al.</i> , 2003)
MbxA	<i>Moraxella bovis</i>	99	Leucocytes et érythrocytes bovins	(Angelos <i>et al.</i> , 2003)
RtxA	<i>Kingella kingae</i>	?	Cellules <i>macrophage-like</i> , synoviales et épithéliales respiratoires	(Kehl-Fie et St Geme, 2007)

3.4. Cellules cibles

La pathogénie de la mannheimiose implique les neutrophiles et les macrophages dont le rôle central a été démontré expérimentalement par plusieurs équipes indépendantes. Ainsi, une exposition par aérosol à *M. haemolytica* induit, chez des veaux, une infiltration rapide de neutrophiles dans les poumons et une augmentation significative du ratio neutrophile/macrophage dans le liquide de lavage pulmonaire (Walker *et al.*, 1985). Parmi les leucocytes, les macrophages sont plus résistants que les neutrophiles aux effets lytiques de la LKTA et les macrophages alvéolaires des bêtes adultes sont plus résistants que ceux des veaux de moins de 16 semaines (O'Brien et Duffus, 1987).

Par ailleurs, lorsque des bovins sont déplétés de leurs propres neutrophiles circulants par un traitement à l'hydroxyurée, la pneumonie est moins sévère et moins étendue que chez l'animal normalement pourvu en neutrophiles (Slocombe *et al.*, 1985; Breider *et al.*, 1988; Weiss *et al.*, 1991). Ces données *a priori* paradoxales suggèrent que les neutrophiles endossent un rôle proactif dans la progression de la mannheimiose.

Une autre observation intéressante a permis de poser une hypothèse quant à la nature de l'interaction entre la LKTA et les neutrophiles des ruminants : la LKTA n'induit pas de cytolysse des leucocytes si ces derniers sont prélevés chez des animaux BLAD (acronyme désignant la maladie génétique baptisée *bovine leukocyte adhesion deficiency*) (Jeyaseelan *et al.*, 2000). Ce résultat est de nouveau paradoxal parce que ces animaux souffrent d'un déficit fonctionnel de leurs polymorphonucléaires neutrophiles qui ralentit voire abolit leur capacité à s'extraire du torrent sanguin par diapédèse, ce qui cause l'apparition récurrente de maladies. Au niveau moléculaire, le phénotype BLAD est causé par la mutation D128G dans la sous-unité β (ou CD18) des β_2 -intégrines (Shuster *et al.*, 1992b) qui entraîne une diminution très importante de leur expression en surface (Cox *et al.*, 1997).

4. LFA-1, le récepteur de la leucotoxine

4.1. Les β_2 -intégrines

Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui jouent un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire bien que leur reconnaissance en tant que récepteurs de surface ne date que de 1987 (Hynes, 1987). Depuis, elles ont été étudiées intensivement (plus de 50000 articles à ce jour) et semblent impliquées dans de nombreux processus biologiques, physiologiques et pathologiques. Toutes les intégrines sont des hétérodimères dont les sous-unités α et β sont associées non covalentiellement et possèdent chacune un domaine extracellulaire volumineux et des domaines transmembranaire et cytoplasmique plutôt courts (Hynes, 1992). Une vingtaine d'intégrines sont actuellement décrites ; elles sont classées en huit sous-familles selon leur sous-unité β commune (tableau 2), par exemple la famille des β_2 -intégrines dont la sous-unité β_2 est le CD18.

Celle-ci s'associe avec les sous-unités α CD11a-d, formant ainsi les hétérodimères CD11a/CD18 ou LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*) (figure 5) qui est quantitativement majoritaire, CD11b/CD18 ou Mac-1 (*Macrophage antigen-1*) ou encore CR3 (*Complement receptor 3*), CD11c/CD18 ou CR4 (*Complement receptor 4*) et CD11d/CD18 (Berman *et al.*, 2003). Les récepteurs CD11a-d/CD18 sont présents à la surface de tous les leucocytes et permettent une adhésion de haute affinité à une grande variété de types cellulaires qui expriment un ou plusieurs de leurs ligands, à savoir les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM)-1 à -5 et la *Junctional adhesion molecule* (JAM)-A. Cette sous-famille d'intégrines est ainsi responsable de la fixation des leucocytes à la surface des endothéliums, une des étapes préliminaires qui permet leur déplacement vers les lieux de la réaction inflammatoire (Bailly *et al.*, 1995; Gahmberg *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1997; Zecchinon *et al.*, 2006a; Zecchinon *et al.*, 2006b).

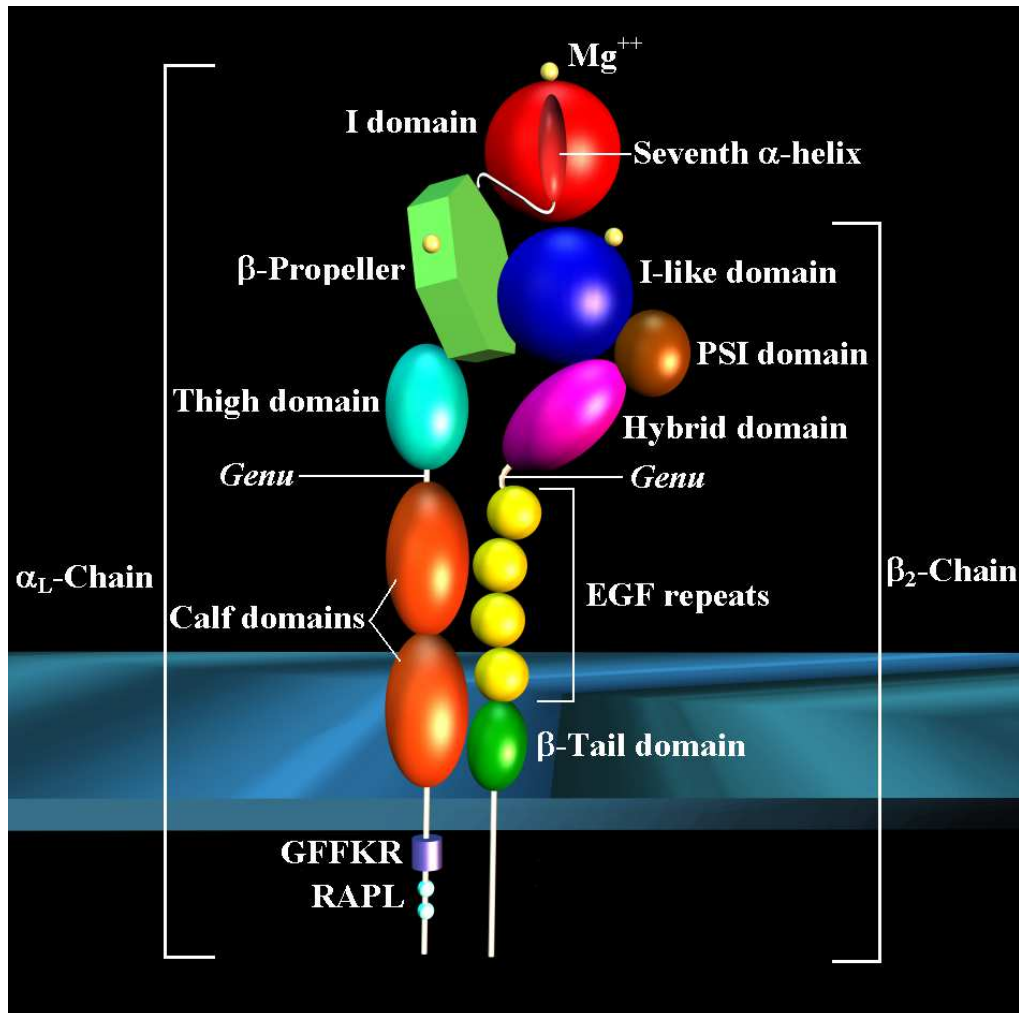


Figure 5 : Représentation schématique du LFA-1 (Zecchinon *et al.*, 2006a)

Tableau 2 : La famille des intégrines (Revillard, 1998; Hynes, 2002)

Récepteurs intégrines		Ligands	Expression
β_1	VLA-1, $\alpha_1\beta_1$, CD49a/CD29	Laminine, collagène I et IV	T*, B*, Mo
	VLA-2, $\alpha_2\beta_1$, CD49b/CD29	Laminine, collagène I et IV	T*, NK, Mo, pl
	VLA-3, $\alpha_3\beta_1$, CD49c/CD29	Fibronectine, collagène, laminine-5	Mo, Tc, LAK
	VLA-4, $\alpha_4\beta_1$, CD49d/CD29	VCAM-1, fibronectine	Mo, T*, B, CL, F
	VLA-5, $\alpha_5\beta_1$, CD49e/CD29	Fibronectine et laminine-1	T*, Mo
	VLA-6, $\alpha_6\beta_1$, CD49f/CD29	Laminine	T*, Mo, pl
	$\alpha_7\beta_1$	Laminine	T, Mo
	$\alpha_8\beta_1$?	?
	$\alpha_v\beta_1$	Vitronectine, fibronectine (?)	?
β_2 (CD18)	LFA-1, $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18	ICAM-1, 2, 3, 4 et 5, JAM-1	T, B, Mo, N, NK
	Mac-1, $\alpha_M\beta_2$, CR3, CD11b/CD18	ICAM-1, iC3b, fibrinogène	Mo, NK
	P150,95, $\alpha_X\beta_2$, CR4, CD11c/CD18	iC3B, fibrinogène	NK, N
	$\alpha_D\beta_2$, CD11d/CD18	ICAM-1 et 3	?
β_3	$\alpha_v\beta_3$, CD51/CD61	Laminine, CD31, fibrinogène, fibronectine, vitronectine, thrombospondine	Pl
	$\alpha_{IIb}\beta_3$, CD41/CD61	vWF, fibrinogène, fibronectine, vitronectine, thrombospondine	B, Mo, pl, F
β_4	$\alpha_6\beta_4$, $\alpha_E\beta_4$	Laminines-1, 4 et 5	T, Mo, ép
β_5	$\alpha_v\beta_5$	Vitronectine	Mo
β_6	$\alpha_v\beta_6$	Fibronectine	L
β_7	$\alpha_4\beta_7$	MAdCAM-1, VCAM-1, fibronectine	B
	$\alpha_E\beta_7$, HML-1	E-cadhérine	T
β_8	$\alpha_v\beta_8$?	?

B : lymphocyte B, B* : lymphocyte B activé, CL : cellule de Langerhans, ép : cellule épithéliale, F : fibroblaste, L : leucocyte, LAK : cellule NK activée par l'IL-2, Mo : monocyte, N : neutrophile, NK : natural killer, pl : plaquettes, T : lymphocyte T, T* : lymphocyte T activé, Tc : lymphocyte T cytotoxique.

4.2. Organisation structurale de la β_2 -intégrine LFA-1

Zecchinon L., Fett T., Vanden Bergh P., Desmecht D.

Anatomy of the lymphocyte function-associated antigen-1.

Clin Applied Immunol Rev, 2006, 6, 149-172.



ELSEVIER

Clinical and Applied Immunology Reviews 6 (2006) 149–172

Clinical
and
Applied
Immunology
Reviews

Anatomy of the lymphocyte function-associated antigen-1

L. Zecchinon, MS, T. Fett, BEng, P. Vanden Bergh, DVM,
D. Desmecht, DVM, PhD*

*Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège,
FMV Sart Tilman B43, B-4000 Liège, Belgium*

Received 2 December 2005; received in revised form 26 September 2006; accepted 26 September 2006.

Abstract

The β_2 -integrin lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) is made of the association of the CD11a and CD18 subunits that each possesses a large extracellular region and short transmembrane and cytoplasmic parts. A general comparison among species enlightens the importance of especially conserved functional regions, as well as their role in folding and heterodimerization. This review also focuses on providing insights into structural aspects that lead to lymphocyte function-associated antigen-1 ability, central to its critical role in the molecular interactions responsible for leukocyte adhesion and migration in the immune system, to modulate dynamically its adhesiveness through avidity (affinity and valency)-based mechanisms.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: LFA-1; Integrin; Interspecies; Folding; Modulation

1. Introduction

Cell adhesion receptors are known to play an essential role in multicellular organisms by mediating the direct association of cells with each other and with proteins of the extracellular matrix, as the formation of tight associations with neighboring cells is a prerequisite to build cell layers, tissues, and organs [1–3]. Therefore, multicellular organisms express specialized surface receptors (not found in prokaryotes or unicellular eukaryotes) that not only support the structural integrity of cells and tissues, but also contribute to the transduction of signals. These receptors can be subdivided into several groups, most importantly the

Abbreviations: EGF, epidermal growth factor; ICAM, intercellular adhesion molecule; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen-1; MIDAS, metal ion-dependent adhesion site; PMA, phorbol myristate acetate; PSI, plexin semaphorin integrin.

* Corresponding author. Tel.: +32 4 366 4075; fax: +32 4 366 4565.

E-mail address: daniel.desmecht@ulg.ac.be (D. Desmecht).

1529-1049/06/\$ — see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.cair.2006.09.002

integrins, the cadherins, the immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules, and the selectins [3,4].

2. β_2 -integrins

The historical perspective of the emergence of integrins has been recently reported [5]: they are transmembrane receptors that play an important role in cellular adhesion even if their recognition as surface receptor family is only dated from 1987 [4,6]. Because they were extensively studied (more than 30,000 articles to date) and appear to be implicated in many biological, physiological, and pathological processes. These cell surface glycoproteins typically function as receptors for extracellular matrix molecules or recognize membrane-bound counter receptors [7]. As heterodimeric receptors, they consist of a 120–180 kDa α subunit and a 90–110 kDa β subunit that are noncovalently associated single-pass transmembrane proteins [2,7,8], both containing a large extracellular domain, a single transmembrane stretch and, with the exception of integrin β_4 , a short cytoplasmic tail [3]. Integrins are expressed by all multicellular organisms but their diversity varies widely among species; for example, in mammals, 19 distinct α subunits can combine with 8 β subunits to form 25 receptors, whereas the *Drosophila* and *Caenorhabditis* genomes encode only 5 and 2 integrin α subunits, respectively [8].

In mammals, the 8 β subunits define 8 subfamilies, each one associating with different α subunits. The β_2 -integrins, that share the common β_2 subunit CD18 [9], include 4 different heterodimers [2,10,11]: the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), also known as CD11a/CD18 or $\alpha_L\beta_2$, that predominates [12,13]; CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$ or Mac-1 or CR3) [14,15]; CD11c/CD18 ($\alpha_X\beta_2$ or P150/95 or CR4) [9,16], and CD11d/CD18 or $\alpha_D\beta_2$ [17,18]. The CD11a chain is expressed on virtually all leukocytes and many leukocyte-derived cells, such as macrophages. T and B lymphocytes normally express only CD11a/CD18 [19], whereas polymorphonuclear neutrophils express CD11b/CD18 at a significant higher level than CD11a/CD18 and CD11c/CD18 [20,21]. The most prominent CD11 chains on activated granulocytes and tissue macrophages are CD11b and CD11c, respectively [19]. Lastly, CD11d/CD18 is abundant on the CD8⁺ lymphocyte subpopulation in peripheral blood and on macrophages present in specialized tissue compartments [17,18].

The CD11a–d/CD18 heterodimers whose expression is restricted to white blood cells mediate high-affinity adhesion to a variety of cell types that display one or more of the β_2 -integrins ligands, intercellular adhesion molecules (intercellular adhesion molecule [ICAM]-1 to -5) [20,22–36]. The adhesion process mediated is a critical step of a wide range of immunological activities, including cytolysis of target cells, cross-interaction and cross-stimulation between lymphocytes, phagocytosis of complement-coated targets, neutrophils clearance from inflamed tissue, and the regulation of leukocyte traffic between the bloodstream and tissues [37–40].

3. LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$)

As stated above, LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha_M\beta_2$) is the predominant β_2 -integrin. The receptor plays a critical role in the complex and well-orchestrated molecular interactions

responsible for homotypic and heterotypic cell adhesion events required for normal and pathologic functions of the immune system. LFA-1 is made of the association of the CD11a and CD18 subunits that each possesses a large extracellular domain but short transmembrane and cytoplasmic regions (Fig. 1). The N-terminal parts of both subunits associate to form the integrin headpiece, which contains the ligand-binding site, whereas the C-terminal segments traverse the plasma membrane and mediate interactions with the cytoskeleton and with signaling proteins [41,42].

3.1. CD11a

The CD11a protein is made of a putative signal peptide of 23–112 residues (depending on the species), a large extracellular domain of 1060–1195 residues, a single hydrophobic transmembrane region of 24 residues and a cytoplasmic tail of 53–62 residues.

3.1.1. I domain

The extracellular domain contains an inserted (I) or A domain of ~200 residues (Fig. 1, Table 1) quite similar to those found in 9 of the 18 α subunits sequenced to date and homologous with repeated domains found in von Willebrand factor and cartilage matrix protein [2,43]. The I domain is located between the β sheets 2 and 3 of a 7 bladed β -propeller region [8,44,45] and is crucial for the ligand-binding specificity of LFA-1 [46]. It folds independently and can thus be expressed as an isolated domain in recombinant form. Its 3-dimensional structure reveals of a classic α/β Rossmann fold, a topology that is found in several intracellular enzymes, in which the core of the module is made up of a 5-stranded parallel β -sheet core surrounded peripherally on both faces by 7 α -helices, with a short antiparallel strand occurring on one edge of this sheet [47]. The residues on top of the I domain whose side chains coordinate the metal ion (a DXSXS-containing sequence) are called the metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) motif and are completely conserved (Asp137, Ser139, Ser141, Thr206, Asp239), but the manner in which the metal is coordinated differs slightly [47–49]. It has been proposed that during ligand binding in vivo, the sixth cation-coordinating residue is provided by an acidic glutamate residue such as Glu34 of ICAM-1 or Glu37 of ICAM-2, implying that cations directly contribute to ligand binding by connecting both partners [45]. The I domain also contains an I-domain allosteric site that plays a functional role in ICAM-1 binding [50–52].

The CD11a I domain has been shown to bind the highly homologous ligands ICAM-1 and ICAM-3 with comparable avidity in a selective manner of activation that is believed to be accompanied by a conformational change in the integrin, most likely involving the I domain [47,53]. More, T-cell binding to ICAM-3 was inducible both from the exterior of the cell by Mn^{2+} and from the interior by phorbol dibutyrate, an agonist of the “inside-out” signaling pathway [53]. The ability of manganese ion to induce the active state and the requirement for ligand binding indicate that the Mn^{2+} -bound form of the CD11a I domain is likely to represent a high-affinity state of the molecule, which is consistent with the presence in the I domain structure of a strained hydrophobic ridge with main-chain contacts to the loop primarily responsible for coordinating the metal ion [47]. By contrast, the conformation of the CD11a I domain that was solved in the absence of cation or with bound magnesium is not

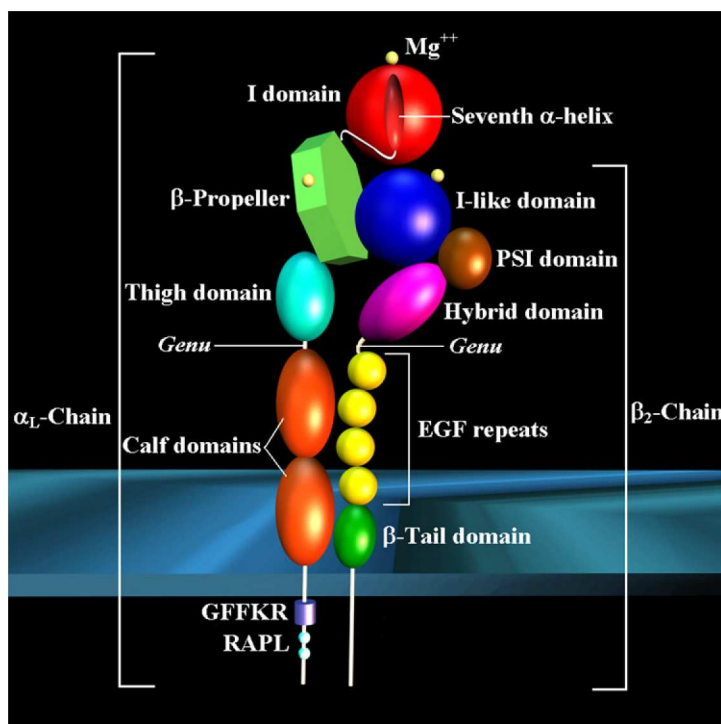


Fig. 1. Schematic representation of structural domains of LFA-1. The CD11a and CD18 subunits each possesses a large extracellular domain and short transmembrane and cytoplasmic parts. In the CD11a subunit, the ligand-binding I domain (red) binds ICAMs in a manner that depends on the presence of a magnesium ion (light yellow) in the MIDAS. The seventh α -helix of the I domain links to the β -propeller region (green), that continue by the thigh domain (turquoise) and the calf domains (orange), which extend toward the plasma membrane. In the CD18 subunit, the PSI domain is colored chocolate and is disulphide bonded to the hybrid domain (mallow) in the center of the subunit that links the I-like domain to 4 EGF-like repeats (yellow). The fourth module extends by the β -tail (green) and then toward the membrane. The hinge motif (GFFKR) and the site that mediates the formation of complexes with regulator of cell adhesion and polarization enriched in lymphoid tissues (KK) are indicated, respectively, by a light mallow cylinder and light blue spheres. Bivalent cation-binding sites are shown as small yellow spheres. The picture was made with Ulead Cool 3D 3.5 and it should be noted that the various domains are not exactly drawn to scale.

altered by changes in metal ion binding, suggesting that the cation-dependence of ligand binding is due to the fact that the metal ion is either involved in direct interaction with ligand or required to promote a favorable quaternary arrangement of the integrin [54]. Furthermore, a crystal form of the CD11b I domain with bound manganese was also reported [48] and comparison with the crystal form of the CD11b I domain with bound magnesium [49] reveals a change in metal coordination, which is linked to a large (10 Å) shift of the C-terminal helix and the burial of 2 phenylalanine residues into the hydrophobic core of the Mn^{2+} form. These structural changes, analogous to those seen in the signal-transducing G-proteins, alter the electrophilicity of the metal, reducing its ability to bind ligand-associated acidic residues, and dramatically alter the surface of the protein implicated in binding ligand. So the authors propose that the Mg^{2+} form represents the conformation of the domain in the

Table 1
The important regions of CD11a and their functional role(s)

Extracellular region	
I domain	Ligand-binding specificity of LFA-1
MIDAS motif	Coordinate the metal ion that could contribute to ligand binding by connecting both partners
I-domain allosteric site motif	Functional role in ICAM-1 binding
β-propeller	Implicated in both cation and ligand binding
Transmembrane region	
Cytoplasmic part	
Conserved GFFKR motif	Lock LFA-1 in a low avidity state (role in ligand-binding affinity and heterodimerization) Role in deadhesion from ICAM-1
Lys 1097/1099	Critical for Rap1-dependent LFA-1 activation and affinity up-regulation

active state and the Mn^{2+} form the conformation in the inactive state of the integrin [48]. To answer these apparently contradictory data, Baldwin et al. [55] set out to independently determine the structure of the CD11b I domain and to evaluate the structural effects of divalent ion binding to this protein in the absence of added metal ions that were easily introduced into this crystal form allowing the straightforward assessment of the structural effects of divalent cation binding at the MIDAS. The overall protein conformation and metal-ion coordination of the I domain were the same as that observed for all previously reported CD11a I-domain structures and a CD11b I-domain complex with Mn^{2+} but addition of the cations Mg^{2+} , Mn^{2+} , and Cd^{2+} to the metal-free I domain did not induce conformational changes in the crystalline environment. Moreover, Ca^{2+} bound poorly to the I domain, which serves to explain its failure to support adhesion, and the authors proposed that the active conformation previously reported [48,49] is likely to be a construct artifact because their data do not support a dramatic structural transition for the I domain during counter-receptor binding [55].

Besides, the presence of an invariant isoleucine residue at position 331 in the I domain of CD11a and CD11b has been reported to play an important role in LFA-1 and Mac-1 activation, respectively [50]. The hydrophobic side chain finger of this isoleucine was described as fastened in the closed conformation by a conserved hydrophobic socket [56]. This “socket for isoleucine,” was postulated to be a key component in allosteric regulation, controlling affinity and shape shifting in the Mac-1 I domain. By inference, the socket for isoleucine was suggested as the universal mechanism that regulates integrin conformation and function because similar findings were reported for the I domain of CD11c [43,57]. However, mutation of the isoleucine in full-length CD11a does not lead to an active LFA-1, although mutation of the equivalent residue in CD11b conveys constitutive activity to Mac-1. Ile331 does thus not appear as a critical residue contributing to allosteric regulation of LFA-1 but, of interest, recent reports state that the I domain exists in an inactive, closed conformation and requires the presence of activating agents for ligand binding, whereas the isolated wild-type I domain exists in a constitutive active state [43]. This could be explained by the fact that the

CD18 could play a role in constraining the CD11a I domain in an inactive conformation in intact LFA-1, but more structural data are required to shed light on the mechanism if integrin activation involves the I domain [43].

3.1.2. β -propeller

Following the I domain, the β -propeller (a topology also found in several enzymes) domain consists of seven 4-stranded β -sheets, each of which made of approximately 60 amino acids, arranged in a torus around a pseudo-symmetry axis, like the blades of a propeller, as seen in heterodimeric G proteins (Fig. 1, Table 1). The I domain is tethered to the top of the β -propeller domain by a hinge that may allow movement of the domains relative to one another [58]. The β -propeller 7 repeats are located on the lower face of the β -propeller [58] and are quite similar in sequence, with the exception that the final 3 contain inserted sequences that are analogous to the EF-hand, a 13-residue bivalent cation-binding motif found in proteins such as calmodulin and parvalbumin. The integrin sequences differ from classical EF-hands in that they lack a coordinating residue at position 12 [8,59]. This region is implicated in both cation and ligand binding [8], and one hypothesis to explain integrin-ligand binding is that aspartate-containing recognition sequences in integrin ligands, which bind at or near to the EF-hand-like sequences, may take the place of the missing residue and coordinate directly to the bound cation [59].

Three repeats with a divalent cation-binding motif (Fig. 1) are found at amino acid residues 468–476, 530–538, and 590–598 (human numbering).

3.1.3. Intracellular region

The short cytoplasmic tail (Fig. 1, Table 1) has been shown to contain a conserved GFFKR motif that plays an important role in ligand-binding affinity and heterodimerization (Section 3.4). Indeed, J- β 2.7 and K562 transfectants expressing the truncation mutants (1) before the conserved GFFKR motif (which appears to lock LFA-1 in a high avidity state, resulting in constitutive ICAM-1 binding) and (2) after the GFFKR motif (which appears to lock LFA-1 in a low avidity state, resulting in defective ICAM-1 binding and reduced stimulation by phorbol myristate acetate [PMA] or stimulatory Abs), failed to induce transendothelial chemotaxis [60,61]. Taken together, these data suggest that transendothelial chemotaxis may require changes in LFA-1 avidity, rather than a sustained increase in avidity or low avidity that is unresponsive to stimulation by cellular signaling pathways [61]. Contradictory results, showing that deletion of the 12 cytoplasmic amino acids after the conserved GFFKR motif in COS cells did not affect ICAM-1 binding [62], seem to be an artifact due to the choice of COS cells, a cell type in which the integrin is not normally expressed, that is, in a physiologic transmembrane and cytoplasmic environment [60]. On the other hand, the disruption of this well conserved GFFKR motif (by internal deletion or point mutations of the Gly, the 2 Phe, or the Arg residues to Ala) increases ligand-binding affinity and makes CD11a constitutively active, whereas mutation of the Lys residue did not affect LFA-1 adhesion to ICAM-1, suggesting that this motif maintains a default, low-affinity state of the integrin, possibly by restraining the receptor conformation [60,63].

Very recently, impaired deadhesion from ICAM-1 that resulted in defective migration was observed for a GFFKR-deleted LFA-1, whereas signaling through the receptor was not

affected [64]. On the contrary, T-cell activation by superantigen-loaded and allogeneic antigen-presenting cells, cytotoxic T-cell activity, T-dependent humoral responses, and neutrophil recruitment during aseptic peritonitis were impaired in GFFKR-deleted mice, enlightening the role of the GFFKR motif in deactivation of LFA-1 and hence in the generation of normal immune response [64].

Lastly, Lys1097 and Lys 1099 are critical for Rap1-dependent LFA-1 activation and affinity up-regulation [65].

3.1.4. General comparison among species

Overall, the general organization of human [66], ovine [67], bovine [68], caprine [69], porcine [69], murine [70], canine (GenBank NW_876320), and rat (GenBank NW_047562) CD11a proteins is quite similar. Comparison between human CD11a sequence and its bovine, ovine, caprine, porcine, murine, canine, and rat counterparts shows overall 77%, 77%, 77%, 76%, 71%, 78%, and 58% identity, respectively, with the highest identity for the MIDAS, the transmembrane region and the cation-binding motifs and the lowest identity for the cytoplasmic domain (Table 2). The high conservation of the MIDAS and the putative cation-binding motifs is consistent with an involvement of these regions in the functional activity of the CD11a subunit, as suggested by the requirement of Mg^{2+} and Ca^{2+} for LFA-1–dependent cellular interactions [71] or binding to purified ICAM-1 [72,73]. The transmembrane region shows also a high degree of conservation that could be explained by (1) physicochemical and (2) functional constraints. Indeed, (1) residues lying in the membrane have to possess rather hydrophobic character to allow liposolubility, which is confirmed by the presence of many leucine residues and (2) bidirectional integrin signaling (inside-out and outside-in) is accomplished by transmission of information across the plasma membrane [74]. By contrast, the low conservation of the cytoplasmic tail suggests that most of it is not required to guarantee adequate functioning of LFA-1. This is in agreement with the observation that truncation of the CD11a subunit cytoplasmic domain has no effect on binding to ICAM-1, whereas binding is markedly diminished by the CD18 subunit cytoplasmic domain truncation [62]. Residue Glu 332 that is located in the linker following the I domain and that is known to be critical for communication to the β_2 I-like domain, rolling, integrin extension and activation by Mn^{2+} of firm adhesion [39] is strictly conserved.

The mature protein contains 21 cysteine residues that are strictly conserved in the other species (except that caprine and rat CD11a each lack, respectively, 2 and 1 of these residues that therefore do not seem to be indispensable), which is consistent with a role in maintaining the global structure of the protein. The bovine, murine, canine, and rat versions distinguish, respectively, by additional cysteine residues in the cytoplasmic domain at position 1145 (bovine numbering), in the I domain at position 199 (mouse numbering), in the I domain and the extracellular part (at positions 200 and 361, canine numbering), and at positions 287 (I domain), 877, 908, and 1250 (extracellular region, rat numbering).

Interestingly, in human (GenBank NM_002209 and AY892236), ovine [67], caprine [69], and porcine [69] CD11a, an allelic variant with a triplet insertion, resulting in an additional Glu744 in the extracellular domain was consistently identified, which suggests an allelic

Table 2
Between-species percent identities of CD11a constitutive blocks

Block	Hum vs.						
	Bov	Ovi	Cap	Por	Mur	Can	Rat
Overall	77	77	77	76	71	78	58
Putative signal peptide	56	52	56	56	32	40	3
Extracellular region/overall	78	78	78	78	73	80	63
Extracellular region/I domain	84	86	86	79	73	86	76
Extracellular region/MIDAS domain	100	100	100	85	85	100	85
Extracellular region/putative cation-binding motif 1	88	88	88	77	77	88	66
Extracellular region/putative cation-binding motif 2	77	77	77	77	77	100	88
Extracellular region/putative cation-binding motif 3	88	88	88	88	66	77	77
Transmembrane region	91	95	95	91	75	75	83
Cytoplasmic tail	56	56	58	51	59	60	59

Abbreviations: Hum, human; Bov, bovine; Ovi, ovine; Cap, caprine; Por, porcine; Mur, murine; Can, canine; Rat, rat CD11a.

polymorphism that might be biologically relevant. Studies of genomic sequences will permit to know if this addition represents 2 alleles or an alternative splicing.

Finally, one has to note that the lowest between-species identities are observed with the rat CD11a sequence, which has been derived from an annotated genomic sequence. Cloning and characterization of rat CD11a from rat peripheral blood mononuclear cells would probably give a higher identity.

3.2. CD18

The CD18 molecule also contains a putative signal peptide of 13–23 residues, a large extracellular domain of 676–685 residues, a single hydrophobic transmembrane region of 23 residues, and a short cytoplasmic tail of 46–48 residues (Fig. 1, Table 3).

3.2.1. Extracellular region

Starting from the N-terminal end, the extracellular region successively encloses a cysteine-rich repeats containing analog of the so-called plexin semaphorin integrin (PSI) domain (residues 23–74 in human) [75], an inserted I-like domain [76] of 240–248 amino acids (residues 124–363 in human) and a series of 4 cysteine-rich repeats that display a significant degree of similarity with the epidermal growth factor (EGF)-like domains in laminin [8,77–79] (449–496, 497–540, 541–581, and 582–617 in human).

In the absence of a tertiary structure, structure predictions performed for the PSI and the β I domain reveal, respectively, an α -helical character [75] and a similarity, but not an identity, with the α I domain [76,80]. A putative MIDAS-like DXSXS motif [81] is predicted within the I-like domain (residues 134–138 in human).

The cysteine-rich repeats vary from classical EGF repeats by the presence of 8 (7 in the first repeat), rather than 6, cysteine residues. The positions of these 2 additional residues

Table 3
The important regions of CD18 and their functional role(s)

Extracellular region	
PSI domain	
I-like domain	MIDAS-like motif
Four cysteine-rich repeats	Are supposed to maintain an intramolecular constraint whose release is needed for LFA-1 activation
Transmembrane region	
Cytoplasmic part	
Tyrosine-based sequences	Role in internalization
K ₇₂₄ ALXHLZD	Efficient formation and expression of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 heterodimers on the cell surface, as well as their maintenance in the inactive state (X = I in human and T in other species, and Z = T in murine and S in other species)
Arg733–Lys742 (noncompletely conserved region)	Cytoskeletal association, endoplasmic reticulum retention, assembly, transport to the plasma membrane of the mature LFA-1
Arg736–Gln746	α -Actinin binding region
Asn748–Ser 769	Prevents association with α -actinin
Y735RRF motif	Sorting signal for LFA-1 recycling
F754	Role in adhesion to ICAM-1
S756	Major residue phosphorylated in response to PMA
T758TT	Control, in part, binding to ICAM-1 and stimulation with PMA
F766	Key residue for binding to ICAM-1

within the integrin repeats differ from the laminin EGF-like modules, suggesting that each may have a distinct structure [82]. The EGF-like repeats are not required for either dimerization or subunit selection as construction of a chimera of CD18 containing the EGF-like repeats of the β_1 subunit led to association with CD11a [83]. Moreover, unlike cells displaying wild-type LFA-1 (CD11a/CD18), those expressing the chimera are constitutively active in ICAM-1 adhesion, suggesting that activation of LFA-1 involves the release of an intramolecular constraint, which is maintained, in part, by the cysteine-rich region [83].

Furthermore, a structure and function map of the CD18 has been established by mapping the epitopes of a panel of monoclonal antibodies including function blocking, nonblocking, and activating antibodies using human/mouse β_2 subunit chimeras [76]. Activating antibodies recognize the C-terminal half of the cysteine-rich region, those that do not affect ligand binding map to residues 1–98 and residues 344–521, and monoclonal antibodies to epitopes within the predicted I-like domain strongly inhibit LFA-1–dependent adhesion, which is consistent with the observation that most mutations in leukocyte adhesion deficiency are predicted to be buried in the CD18 I-like domain [84–87].

3.2.2. Cytoplasmic domain

Many lines of evidence indicate that the CD18 cytoplasmic region (Fig. 1, Table 3) plays an important role in modulating cell adhesion because it was found to be required in trans-endothelial chemotaxis and in constitutive binding of COS transfectants to ICAM-1 and stimulation with PMA [61,62,88]. Moreover, deletion of the CD18, but not the CD11a,

cytoplasmic tail has been shown to abolish colocalization of LFA-1 (CD11a/CD18) with actin and its coprecipitation with vinculin and α -actinin in COS cells, indicating its role in cytoskeletal associations of LFA-1 [89]. In this way, a noncompletely conserved region (Arg733–Lys742) in the CD18 cytoplasmic domain seems to be critical not only for its cytoskeletal association, but also for endoplasmic reticulum retention, assembly, and transport to the plasma membrane of the mature LFA-1 [89]. Distinct domains that regulate binding to α -actinin have been identified: an α -actinin binding region between residues 736 and 746 in the membrane proximal half of the tail and an inhibitory region between residues 748 and 769 that prevents association of α -actinin to the membrane-proximal binding region [90].

A sorting signal can be found in the membrane-proximal Y735RRF motif, which appears to be selectively required for the recycling of spontaneously internalized receptors to the cell surface and to growth factor-induced membrane ruffles. Notably, the disruption of this motif by the nonconservative substitution Y735A diverts internalized integrins from a recycling compartment into a degradative pathway, without impairing the ability of the mutated receptor to recruit cytoskeletal proteins and to affect cell adhesion and spreading onto immobilized ligand [91].

The F754 in the membrane-proximal NPLF sequence is a key residue for binding to ICAM-1 as the F754A mutation inhibits adhesion to ICAM-1 in CHO cells and spreading without affecting receptor recycling [91]. The conserved T758TT motif and residue F766 are also important for binding to ICAM-1 [61,88,92]. As these sites are well conserved in the β_1 , β_3 , and β_7 integrin subunits, they may be of broad importance in regulating adhesiveness of integrins [88].

On the other hand, CD18 is phosphorylated in response to PMA, whereas the corresponding α subunits (CD11 a–c) are constitutively phosphorylated, suggesting that phosphorylation of the CD18 subunit is responsible for the increased avidity of integrins on stimulated cells [93–95]. Mutation of all the potential phosphorylation sites in the cytoplasmic domain of the CD18 together with the phosphoamino acid analysis of the CD18 from wild-type PMA-stimulated cells has allowed the identification of S756 as the major residue phosphorylated in response to PMA [88]. Although the most obvious protein kinase responsible for PMA-induced phosphorylation is protein kinase C, the sequence surrounding S756 would not be predicted to be a good potential protein kinase C phosphorylation site [96] and it may be phosphorylated only under the influence of the potent activator PMA, or by a second protein kinase that is itself activated by protein kinase C [88]. However, residues that influence phosphorylation of S756, presumably by forming part of the kinase recognition site or contributing to its formation, have been identified. So, residues NH2 terminal to K755, as well as T758 but not T760 contribute to PMA-stimulated phosphorylation of S756 [88]. Furthermore, multiple mutations demonstrate that serine 756 phosphorylation can be dissociated from phorbol ester-stimulated binding of LFA-1 to ICAM-1 because a dramatic increase in ICAM-1 binding in response to PMA could be observed with these mutants [88].

3.2.3. General comparison among species

The general organization of CD18 proteins is quite similar. Sequence comparisons between human CD18 [97,98] and its bovine [99], water buffalo (GenPept AAW29104), ovine

[100], caprine [101], porcine [102], murine [103], canine [104], rat (GenBank XM_228072), chicken [105], common carp (GenBank AB031070), and channel catfish [106] counterparts show overall 83%, 83%, 83%, 83%, 83%, 81%, 80%, 77%, 63%, 49%, and 48% identity, respectively, with the highest identity for the MIDAS-like motif (100%), the cytoplasmic tail, and the I-like domain and the lowest identity for the signal peptide, the PSI domain, and the EGF domains 3 and 4 (Table 4). The very high interspecies conservation of the putative MIDAS-like and I-like domains and the cytoplasmic tail is consistent with an involvement of these regions in the functional activities of β_2 -integrins. Overall, the high evolutionary conservation of the I-like domain confirms its importance in β_2 -integrins functions, which is compatible with the observation that monoclonal antibodies the epitopes of which were mapped within this region inhibit binding of LFA-1 to ICAMs 1–3 [76]. The maximum conservation being observed for the CD18 MIDAS-like motif is consistent with its importance in ligand recognition [107,108]. The high degree of conservation in the cytoplasmic tail of CD18, with many Ser, Thr, and Tyr residues, is compatible with the important role that phosphorylation of these residues plays in regulating adhesive activity [93] and with the observation that cytoplasmic domain truncation of CD18 markedly diminishes binding of LFA-1 to ICAM-1 [62]. The mature protein contains 56 (58 for the rat) conserved cysteine residues in the extracellular region, which is consistent with a role in maintaining the global structure of the protein. Two additional cysteine residues are present in rat CD18 I domain. Four to 6 N-linked putative glycosylation sites (Asn-X-Thr/Ser) are observed all located within the extracellular region, except carp and catfish that possess one in the cytoplasmic portion.

3.3. Folding

Using conformation-dependent monoclonal antibodies as probes, the folding of particular regions of CD11a [44] and CD18 [109] has been approached and shown to be mutually dependent on the partner subunit. The I domain of CD11a folds before association with the CD18 subunit (as shown by immunoprecipitation of the unassociated CD11a) but by contrast the β -propeller domain requires CD18 for folding because it is not folded in unassociated CD11a after a chase as long as 12 h after synthesis. This suggest that the I domain and the β -propeller domains fold independently of one another and that the latter bears an interface for association with CD18 [44]. Similar results were observed with CD11b [110]. Furthermore, I domain-deleted LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) expressed on the surface of transfected cells bind to all the monoclonal antibodies mapped to the putative β -propeller and C-terminal regions of CD11a and CD11b, suggesting that the folding of these domains is independent of the I domain [111]. In contrast, I-less LFA-1 did not bind its ligands ICAM-1 and -3, whereas I-less Mac-1 is still able to bind iC3b and factor X, in a reduced way compared with wild-type Mac-1, but not fibrinogen. Thus, the I domain is not essential for the folding, heterodimer formation, and surface expression of LFA-1 and Mac-1 but is required for binding to some ligands, but not others [111].

On the other way, folding of the conserved β I domain but not of flanking regions in the CD18 subunit requires association with CD11a, suggesting that this domain is a distinct folding and hence structural unit, and is intimately associated with the α subunit [109].

Table 4
Between-species percent identities of CD18 constitutive blocks

Block	Hum vs.										
	Bov	Buf	Ovi	Cap	Por	Mur	Can	Rat	Chic	Car	Caf
Overall	83	83	83	83	83	81	80	77	63	49	48
Putative signal peptide	63	63	68	63	59	60	30	13	16	29	25
Extracellular region/overall	83	82	82	82	83	81	81	78	64	49	48
Extracellular region/PSI domain	76	76	78	78	75	80	78	76	61	48	55
Extracellular region/I-like domain	94	94	94	93	95	94	94	86	78	64	63
I-like domain/MIDAS-like motif	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Extracellular region/EGF domain 1	81	79	79	81	75	81	77	83	54	37	26
Extracellular region/EGF domain 2	81	81	81	81	81	79	72	77	79	50	52
Extracellular region/EGF domain 3	70	70	70	70	70	73	65	70	58	46	48
Extracellular region/EGF domain 4	77	77	75	75	72	63	66	75	61	44	38
Transmembrane region	86	86	82	86	82	82	82	82	65	60	60
Cytoplasmic tail	95	95	95	95	91	95	89	93	64	52	52

Abbreviations: Hum, human; Bov, bovine; Buf, buffalo; Ovi, ovine; Cap, caprine; Por, porcine; Mur, murine; Can, canine; Rat, rat; Chi, chicken; Car, carp; Caf, catfish CD18.

Furthermore, an activating monoclonal antibody to the C-terminal cysteine-rich region of CD18 preferentially bound to the unassociated β_2 subunit, suggesting that it may bind to an epitope that is in a $\alpha\beta$ interface in unactivated LFA-1 [109].

3.4. Heterodimerization

The extracellular and the cytoplasmic parts of LFA-1 have been both described as key area of dimerization because the α and β subunits each possess retention elements, in the extracellular and the cytoplasmic domains, that keep them intracellularly, until their association allow the CD18-dependent transport to the cell surface [87,89]. Consistent with this interpretation, a LFA-1 mutant lacking the entire cytoplasmic domain of CD11a ($\alpha_L^{\Delta 1088}\beta_2$) is retained partially as an immature dimer in a pre-Golgi compartment, whereas the $\alpha_L^{\Delta 1088}\beta_2^{\Delta 733}$ cotransfectant displays expression levels comparable with the wild-type heterodimer. Furthermore, when the central RN region of CD18, spanning residues D300 to C459, was replaced by the equivalent sequences from β_1 to β_7 to give the chimeras β_2 RN1 and β_2 RN7, the former construct failed to form heterodimer at the cell surface with CD11a, whereas the latter of these could be expressed together with the CD11a subunit to form a variant LFA-1. The RN region consists of 2 parts, one is the C-terminal end of the putative I domain (RB, residues D300 to A359), and the other the mid-region (BN, residues Y360 to C459). Chimeras exchanging the 2 component regions were made and of the 4 resultant constructs, only the β_2 RB1 chimera failed to support LFA-1 expression. Thus, the β_1 specific residues of this region affect the interaction with the CD11a. Whereas the $\alpha_L\beta_2$ RB7 LFA-1 variant is wild-type like with respect to ICAM-1 adhesion, the $\alpha_L\beta_2$ BN1, and $\alpha_L\beta_2$ BN7, as well as the $\alpha_L\beta_2$ RN7, variants are more adhesive than the wild type, suggesting that the β_2 mid-region is, in part, required for maintaining the LFA-1 in a resting state [112].

Moreover, a membrane-proximal region of 8 residues (K₇₂₄ALXHLZD, with X = I in human and T in other species, and Z = T in murine and S in other species) in the CD18 cytoplasmic domain is required for efficient formation and expression of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 heterodimers on the cell surface and for maintenance of these integrins in the inactive state [113]. Similarly, the conserved GFFKR motif, located in the membrane-proximal region of CD11a cytoplasmic domain, is required for efficient formation of LFA-1 $\alpha\beta$ heterodimers, to ensure stable association of α and β subunits, and probably contributes topologic information for the correct membrane insertion of CD11a [60,62,63,89,114]. As a matter of fact, the CD11a cytoplasmic domain maintains a default low-affinity state in the adhesion receptor, possibly by interacting with CD18 via the GFFKR-containing region [89]. Indeed, complete truncation of the CD11a cytoplasmic domain or internal deletion of this sequence constitutively activates LFA-1 [60,62]. Thus, extracellular and cytoplasmic domain segments of both α and β subunits regulate not only the heterodimer formation and surface expression but control, in part, ligand-binding activity.

4. LFA-1 modulation

As circulating leukocytes are continually exposed to ICAMs on the vasculature, the ligand-binding activity of LFA-1 (CD11a/CD18) has to be kept under tight control to avoid inappropriate adhesion while these cells are flowing in blood or migrating through tissues and thus needs to be highly regulated [115]. The overall strength of cellular adhesiveness (i.e., avidity) is governed by the intrinsic affinity of the individual receptor-ligand bonds, and the number of these bonds (valency). Valency depends on the density of receptor and ligand on the interacting surfaces, the geometric arrangement of those surfaces, and the ability of the receptor and ligand to move, either passively by diffusion or actively, from other parts of the cell into the zone of cell adhesion. The dynamic regulation of integrin-mediated adhesiveness is thought to involve modulation of all of these parameters [116]. So, integrins are dynamic molecules that react to ligand(s) binding but that are also modulated through conformational changes initiated from the cytoplasmic domain to the extracellular ligand-binding sites [38], by internalization [91,117] and cytoskeletal restraint [65,90], leading to the fact that not only can a cell modulate the type and number of integrins expressed on its surface, but also the activation state of the receptors can be altered, allowing flexibility in the specificity and strength of adhesive contact. More, cells often express multiple integrins with sometimes overlapping and/or redundant adhesive properties [3].

4.1. Structural basis of regulation

The CD11a and CD18 subunits form a globular, ligand-binding headpiece connected to the plasma membrane by 2 “stalks” (1 formed by each subunit) that continue by a short cytoplasmic domain, which mediate interactions with the cytoskeleton and with signaling proteins (Fig. 1). Structural analyses has led to a general model in which conformational changes affecting integrin affinity occur after ligand binding or when triggered by

inside-out signaling [116,118,119]. Three affinity states are described: the low, the intermediate, and the high-affinity forms (Fig. 2). In the low-affinity conformation, the stalk region is acutely bent at the *genu* (knee), with the ligand-binding headpiece in close proximity to the membrane-proximal stalk region as LFA-1 extends only 5 nm over the surface [120]. In this bent conformation, extensive interfaces totaling over 4000 Å² of solvent accessible surface are buried between the headpiece and tailpiece and between the α and β tailpieces. These interfaces stabilize the bent conformation, and are important in regulating the equilibrium between the bent and extended integrin conformations [121–123]. Indeed, a switch-blade-like extension of the stalk regions shifts the molecule to higher-affinity conformation, extending 25 nm over the cell surface and thus becoming accessible to ligand immobilized on a counter surface [120] (Fig. 2). Therefore, it is proposed that global changes occurring in the extracellular domain through extension of the *genu*, and the presence of the closed headpiece, generate a conformation of intermediate affinity and that separation of the stalks (which is translated through the I-like domain of CD18 into a downward movement of the seventh α -helix of the I domain that alters the affinity of the magnesium-containing ligand-binding site) leads to the high-affinity conformation [50,116,119,124–126]. Downward displacements by 1 or 2 turns of α 7-helix lead to intermediate- and high-affinity conformations with ~500- and ~10,000-fold increased affinity, respectively [126]. Moreover, forced separation of the transmembrane and cytoplasmic regions of CD11a and CD18 (that are close to each other in the bent, inactive conformation), occurring following either inside-out signaling or ligand binding [74], can trigger extension and conformational changes in the ligand-binding domain, generating the extended and hence high-affinity conformation [127,128]. It is also clearly established that the membrane-proximal GFFKR motif of the cytoplasmic region of CD11a, which constitutes its hinge domain, functions as a negative-regulatory sequence by suppressing integrin activation [129] as its deletion converts inactive into constitutively active LFA-1. In fact, the arginine residue of this motif forms a salt bridge with an aspartic-acid residue at the corresponding position in CD18, which places both cytoplasmic regions in juxtaposition [119]. Moreover, replacement of the cytoplasmic tails of CD11a and CD18 with complementary α -helices that formed a heterodimeric α -helical coiled-coil kept the receptor in a low-affinity state. By contrast, replacement with non-complementary α -helices resulted in constitutive activation of LFA-1 [113,130].

4.2. Outside-in signaling

The outside-in signaling can be defined as the ligand-induced propagation of intracellular signals, which result from changes in integrin conformation (Fig. 2) or cell surface distribution (Fig. 3) or both [116,131]. The outside-in signal can be triggered via binding of LFA-1 (CD11a/CD18) to outside stimuli (i.e., ICAM-1) that produce a signaling cascade including activation of the tyrosine kinase ζ -associated protein-70 (Zap-70), which initiates the activation of other LFA-1 molecules to form clusters (Fig. 3) [132]. These clusters of LFA-1 with high avidity to multivalent ICAM-1 result in signaling that leads to F-actin polymerization and higher order F-actin bundling [133,134]. In fact, LFA-1 receptor clustering does not precede ligand binding, and instead functions in adhesion strengthening after binding to multivalent ligands. Indeed, (1) stimuli that activate adhesion through LFA-1 fail to alter

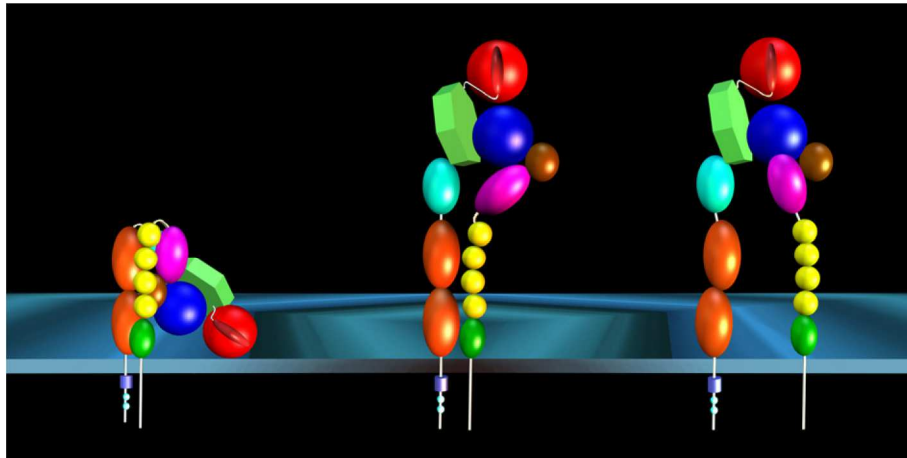


Fig. 2. Schematic representation of affinity regulation of LFA-1. Structural analyses has led to a general model in which conformational changes affecting integrin affinity occur after ligand binding or when triggered by inside-out signaling. In the low-affinity conformation (on the left), the stalk region is acutely bent at the *genu*, with the ligand-binding headpiece in close proximity to the membrane-proximal stalk region. A switch-blade—like extension of the stalk regions shifts the molecule to intermediate-affinity conformation, rendering the headpiece accessible to ligands. Separation of the stalk, transmembrane, and hinge regions are translated through the I-like domain into a downward movement of the seventh α -helix of the I domain, which induces a change in the conformation of the MIDAS that results in the high-affinity conformation of LFA-1. The intermediate- and high-affinity forms display ~500- and ~10,000-fold increase in affinity, when compared with the low-affinity state. The picture was made with Ulead Cool 3D 3.5 and it should be noted that the various domains are not exactly drawn to scale.

clustering of LFA-1 in absence of ligand and (2) binding of monomeric soluble ICAM-1 induce profound changes in LFA-1 conformation but do not alter clustering, whereas binding of ICAM-1 oligomers induces significant microclustering (Fig. 3) [135]. Clustered LFA-1 is also involved in “cross talk” with growth factor receptors through activation of mitogen-activated protein kinase signaling [136].

4.3. Inside-out signaling

The inside-out signaling regroups either affinity- or valency-based regulatory events that precede, or occur independently of, ligand binding, and serve to enhance the propensity to bind ligand efficiently [116,131]. The inside-out signal can be produced via activation of other cell surface molecules such as T-cell receptor and CD2, which generate intracellular second messengers that ultimately modulate integrin adhesiveness through affinity modulation (in which ligand-binding affinity is altered) and avidity modulation (in which integrin cell surface diffusion and clustering are modified) [72,116,137–139]. This rapid up-regulation of integrin adhesiveness enables circulating leukocytes to interact avidly with the endothelium and antigen-presenting cells [140,141]. Separation of the integrin α and β subunit transmembrane and cytoplasmic domains has emerged as the critical trigger for initiation of inside-out conformational signaling (Fig. 2) [116]. As it is key to integrin function, there

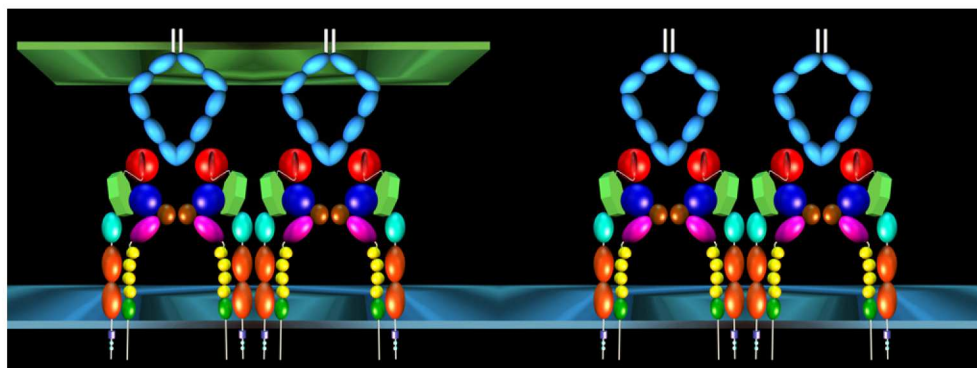


Fig. 3. Schematic representation of substrate-induced valency regulation of LFA-1. Clustering of integrins on the cell surface is induced by binding of membrane-bound (on the left) or soluble (on the right) multimeric ICAM-1 complexes. The picture was made with Ulead Cool 3D 3.5 and it should be noted that the various domains are not exactly drawn to scale.

has been an intense effort to elucidate its molecular mechanism, leading to identification of cytoplasmic partners and characterization of signal transduction pathways [142–149].

4.4. Internalization

The spontaneous internalization of ectopically expressed LFA-1 in CHO cells is a very rapid process, considering that >30% of surface-expressed receptors are internalized in 30–40 min, with a half-time of internalization of 10–15 min. However, the rate of internalization of endogenously expressed integrins may differ widely depending on the cell type and individual members of the family as broad variations in the efficiency of internalization of LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) have been observed, which suggest that α subunits may play a fundamental role in the endocytic cycle of these receptors [117]. LFA-1 in particular was shown to have a relatively slow turnover in lymphoid cell lines compared with the other members of the leukocyte integrin family. Conceivably, integrin dynamics at the cell surface may be subjected to variations depending on the activation state of the cell and the phenotype, that is, nonadherent, statically adherent, or locomoting, of the cell being studied [91].

4.5. Cytoskeletal association

The active form of LFA-1 regulates its own function on primary human T-cells by directing the remodeling of the F-actin cytoskeleton to strengthen T-cell adhesion to ICAM-1 as confocal microscopy revealed that both F-actin bundling and overall levels of F-actin are increased in the ICAM-1–adhering T-cells [134].

The complete deletion and truncations or point mutations of the CD18 cytoplasmic region (mutants $\Delta 731$, $\Delta 744$, Y735A, F754A, and T758TT/AAA) has also a tendency to increase basal levels of adhesion, whereas any increase in ligand-binding affinity was detected [65,150]. This increase in basal adhesion may in fact reflect a release of cytoskeletal linkage

on LFA-1 [65,89,90] because it is known that the CD18 cytoplasmic region can associate with talin, filamin, vinculin, and α -actinin [90,151]. Indeed, in unactivated nonadherent leukocytes, the β_2 integrins mobility is constrained by the actin cytoskeleton via the protein talin. Activation of cells induces proteolysis of talin and dissociation from the CD18 tail in a transient phase that results in free mobility of the integrins in the membrane, followed by rapid reattachment to actin filaments as a result of α -actinin binding to a previously cryptic binding site in the membrane proximal half of the cytoplasmic domain [90]. The association of α -actinin with clustered integrins [152] may stabilize the cytoskeleton and promote firm adhesion to and migration across the endothelium. Distinct domains that regulate binding to α -actinin have been identified: a region between residues 736 and 746 in the membrane proximal half of the tail is necessary and sufficient for α -actinin binding, a distinct region in the membrane distal end of the tail has a unique role in regulating α -actinin binding and an inhibitory region resides between residues 748 and 769 and prevents association of α -actinin to the membrane-proximal binding region [90]. Moreover, the ability of point mutations at any of several residues in this inhibitory domain (residues N748, N749, D750, P752, T758, T759, T760, M762, and Ala767) to apparently unmask the previously cryptic α -actinin binding site in the CD18 tail suggest that the conformation of the tail is important in regulating α -actinin binding [90]. In addition, the Arg733–Lys742 residues seem to be critical not only for the cytoskeletal association, but also for endoplasmic reticulum retention, assembly, and transport to the plasma membrane of the mature LFA-1 [89].

5. Conclusion

LFA-1 plays a central role in cell adhesion and migration. In this context, the receptor needs to be tightly regulated, which occurs through conformational changes and controlled association with the cytoskeleton and various proteins. Exploring this stimulant research field consequently open new avenues to deal with the numerous disorders associated to LFA-1.

6. Summary

Cell adhesion receptors are known to play an essential role in multicellular organisms by mediating the direct association of cells with each other and with proteins of the extracellular matrix. Among these receptors is LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$) that actively contributes to the complex and well-orchestrated molecular interactions responsible for normal and pathologic functions of the immune system.

LFA-1 is made of the association of the CD11a and CD18 subunits, whose general organization is well conserved among species, that each possesses a large extracellular domain but short transmembrane and cytoplasmic regions. The N-terminal parts of both subunits associate to form the integrin headpiece, which contains the ligand-binding site, whereas the C-terminal segments traverse the plasma membrane and mediate interactions with the cytoskeleton and signaling proteins.

Moreover, LFA-1 needs to be tightly regulated and is so a dynamic molecule that reacts to ligand(s) binding but that is also modulated through conformational changes initiated from the cytoplasmic domain to the extracellular ligand-binding sites, by internalization and/or cytoskeletal restraint, leading to the fact that not only can a cell modulate the type and number of integrins expressed on its surface, but the activation state of the receptors can be altered, allowing flexibility in the specificity and strength of adhesive contact.

Acknowledgments

This study is supported by the Belgian federal services for public health and security of the food chain and environment, grant S-6107. P. Vanden Bergh is a recipient of a studentship from the “Fonds pour la formation à la Recherche dans l’Industrie et l’Agriculture,” rue d’Egmont 5, B-1000 Bruxelles.

References

- [1] Sperry RW. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963;50:703–10.
- [2] Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425–34.
- [3] Hauck CR. Cell adhesion receptors—signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2002;191:55–62.
- [4] Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987;238:491–7.
- [5] Hynes RO. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol* 2004;23:333–40.
- [6] Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987;48:549–54.
- [7] Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11–25.
- [8] Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 2000;28:311–39.
- [9] Cabanas C, Sanchez-Madrid F. CD11c (leukocyte integrin CR4 alpha subunit). *J Biol Regul Homeost Agents* 1999;13:134–6.
- [10] Dickeson SK, Santoro SA. Ligand recognition by the I domain-containing integrins. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:556–66.
- [11] Berman AE, Kozlova NI, Morozevich GE. Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc)* 2003;68:1284–99.
- [12] Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1987;5:223–52.
- [13] Cabanas C, Sanchez-Madrid F. CD11a (leukocyte integrin LFA-1 alpha subunit). *J Biol Regul Homeost Agents* 1999;13:126–9.
- [14] Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1979;9:301–6.
- [15] Cabanas C, Sanchez-Madrid F. CD11b (leukocyte integrin CR3 alpha subunit). *J Biol Regul Homeost Agents* 1999;13:130–3.
- [16] Hogg N, Takacs L, Palmer DG, Selvendran Y, Allen C. The p150, 95 molecule is a marker of human mononuclear phagocytes: comparison with expression of class II molecules. *Eur J Immunol* 1986;16:240–8.
- [17] Van der Vieren M, Le Trong H, Wood CL, Moore PF, St John T, Staunton DE, et al. A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* 1995;3:683–90.

- [18] Danilenko DM, Rossitto PV, Van der Vieren M, Le Trong H, McDonough SP, Affolter VK, et al. A novel canine leukointegrin, alpha d beta 2, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and a minor CD8+ lymphocyte subpopulation in peripheral blood. *J Immunol* 1995;155:35–44.
- [19] Arnaout MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 1990;75:1037–50.
- [20] Gahmberg CG, Tolvanen M, Kotovuori P. Leukocyte adhesion—structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem* 1997;245:215–32.
- [21] Sanchez-Madrid F, Nagy JA, Robbins E, Simon P, Springer TA. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150, 95 molecule. *J Exp Med* 1983;158:1785–803.
- [22] Bailly P, Tontti E, Hermand P, Cartron JP, Gahmberg CG. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immunol* 1995;25:3316–20.
- [23] Gahmberg CG. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:643–50.
- [24] Tian L, Yoshihara Y, Mizuno T, Mori K, Gahmberg CG. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J Immunol* 1997;158:928–36.
- [25] Mizuno T, Yoshihara Y, Inazawa J, Kagamiyama H, Mori K. cDNA cloning and chromosomal localization of the human telencephalin and its distinctive interaction with lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* 1997;272:1156–63.
- [26] Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989;339:61–4.
- [27] deFougerolles AR, Springer TA. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* 1992;175:185–90.
- [28] Fawcett J, Holness CL, Needham LA, Turley H, Gatter KC, Mason DY, et al. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 1992;360:481–4.
- [29] Vazeux R, Hoffman PA, Tomita JK, Dickinson ES, Jasman RL, St John T, et al. Cloning and characterization of a new intercellular adhesion molecule ICAM-R. *Nature* 1992;360:485–8.
- [30] Hermand P, Huet M, Callebaut I, Gane P, Ihanus E, Gahmberg CG, et al. Binding sites of leukocyte beta 2 integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein. *J Biol Chem* 2000;275:26002–10.
- [31] Nortamo P, Li R, Renkonen R, Timonen T, Prieto J, Patarroyo M, et al. The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* 1991;21:2629–32.
- [32] Gahmberg CG, Nortamo P, Zimmermann D, Ruoslahti E. The human leukocyte-adhesion ligand, intercellular-adhesion molecule 2. Expression and characterization of the protein. *Eur J Biochem* 1991;195:177–82.
- [33] Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994;94:1243–51.
- [34] Bailly P, Hermand P, Callebaut I, Sonneborn HH, Khamlichi S, Mornon JP, et al. The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5306–10.
- [35] Yoshihara Y, Oka S, Nemoto Y, Watanabe Y, Nagata S, Kagamiyama H, et al. An ICAM-related neuronal glycoprotein, telencephalin, with brain segment-specific expression. *Neuron* 1994;12:541–53.
- [36] Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 1986;137:1270–4.
- [37] Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol* 2003;171:6105–11.
- [38] Hogg N, Smith A, McDowall A, Giles K, Stanley P, Laschinger M, et al. How T cells use LFA-1 to attach and migrate. *Immunol Lett* 2004;92:51–4.

- [39] Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity* 2004;20:393–406.
- [40] Yan SR, Sapru K, Issekutz AC. The CD11/CD18 (beta) integrins modulate neutrophil caspase activation and survival following TNF-alpha or endotoxin induced transendothelial migration. *Immunol Cell Biol* 2004;82:435–46.
- [41] Dib K. BETA 2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci* 2000;5:D438–51.
- [42] Humphries MJ, Symonds EJ, Mould AP. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:236–43.
- [43] Walters SE, Tang RH, Cheng M, Tan SM, Alex Law SK. Differential activation of LFA-1 and Mac-1 ligand binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:142–8.
- [44] Huang C, Springer TA. Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3162–7.
- [45] Binnerts ME, van Kooyk Y. How LFA-1 binds to different ligands. *Immunol Today* 1999;20:240–5.
- [46] Randi AM, Hogg N. I domain of beta 2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1 contains a binding site for ligand intercellular adhesion molecule-1. *J Biol Chem* 1994;269:12395–8.
- [47] Qu A, Leahy DJ. Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, alpha L beta 2) integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10277–81.
- [48] Lee JO, Bankston LA, Arnaout MA, Liddington RC. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 1995;3:1333–40.
- [49] Lee JO, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 1995;80:631–8.
- [50] Huth JR, Olejniczak ET, Mendoza R, Liang H, Harris EA, Lupher ML Jr, et al. NMR and mutagenesis evidence for an I domain allosteric site that regulates lymphocyte function-associated antigen 1 ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5231–6.
- [51] Lupher ML Jr, Harris EA, Beals CR, Sui LM, Liddington RC, Staunton DE. Cellular activation of leukocyte function-associated antigen-1 and its affinity are regulated at the I domain allosteric site. *J Immunol* 2001;167:1431–9.
- [52] Lum AF, Green CE, Lee GR, Staunton DE, Simon SI. Dynamic regulation of LFA-1 activation and neutrophil arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow. *J Biol Chem* 2002;277:20660–70.
- [53] Landis RC, McDowall A, Holness CL, Littler AJ, Simmons DL, Hogg N. Involvement of the “I” domain of LFA-1 in selective binding to ligands ICAM-1 and ICAM-3. *J Cell Biol* 1994;126:529–37.
- [54] Qu A, Leahy DJ. The role of the divalent cation in the structure of the I domain from the CD11a/CD18 integrin. *Structure* 1996;4:931–42.
- [55] Baldwin ET, Sarver RW, Bryant GL Jr, Curry KA, Fairbanks MB, Finzel BC, et al. Cation binding to the integrin CD11b I domain and activation model assessment. *Structure* 1998;6:923–35.
- [56] Xiong JP, Li R, Essafi M, Stehle T, Arnaout MA. An isoleucine-based allosteric switch controls affinity and shape shifting in integrin CD11b A-domain. *J Biol Chem* 2000;275:38762–7.
- [57] Vorup-Jensen T, Ostermeier C, Shimaoka M, Hommel U, Springer TA. Structure and allosteric regulation of the alpha X beta 2 integrin I domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1873–8.
- [58] Springer TA. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:65–72.
- [59] Tuckwell DS, Brass A, Humphries MJ. Homology modelling of integrin EF-hands. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site. *Biochem J* 1992;285(Pt 1):325–31.
- [60] Lu CF, Springer TA. The alpha subunit cytoplasmic domain regulates the assembly and adhesiveness of integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *J Immunol* 1997;159:268–78.
- [61] Weber C, Lu CF, Casasnovas JM, Springer TA. Role of alpha L beta 2 integrin avidity in transendothelial chemotaxis of mononuclear cells. *J Immunol* 1997;159:3968–75.
- [62] Hibbs ML, Xu H, Stacker SA, Springer TA. Regulation of adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science* 1991;251:1611–3.

- [63] O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, et al. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 1994;124:1047–59.
- [64] Semmrich M, Smith A, Feterowski C, Beer S, Engelhardt B, Busch DH, et al. Importance of integrin LFA-1 deactivation for the generation of immune responses. *J Exp Med* 2005;201:1987–98.
- [65] Tohyama Y, Katagiri K, Pardi R, Lu C, Springer TA, Kinashi T. The critical cytoplasmic regions of the alphaL/beta2 integrin in Rap1-induced adhesion and migration. *Mol Biol Cell* 2003;14:2570–82.
- [66] Larson RS, Corbi AL, Berman L, Springer T. Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J Cell Biol* 1989;108:703–12.
- [67] Fett T, Zecchinon L, Baise E, Desmecht D. Cloning and characterisation of the primary structure of the sheep lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit. *Mol Immunol* 2005;42:1503–8.
- [68] Fett T, Zecchinon L, Baise E, Desmecht D. The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA: molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene* 2004;325:97–101.
- [69] Vanden Bergh PG, Fett T, Zecchinon LL, Thomas AV, Desmecht DJ. The CD11a partner in *Sus scrofa* lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1): mRNA cloning, structure analysis and comparison with mammalian homologues. *BMC Vet Res* 2005;1:5.
- [70] Kaufmann Y, Tseng E, Springer TA. Cloning of the murine lymphocyte function-associated molecule-1 alpha-subunit and its expression in COS cells. *J Immunol* 1991;147:369–74.
- [71] Rothlein R, Springer TA. The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J Exp Med* 1986;163:1132–49.
- [72] Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989;341:619–24.
- [73] Vitte J, Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Direct quantification of the modulation of interaction between cell- or surface-bound LFA-1 and ICAM-1. *J Leukoc Biol* 2004;76:594–602.
- [74] Kim M, Carman CV, Springer TA. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 2003;301:1720–5.
- [75] Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 1999;24:261–3.
- [76] Huang C, Zang Q, Takagi J, Springer TA. Structural and functional studies with antibodies to the integrin beta 2 subunit. A model for the I-like domain. *J Biol Chem* 2000;275:21514–24.
- [77] Yuan QA, Jiang WM, Krissansen GW, Watson JD. Cloning and sequence analysis of a novel beta 2-related integrin transcript from T lymphocytes: homology of integrin cysteine-rich repeats to domain III of laminin B chains. *Int Immunol* 1990;2:1097–108.
- [78] Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 2001;294:339–45.
- [79] Beglova N, Blacklow SC, Takagi J, Springer TA. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol* 2002;9:282–7.
- [80] Tuckwell DS, Humphries MJ. A structure prediction for the ligand-binding region of the integrin beta subunit: evidence for the presence of a von Willebrand factor A domain. *FEBS Lett* 1997;400:297–303.
- [81] Goodman TG, Bajt ML. Identifying the putative metal ion-dependent adhesion site in the beta2 (CD18) subunit required for alphaLbeta2 and alphaMbeta2 ligand interactions. *J Biol Chem* 1996;271:23729–36.
- [82] Berg RW, Leung E, Gough S, Morris C, Yao WP, Wang SX, et al. Cloning and characterization of a novel beta integrin-related cDNA coding for the protein TIED (“ten beta integrin EGF-like repeat domains”) that maps to chromosome band 13q33: a divergent stand-alone integrin stalk structure. *Genomics* 1999;56:169–78.
- [83] Douglass WA, Hyland RH, Buckley CD, Al-Shamkhani A, Shaw JM, Scarth SL, et al. The role of the cysteine-rich region of the beta2 integrin subunit in the leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, alphaLbeta2, CD11a/CD18) heterodimer formation and ligand binding. *FEBS Lett* 1998;440:414–8.
- [84] Hogg N, Bates PA. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol* 2000;19:211–22.

- [85] Back AL, Kwok WW, Hickstein DD. Identification of two molecular defects in a child with leukocyte adherence deficiency. *J Biol Chem* 1992;267:5482–7.
- [86] Arnaout MA, Dana N, Gupta SK, Tenen DG, Fathallah DM. Point mutations impairing cell surface expression of the common beta subunit (CD18) in a patient with leukocyte adhesion molecule (Leu-CAM) deficiency. *J Clin Invest* 1990;85:977–81.
- [87] Wardlaw AJ, Hibbs ML, Stacker SA, Springer TA. Distinct mutations in two patients with leukocyte adhesion deficiency and their functional correlates. *J Exp Med* 1990;172:335–45.
- [88] Hibbs ML, Jakes S, Stacker SA, Wallace RW, Springer TA. The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 beta subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J Exp Med* 1991;174:1227–38.
- [89] Pardi R, Bossi G, Inverardi L, Rovida E, Bender JR. Conserved regions in the cytoplasmic domains of the leukocyte integrin alpha L beta 2 are involved in endoplasmic reticulum retention, dimerization, and cytoskeletal association. *J Immunol* 1995;155:1252–63.
- [90] Sampath R, Gallagher PJ, Pavalko FM. Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol Chem* 1998;273:33588–94.
- [91] Fabbri M, Fumagalli L, Bossi G, Bianchi E, Bender JR, Pardi R. A tyrosine-based sorting signal in the beta2 integrin cytoplasmic domain mediates its recycling to the plasma membrane and is required for ligand-supported migration. *EMBO J* 1999;18:4915–25.
- [92] Peter K, O'Toole TE. Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J Exp Med* 1995;181:315–26.
- [93] Chatila TA, Geha RS, Arnaout MA. Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules. *J Cell Biol* 1989;109:3435–44.
- [94] Figdor CG, van Kooyk Y, Keizer GD. On the mode of action of LFA-1. *Immunol Today* 1990;11:277–80.
- [95] Buyon JP, Slade SG, Reibman J, Abramson SB, Philips MR, Weissmann G, et al. Constitutive and induced phosphorylation of the alpha- and beta-chains of the CD11/CD18 leukocyte integrin family. Relationship to adhesion-dependent functions. *J Immunol* 1990;144:191–7.
- [96] House C, Wettenhall RE, Kemp BE. The influence of basic residues on the substrate specificity of protein kinase C. *J Biol Chem* 1987;262:772–7.
- [97] Kishimoto TK, O'Connor K, Lee A, Roberts TM, Springer TA. Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell* 1987;48:681–90.
- [98] Weitzman JB, Wells CE, Wright AH, Clark PA, Law SK. The gene organisation of the human beta 2 integrin subunit (CD18). *FEBS Lett* 1991;294:97–103.
- [99] Shuster DE, Bosworth BT, Kehrli ME Jr. Sequence of the bovine CD18-encoding cDNA: comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene* 1992;114:267–71.
- [100] Zecchinon L, Fett T, Baise E, Desmecht D. Molecular cloning and characterisation of the CD18 partner in ovine (*Ovis aries*) beta2-integrins. *Gene* 2004;334:47–52.
- [101] Zecchinon L, Fett T, Baise E, Desmecht D. Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*. *Mol Membr Biol* 2004;21:289–95.
- [102] Lee JK, Schook LB, Rutherford MS. Molecular cloning and characterization of the porcine CD18 leukocyte adhesion molecule. *Xenotransplantation* 1996;3:222–30.
- [103] Wilson RW, O'Brien WE, Beaudet AL. Nucleotide sequence of the cDNA from the mouse leukocyte adhesion protein CD18. *Nucleic Acids Res* 1989;17:5397.
- [104] Kijas JM, Bauer TR Jr, Gafvert S, Marklund S, Trowald-Wigh G, Johannisson A, et al. A missense mutation in the beta-2 integrin gene (ITGB2) causes canine leukocyte adhesion deficiency. *Genomics* 1999;61:101–7.
- [105] Bilsland CA, Springer TA. Cloning and expression of the chicken CD18 cDNA. *J Leukoc Biol* 1994;55:501–6.

- [106] Qian Y, Ainsworth AJ, Noya M. Identification of a beta 2 (CD18) molecule in a teleost species, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Dev Comp Immunol* 1999;23:571–83.
- [107] Bajt ML, Goodman T, McGuire SL. Beta 2 (CD18) mutations abolish ligand recognition by I domain integrins LFA-1 (alpha L beta 2, CD11a/CD18) and MAC-1 (alpha M beta 2, CD11b/CD18). *J Biol Chem* 1995;270:94–8.
- [108] Hogg N, Stewart MP, Scarth SL, Newton R, Shaw JM, Law SK, et al. A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional beta2 integrins Mac-1 and LFA-1. *J Clin Invest* 1999;103:97–106.
- [109] Huang C, Lu C, Springer TA. Folding of the conserved domain but not of flanking regions in the integrin beta2 subunit requires association with the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3156–61.
- [110] Lu C, Oxvig C, Springer TA. The structure of the beta-propeller domain and C-terminal region of the integrin alphaM subunit. Dependence on beta subunit association and prediction of domains. *J Biol Chem* 1998;273:15138–47.
- [111] Yalamanchili P, Lu C, Oxvig C, Springer TA. Folding and function of I domain-deleted Mac-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* 2000;275:21877–82.
- [112] Hyland RH, Douglass WA, Tan SM, Law SK. Chimeras of the integrin beta subunit mid-region reveal regions required for heterodimer formation and for activation. *Cell Commun Adhes* 2001;8:61–9.
- [113] Lu C, Takagi J, Springer TA. Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem* 2001;276:14642–8.
- [114] Landolt-Marticorena C, Williams KA, Deber CM, Reithmeier RA. Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *J Mol Biol* 1993;229:602–8.
- [115] Stewart MP, McDowall A, Hogg N. LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain. *J Cell Biol* 1998;140:699–707.
- [116] Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:547–56.
- [117] Bretscher MS. Circulating integrins: alpha 5 beta 1, alpha 6 beta 4 and Mac-1, but not alpha 3 beta 1, alpha 4 beta 1 or LFA-1. *EMBO J* 1992;11:405–10.
- [118] Takagi J, Springer TA. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev* 2002;186:141–63.
- [119] Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2005;5:546–59.
- [120] Dustin ML, Bivona TG, Philips MR. Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nat Immunol* 2004;5:363–72.
- [121] Springer TA, Wang JH. The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. *Adv Protein Chem* 2004;68:29–63.
- [122] Luo BH, Springer TA, Takagi J. Stabilizing the open conformation of the integrin headpiece with a glycan wedge increases affinity for ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2403–8.
- [123] Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002;110:599–611.
- [124] Shimaoka M, Lu C, Palframan RT, von Andrian UH, McCormack A, Takagi J, et al. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin alphaL I domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6009–14.
- [125] Shimaoka M, Springer TA. Therapeutic antagonists and the conformational regulation of the beta2 integrins. *Curr Top Med Chem* 2004;4:1485–95.
- [126] Shimaoka M, Xiao T, Liu JH, Yang Y, Dong Y, Jun CD, et al. Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* 2003;112:99–111.
- [127] Lu C, Ferzly M, Takagi J, Springer TA. Epitope mapping of antibodies to the C-terminal region of the integrin beta 2 subunit reveals regions that become exposed upon receptor activation. *J Immunol* 2001;166:5629–37.
- [128] Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, Hu B, Haas T, Plow E, et al. A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) “inside-out” activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 2002;110:587–97.

- [129] Hughes PE, Diaz-Gonzalez F, Leong L, Wu C, McDonald JA, Shattil SJ, et al. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem* 1996;271:6571–4.
- [130] Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:485–516.
- [131] Humphries MJ, McEwan PA, Barton SJ, Buckley PA, Bella J, Mould AP. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem Sci* 2003;28:313–20.
- [132] Soede RD, Driessens MH, Ruuls-Van Stalle L, Van Hulten PE, Brink A, Roos E. LFA-1 to LFA-1 signals involve zeta-associated protein-70 (ZAP-70) tyrosine kinase: relevance for invasion and migration of a T cell hybridoma. *J Immunol* 1999;163:4253–61.
- [133] Lub M, van Kooyk Y, van Vliet SJ, Figdor CG. Dual role of the actin cytoskeleton in regulating cell adhesion mediated by the integrin lymphocyte function-associated molecule-1. *Mol Biol Cell* 1997;8:341–51.
- [134] Porter JC, Bracke M, Smith A, Davies D, Hogg N. Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. *J Immunol* 2002;168:6330–5.
- [135] Kim M, Carman CV, Yang W, Salas A, Springer TA. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin {alpha}L{beta}2. *J Cell Biol* 2004;167:1241–53.
- [136] Yamada KM, Even-Ram S. Integrin regulation of growth factor receptors. *Nat Cell Biol* 2002;4:E75–6.
- [137] Stewart M, Hogg N. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem* 1996;61:554–61.
- [138] Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, et al. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 2000;13:759–69.
- [139] van Kooyk Y, Figdor CG. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:542–7.
- [140] Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827–72.
- [141] Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999;285:221–7.
- [142] Hughes PE, Pfaff M. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol* 1998;8:359–64.
- [143] Ardouin L, Bracke M, Mathiot A, Pagakis SN, Norton T, Hogg N, et al. Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. *Eur J Immunol* 2003;33:790–7.
- [144] Krawczyk C, Oliveira-dos-Santos A, Sasaki T, Griffiths E, Ohashi PS, Snapper S, et al. Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity* 2002;16:331–43.
- [145] Griffiths EK, Penninger JM. Communication between the TCR and integrins: role of the molecular adapter ADAP/Fyb/Slap. *Curr Opin Immunol* 2002;14:317–22.
- [146] Griffiths EK, Penninger JM. ADAP-ting TCR signaling to integrins. *Sci STKE* 2002;2002:RE3.
- [147] Peterson EJ, Woods ML, Dmowski SA, Derimanov G, Jordan MS, Wu JN, et al. Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* 2001;293:2263–5.
- [148] Wang H, Moon EY, Azouz A, Wu X, Smith A, Schneider H, et al. SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nat Immunol* 2003;4:366–74.
- [149] Jo EK, Wang H, Rudd CE. An essential role for SKAP-55 in LFA-1 clustering on T cells that cannot be substituted by SKAP-55R. *J Exp Med* 2005;201:1733–9.
- [150] van Kooyk Y, van Vliet SJ, Figdor CG. The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J Biol Chem* 1999;274:26869–77.
- [151] Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJ, Hynes RO, Ginsberg MH. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* 1999;274:28071–4.
- [152] Pavalko FM, LaRoche SM. Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. *J Immunol* 1993;151:3795–807.

4.3. Fonctions biologiques de la β 2-intégrine LFA-1

Zecchinon L., Fett T., Vanden Bergh P., Desmecht D.

Key roles of LFA-1 in leukocyte migration and immune response.

Clin Applied Immunol Rev, 2006, 6, 191-200.



ELSEVIER

Clinical and Applied Immunology Reviews 6 (2006) 191–200

Clinical
and
Applied
Immunology
Reviews

Key roles of LFA-1 in leukocyte migration and immune response

L. Zecchinon, T. Fett, P. Vanden Bergh, D. Desmecht*

*Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège,
FMV Sart Tilman B43, B-4000 Liège, Belgium*

Received 2 December 2005; received in revised form 26 September 2006; accepted 26 September 2006.

Abstract

To patrol the body effectively for infectious organisms, the cells of the immune system must both circulate as nonadherent cells in the blood and lymph and, in the presence of a foreign antigen, be able to congregate in lymphoid organs, cross endothelial and basement membranes to aggregate at sites of infection, and adhere to cells bearing foreign antigen. In this context, lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) plays a critical role (1) in forming stable bonds with counter receptors in the vascular walls to allow leukocytes to leave the circulation and (2) in validating the interaction between an antigen presenting cell and a T lymphocyte. Both roles are described in detail in this review.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: LFA-1; Integrin; Adhesion; Migration

1. Introduction

Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), also known as CD11a/CD18 or $\alpha_L\beta_2$, is the predominant β_2 -integrin, expressed on virtually all leukocytes and many leukocyte-derived cells [1–3]. The CD11a–d/CD18 heterodimers mediate high-affinity adhesion to a variety of cell types that display one or more of the β_2 -integrins ligands, intercellular adhesion molecules (ICAMs) (ICAM-1 to -5) [4–19]. The adhesion process mediated is a critical step

Abbreviations: APC, antigen presenting cell; DC, dendritic cell; ICAM, intercellular adhesion molecule; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen-1; MHC, major histocompatibility complex; TCR, T-cell receptor.

* Corresponding author. Tel.: +32 4 366 4075; fax: +32 4 366 4565.

E-mail address: daniel.desmecht@ulg.ac.be (D. Desmecht).

1529-1049/06/\$ — see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cair.2006.09.003

of a wide range of immunological activities, including cytolysis of target cells, cross-interaction and cross-stimulation between lymphocytes, phagocytosis of complement-coated targets, neutrophils clearance from inflammation sites, and the regulation of leukocyte traffic between the bloodstream and tissues [20–23].

2. Roles of LFA-1

2.1. Cell migration

Cell migration plays a key role in a wide variety of biological phenomena including leukocyte function and the inflammatory response. Indeed, to patrol the body effectively for infectious organisms, the cells of the immune system must both circulate as nonadherent cells in the blood and lymph and, in the presence of a foreign antigen, be able to congregate in lymphoid organs, cross endothelial and basement membrane barriers to aggregate at sites of infection, and adhere to cells bearing foreign antigen. Hence, rapid transition between adherent and nonadherent states is of key importance to the dual functions of immune surveillance and responsiveness [2,24].

T-cells are at the heart of most adaptative immune responses by performing many functions, the nature of which depends upon their maturation and activation status [25]. T-cell function and migration are in fact 2 sides of the same coin [26] and the latter process is known to be LFA-1 dependent, though $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_4\beta_7$ are also involved [21]. Typically, T-cells respond to pathogens only on direct contact with pathogen-derived antigen(s), and must thus migrate to sites where antigens are found. But, as antigens occur in countless shapes and forms, the immune system has to counter this diversity by generating a large army of combat-ready T-cells, each with a unique T-cell receptor (TCR) [26]. Initially, naïve T-cells (T-cells newly emigrated from the thymus that have never encountered antigen) must determine whether antigen is present and whether it poses a threat to the body. This information is provided by dendritic cells (DCs) that in the periphery capture and process antigens, express lymphocyte costimulatory molecules, migrate to lymphoid organs (the spleen and the lymph nodes), secrete cytokines to initiate immune responses, and also tolerize T-cells to antigens that are innate to the body (self-antigens), thereby minimizing autoimmune reactions [27]. Naïve T-cells migrate preferentially to these lymphoid tissues in search of antigen presented by DCs, a process referred to as homing [28], where an encounter with an antigen induces the formation of T-cell clones, yielding approximately 1000 times more descendants with identical antigenic specificity [26]. Eventually, these activated lymphocytes acquire effector functions and home to sites of inflammation, where they interact with antigen-bearing parenchymal cells and leukocytes such as (1) macrophages and neutrophils, or (2) eosinophils, mast cells, and basophils, in reactions, respectively, induced by the CD4⁺ T helper lymphocytes 1 or 2. Their polarization, based on their profile of cytokine production, is determined by both environmental and genetic factors that act in concert. T helper lymphocyte 1 cells (which produce interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-beta) evoke cell-mediated immunity and phagocyte-dependent inflammation, whereas Th2 cells (which produce interleukin-4 to -6, -9, -10, and -13) evoke strong antibody responses (including those of the Immunoglobulin E class) and eosinophil accumulation, but inhibit several functions of phagocytic cells [29].

Other effector cells orchestrate humoral responses by contacting activated B cells in lymphoid organs or persist as circulating memory cells that can confer protection by giving, upon secondary challenge, a qualitatively different and quantitatively enhanced response [26].

Because flowing blood quickly dislodges cells that touch the vessel wall by extreme fluid dynamics, T-cells need adhesion receptors to form stable bonds with counter receptors in the vascular wall and to display tissue-specific recognition signals. Accordingly, leukocytes engage several sequential adhesion pathways to leave the circulation. Initially, tethers are formed by selectins that are specialized to intervene rapidly and with high tensile strength [30,31] but, as the flowing blood exerts pressure, these selectin-mediated adhesion bonds dissociate at the cell's upstream end and new bonds form downstream, resulting in a rolling motion that is much slower than that of free-flowing cells [26,32]. To stop rolling, cells must recruit additional receptors belonging to the integrin family, specifically LFA-1, $\alpha_4\beta_1$, and $\alpha_4\beta_7$ [26,33–36]. Selectins are constitutively active but integrins become activated when rolling cells receive signals from chemokines on endothelial surface. Chemokines are secreted polypeptides that bind to heparin-like glycosaminoglycans on cell surfaces and in the extracellular matrix, which transmit signals through G proteins [26,36–40]. Actually, they act as signal lamps for trafficking of lymphocytes at the important crossing points of lymphoid tissues. As a result, T-cells adhere to the endothelium and undergo polarization, with the formation of a lamellipodium at the leading edge and a uropod at the trailing edge, allowing them to convert cytoskeletal forces into net cell-body displacement. A complex system of signal transduction molecules, including tyrosine kinases, lipid kinases, second messengers, and members of the Rho family of small GTPases is thought to regulate these cytoskeletal rearrangements, that in turn promote chemoattractant receptors, integrins, and other adhesion molecules, cytoskeletal proteins and intracellular regulatory molecules to change their cellular localization [41]. However, it is unclear whether the chemokine signal is locally transmitted at the endothelial contact zone or whether the rolling leukocyte accumulates successive chemokine signals to reach a threshold global activation. Recent in vitro and in vivo data suggest that the induction of high integrin avidity by endothelial chemokine-transduced G(i)-signals is a general mechanism that has evolved to locally enhance integrin avidity to ligand within subseconds at restricted leukocyte-endothelial contacts. In addition, a second specialized mechanism, involving stepwise signals integrated by selectin ligands on rolling cells, seems to activate integrins on the entire leukocyte surface. This G protein-coupled receptors-independent and much slower pathway (10^1 – 10^2 s) is transmitted through rolling engagements of neutrophils, primarily on E-selectin. It has been proposed that these 2 mechanisms are differentially used by distinct leukocyte subsets at various vascular beds, providing much larger combinatorial diversity of integrin activation on rolling leukocytes than previously predicted [36].

Accordingly, many features of the migrating T-cell can be mimicked in vitro through the binding of active LFA-1 on T-cells to immobilized ICAM-1. Within 1–2 min of contact, T-cell polarization is evident and within 2–3 min, the T-cell becomes motile and migrates randomly (by switching low and high motility behavior) with an average speed of 10.3 $\mu\text{m}/\text{min}$ enabling rapid initiation of the immune response [42,43]. These events are critically dependent on dynamic changes to the actomyosin cytoskeleton under the regulation of

myosin light chain kinase operating at the leading edge and Rho-associated kinase involved in the retraction of the trailing edge, both processes operating coordinately to cause forward migration of a T-cell [43]. Chemokines are quite likely to be the key molecules directing migration of leukocytes that involve cell polarization with generation of specialized cell compartments [44] as membrane receptors associated with adhesion move either to leading or trailing of the cells [26]. For example, the chemokine receptors CCR2 and CCR5 localize at the leading edge providing stimulating signals for integrins and directional clues [44], whereas ICAM-1/ICAM-3, CD43, and CD44 move to the uropod [26,45]. The GTPase family member RhoA required in trailing end detachment and hence cell migration has been well-documented for leukocytes [43,46–48]. Rho-associated kinase that is known to have many potential downstream effectors [21,49], also prevents detachment at the rear of the migrating T-cell [43].

Furthermore, *in vitro* flow chamber models showed very recently that endothelium-presented chemokines triggered instantaneous extension of bent LFA-1 (in the absence of ligand engagement) that primed the integrin to a subsequent ICAM-1–induced activation of the I domain, which is immediately needed to support lymphocyte adhesion [50]. The unfolded LFA-1 is predicted to extend 25 nm over the cell surface, compared with the inactive folded state, which extends only 5 nm over the surface and is practically inaccessible to ligand immobilized on a “counter surface” [51]. Notably, soluble chemokines failed to promote this critical integrin extension and therefore poorly stimulated adhesiveness under shear flow [50]. According to Shamri et al., LFA-1 activation under shear flow in lymphocytes is an abrupt and spatially confined event that does not depend on a prior chemokine encounter during selectin-mediated rolling. Thus, stepwise activation of LFA-1 by chemokine signals does not seem necessary for firm LFA-1–dependent arrest on vascular [50,52].

2.2. Interactions between T-cells and antigen presenting cells

The mammalian immune system must specifically recognize and eliminate foreign invaders but refrain from damaging the host. This task is accomplished in part by the production of a large number of T lymphocytes, each bearing a different antigen receptor to match the enormous variety of antigens present in the microbial world. However, because antigen receptor diversity is generated by a random mechanism, the immune system must tolerate the function of T lymphocytes that by chance express a self-reactive antigen receptor. Therefore, both T and B cells are selected during development against overt self-reactivity although this process is not unequivocal as autoreactive cells can escape deletion and, in some cases, lead to autoimmune diseases. Central to the recognition of self- and nonself antigens is the interaction, within the lymph node, of antigen-specific T-cells and professional antigen presenting cells (APCs) (DCs, macrophages, and B lymphocytes) that present an antigenic peptide bound to cell surface major histocompatibility complex (MHC) proteins. These latter molecules are divided into 4 structurally different classes [53], the main of which being MHC class I and II receptors. MHC class I receptors are recognized by cytotoxic CD8⁺ T-cells or killer T-cells and present peptides that are derived from pathogen proteins generated inside the APC (i.e., virally infected or cancerous cells), whereas MHC class II receptors present peptides usually derived from pathogens taken up from outside the APC

that are recognized by CD4⁺ T helper 1 and T helper 2 cells. These cells help to activate B cells to produce antibodies and macrophages for intracellular killing of pathogens harbored inside target cells [54,55]. Primary immune responses are initiated by specific physical interaction of antigen-specific T-cells and APCs, forming a contact zone termed the “immunological synapse” [56–59]. Both this antigen-specific interaction (signal-1) and a costimulatory signal (signal-2, caused by interactions of several different pairs of molecules at the interface between T-cells and APC, including the interaction between LFA-1 on T-cells and ICAM-1 on the APC), are necessary to activate naïve T-cells during the interaction with the APC [58,60–63]. In fact, MHC-antigen binding to the TCR in the absence of a costimulatory signal not only fails to activate the cell but also leads to a state called anergy in which the T-cell becomes refractory to activation [64]. The source of this secondary signal can influence the type of response generated by T-cells as blocking ICAM-1/LFA-1 leads to a significant increase in Th2 cytokines [65], whereas costimulation by ICAM-1/LFA-1 (1) strongly inhibits interleukin-10 production, which may favor the development of T helper lymphocyte 1 rather than T helper lymphocyte 2 cells [66] and (2) functions as a threshold modulator of T helper lymphocyte 2 cell differentiation by increasing the effective concentration of interleukin-4 required to drive T helper lymphocyte 2 cell responses [67]. By inhibiting ICAM-1/LFA-1 interaction, T-cells are prevented from firm adhesion to epithelial, endothelial, or APC cells and are thus prevented from taking part in the immune response [54].

Productive interactions between T-cells and APCs seem to be a dynamic process that combines physical binding with vigorous crawling across and scanning of the APC surface, resulting in signal induction. The T-cells maintain vigorous migration upon cognate interactions to DCs, continuously crawl across the DC surface, and rapidly detach (median within 6–12 min). These dynamic and short-lived encounters favor sequential contacts with the same or other DC and trigger calcium influx, upregulation of activation markers, T blast formation, and proliferation [68]. After T-cell detachment, subsequent migratory contacts to the same or neighboring DCs allow the accumulation of sequential signals and interaction time [69]. Although DCs are remarkably efficient in evoking T-cell responses with few antigen–MHC complexes (1–100 per DC) [42,70–72], they must first encounter a T-cell with appropriate antigen specificity (one in 10⁵–10⁶). This presents a “needle-in-a-haystack” problem, in that DCs must rapidly scan a large portion of the T-cell repertoire to establish rare cognate interactions [42]. The mechanisms by which this is accomplished are poorly understood. Chemotaxis has been proposed to guide T-cells toward DC, thereby increasing the likelihood of productive interactions [26,73,74]. However, naïve CD4⁺ T-cells exhibit random migration in vivo, suggesting that antigen recognition may arise instead through a stochastic mechanism [75,76] and do not migrate collectively as they might under the direction of pervasive chemokine gradients. Instead, they appear to migrate as autonomous agents, each cell taking an independent trafficking path [77]. Furthermore, DCs vigorously extend and sweep their dendrites in all directions, which increase their available surface area, and are clearly active partners in initiating and terminating contacts with T-cells. Because multiple dendrites extend from the DC body and move several times faster than T-cells, DC can survey a large percentage of T-cells in their vicinity as they are able to contact ~5000 T-cells per hour [42]. As each contact lasts ~3 min, each DC would be in contact with ~250 T-cells at any instant, a number which is close to the limit of available surface area on

DC, estimated to $\sim 2400 \mu\text{m}^2$, if we consider a mean contact area with a T-cell as $\sim 8 \mu\text{m}^2$, thereby restricting the maximum number of simultaneous T-cell contacts to ~ 300 [42]. As an example of scanning efficiency, assuming that a node contains 100 antigen-bearing DCs, this rate would give a 95% probability of contacting an antigen-specific T-cell present at a frequency of 1 in 10^6 within ~ 6 h. This simple calculation assumes an even distribution of T-cells that can each be sampled more than once and verifies that a stochastic scanning mechanism is compatible with the kinetics of immune response initiation in vivo. If T-cell/DC interactions were orchestrated by chemokine gradients, T-cells with irrelevant specificity would quickly surround DC, thereby inhibiting scanning efficiency [42].

In the early events at the T-cell contact site following antigen binding, a central zone of LFA-1 with a peripheral ring of TCRs forms. Within minutes, a dynamic rearrangement reverses this structure and the central area becomes occupied by the TCR, a mechanism that allows T-cells to distinguish potential antigenic ligands [58]. Formation of a stable central cluster at the heart of the synapse is a determinative event for T-cell activation, proliferation, and differentiation into effector cells, which can respond rapidly by migrating to locations where there is antigen challenge. These effector cells are of several subsets with functions including killing virus-infected cells, activating macrophages to kill ingested bacteria, and activating B cells to produce antibody [21,58]. The interaction of LFA-1 with ICAM-1 is believed to be a critical event in facilitating the sustained interactions between T-cells and APC that are necessary for T-cell activation [78,79]. Indeed, LFA-1 facilitates T-cell activation by lowering the amounts of antigen necessary for T-cell activation. In the absence of LFA-1, 100-fold more antigen was required for T-cell–APC conjugation and all subsequent events of T-cell activation, including TCR down-regulation, Ca^{2+} -flux, T-cell proliferation, and lytic effector cell induction. Thus, LFA-1 facilitates the functional triggering of TCRs by promoting adhesion of T-cells to APCs but does not affect T-cell activation otherwise [79].

3. Conclusion

This review emphasizes the central roles of LFA-1 in key steps such as leukocyte migration through the vessel wall and elicitation of immune response by APCs. In this context, it clearly appears that the receptor needs to be tightly regulated, either by stimuli coming from outside or inside the cell. The study of these numerous ways to modulate LFA-1 surely constitutes a promising research field.

4. Summary

The LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$) receptor is expressed on all leukocytes and mediates the direct association of cells with each other as well as with proteins of the extracellular matrix.

Consequently, LFA-1 plays a central role in key immune functions such as cell migration and interactions between T-cells and APCs. Indeed, the leukocytes that patrol the body effectively for infectious organisms must be able, in the presence of a foreign antigen, to cross endothelial and basement membrane barriers to aggregate at sites of infection, and adhere to cells bearing foreign antigen. In this context, LFA-1 (1) allows rolling cells to adhere firmly to the endothelium and then undergo polarization to cross the vessel wall, and (2) is needed

to strengthen the contact between APCs and T-cells by providing a second signal through the interaction with ICAM-1.

Acknowledgments

This study is supported by the Belgian federal services for public health and security of the food chain and environment, grant S-6107. P. Vanden Bergh is a recipient of a studentship from the “Fonds pour la formation à la Recherche dans l’Industrie et l’Agriculture,” rue d’Egmont 5, B-1000 Bruxelles.

References

- [1] Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1987;5:223–52.
- [2] Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425–34.
- [3] Cabanas C, Sanchez-Madrid F. CD11a (leukocyte integrin LFA-1 alpha subunit). *J Biol Regul Homeost Agents* 1999;13:126–9.
- [4] Bailly P, Tontti E, Hermant P, Cartron JP, Gahmberg CG. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immunol* 1995;25:3316–20.
- [5] Gahmberg CG. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:643–50.
- [6] Gahmberg CG, Tolvanen M, Kotovuori P. Leukocyte adhesion—structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem* 1997;245:215–32.
- [7] Tian L, Yoshihara Y, Mizuno T, Mori K, Gahmberg CG. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J Immunol* 1997;158:928–36.
- [8] Mizuno T, Yoshihara Y, Inazawa J, Kagamiyama H, Mori K. cDNA cloning and chromosomal localization of the human telencephalin and its distinctive interaction with lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* 1997;272:1156–63.
- [9] Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989;339:61–4.
- [10] de Fougères AR, Springer TA. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* 1992;175:185–90.
- [11] Fawcett J, Holness CL, Needham LA, Turley H, Gatter KC, Mason DY, et al. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 1992;360:481–4.
- [12] Vazeux R, Hoffman PA, Tomita JK, Dickinson ES, Jasman RL, St John T, et al. Cloning and characterization of a new intercellular adhesion molecule ICAM-R. *Nature* 1992;360:485–8.
- [13] Hermant P, Huet M, Callebaut I, Gane P, Ihanus E, Gahmberg CG, et al. Binding sites of leukocyte beta 2 integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein. *J Biol Chem* 2000;275:26002–10.
- [14] Nortamo P, Li R, Renkonen R, Timonen T, Prieto J, Patarroyo M, et al. The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* 1991;21:2629–32.
- [15] Gahmberg CG, Nortamo P, Zimmermann D, Ruoslahti E. The human leukocyte-adhesion ligand, intercellular-adhesion molecule 2. Expression and characterization of the protein. *Eur J Biochem* 1991;195:177–82.
- [16] Diacovo TG, deFougères AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994;94:1243–51.
- [17] Bailly P, Hermant P, Callebaut I, Sonneborn HH, Khamlichi S, Mornon JP, et al. The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5306–10.

- [18] Yoshihara Y, Oka S, Nemoto Y, Watanabe Y, Nagata S, Kagamiyama H, et al. An ICAM-related neuronal glycoprotein, telencephalin, with brain segment-specific expression. *Neuron* 1994;12:541–53.
- [19] Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 1986;137:1270–4.
- [20] Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol* 2003;171:6105–11.
- [21] Hogg N, Smith A, McDowall A, Giles K, Stanley P, Laschinger M, et al. How T cells use LFA-1 to attach and migrate. *Immunol Lett* 2004;92:51–4.
- [22] Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity* 2004;20:393–406.
- [23] Yan SR, Sapru K, Issekutz AC. The CD11/CD18 (beta) integrins modulate neutrophil caspase activation and survival following TNF-alpha or endotoxin induced transendothelial migration. *Immunol Cell Biol* 2004;82:435–46.
- [24] Parrott DM, Wilkinson PC. Lymphocyte locomotion and migration. *Prog Allergy* 1981;28:193–284.
- [25] Bradley LM. Migration and T-lymphocyte effector function. *Curr Opin Immunol* 2003;15:343–8.
- [26] von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000;343:1020–34.
- [27] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245–52.
- [28] Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60–6.
- [29] Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:9–18. quiz 18, 21.
- [30] Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259–87.
- [31] Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999;79:181–213.
- [32] Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991;65:859–73.
- [33] von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7538–42.
- [34] Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, et al. Alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80:413–22.
- [35] Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 1995;128:1243–53.
- [36] Alon R, Grabovsky V, Feigelson S. Chemokine induction of integrin adhesiveness on rolling and arrested leukocytes local signaling events or global stepwise activation? *Microcirculation* 2003;10:297–311.
- [37] Cyster JG. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J Exp Med* 1999;189:447–50.
- [38] Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286:2098–102.
- [39] Kim CH, Broxmeyer HE. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 1999;65:6–15.
- [40] Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 2002;16:1–4.
- [41] Sanchez-Madrid F, del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 1999;18:501–11.
- [42] Miller MJ, Hejazi AS, Wei SH, Cahalan MD, Parker I. T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:998–1003.
- [43] Smith A, Bracke M, Leitinger B, Porter JC, Hogg N. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci* 2003;116:3123–33.

- [44] Nieto M, Frade JM, Sancho D, Mellado M, Martinez AC, Sanchez-Madrid F. Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J Exp Med* 1997;186:153–8.
- [45] del Pozo MA, Sanchez-Mateos P, Nieto M, Sanchez-Madrid F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 1995;131:495–508.
- [46] Worthylake RA, Burridge K. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:569–77.
- [47] Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, Burridge K. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* 2001;154:147–60.
- [48] Alblas J, Ulfman L, Hordijk P, Koenderman L. Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol Biol Cell* 2001;12:2137–45.
- [49] Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* 2003;23:4219–29.
- [50] Shamri R, Grabovsky V, Gauguet JM, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W, et al. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol* 2005;6:497–506.
- [51] Dustin ML, Bivona TG, Philips MR. Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nat Immunol* 2004;5:363–72.
- [52] Laudanna C. Integrin activation under flow: a local affair. *Nat Immunol* 2005;6:429–30.
- [53] Gruen JR, Weissman SM. Human MHC class III and IV genes and disease associations. *Front Biosci* 2001;6:D960–72.
- [54] Anderson ME, Siahaan TJ. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides* 2003;24:487–501.
- [55] Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2245–52.
- [56] Moss WC, Irvine DJ, Davis MM, Krummel MF. Quantifying signaling-induced reorientation of T cell receptors during immunological synapse formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15024–9.
- [57] Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, et al. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 2001;19:375–96.
- [58] Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999;285:221–7.
- [59] Friedl P, den Boer AT, Gunzer M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2005;5:532–45.
- [60] Dustin ML. The immunological synapse. *Arthritis Res* 2002;4(Suppl 3):S119–25.
- [61] Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 2002;295:1539–42.
- [62] van Der Merwe PA, Davis SJ. Immunology. The immunological synapse—a multitasking system. *Science* 2002;295:1479–80.
- [63] Sims TN, Dustin ML. The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol Rev* 2002;186:100–17.
- [64] Jois SD, Tibbetts SA, Chan MA, Benedict SH, Siahaan TJ. A Ca²⁺ binding cyclic peptide derived from the alpha-subunit of LFA-1: inhibitor of ICAM-1/LFA-1-mediated T-cell adhesion. *J Pept Res* 1999;53:18–29.
- [65] Salomon B, Bluestone JA. LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J Immunol* 1998;161:5138–42.
- [66] Labuda T, Wendt J, Hedlund G, Dohlsten M. ICAM-1 costimulation induces IL-2 but inhibits IL-10 production in superantigen-activated human CD4⁺ T cells. *Immunology* 1998;94:496–502.
- [67] Jenks SA, Eisfelder BJ, Miller J. LFA-1 co-stimulation inhibits T(h)2 differentiation by down-modulating IL-4 responsiveness. *Int Immunol* 2005;17:315–23.
- [68] Gunzer M, Schafer A, Borgmann S, Grabbe S, Zanker KS, Brocker EB, et al. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 2000;13:323–32.

- [69] Friedl P, Borgmann S, Brocker EB. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol* 2001;70:491–509.
- [70] Demotz S, Grey HM, Sette A. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 1990;249:1028–30.
- [71] Harding CV, Unanue ER. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 1990;346:574–6.
- [72] Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 2002;419:845–9.
- [73] Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2001;2:95–101.
- [74] Ngo VN, Tang HL, Cyster JG. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med* 1998;188:181–91.
- [75] Wei SH, Parker I, Miller MJ, Cahalan MD. A stochastic view of lymphocyte motility and trafficking within the lymph node. *Immunol Rev* 2003;195:136–59.
- [76] Cahalan MD, Parker I, Wei SH, Miller MJ. Real-time imaging of lymphocytes in vivo. *Curr Opin Immunol* 2003;15:372–7.
- [77] Miller MJ, Wei SH, Cahalan MD, Parker I. Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2604–9.
- [78] Mueller KL, Daniels MA, Felthausen A, Kao C, Jameson SC, Shimizu Y. Cutting edge: LFA-1 integrin-dependent T cell adhesion is regulated by both ag specificity and sensitivity. *J Immunol* 2004;173:2222–6.
- [79] Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R, Bouchard D, Beach J, Speiser DE, et al. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997;7: 549–57.

4.4. La sous-unité CD18, récepteur universel des toxines RTX

Zecchinon L., Fett T., Vanden Bergh P., Desmecht D.

LFA-1 and associated diseases: The dark side of a receptor.

Clin Applied Immunol Rev, 2006, 6, 201-216.



ELSEVIER

Clinical and Applied Immunology Reviews 6 (2006) 201–216

Clinical
and
Applied
Immunology
Reviews

LFA-1 and associated diseases: The dark side of a receptor

L. Zecchinon, MS, T. Fett, BEng, P. Vanden Bergh, DVM,
D. Desmecht, DVM, PhD*

*Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège,
FMV Sart Tilman B43, B-4000 Liège, Belgium*

Received 2 December 2005; received in revised form 26 September 2006; accepted 26 September 2006.

Abstract

Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) plays a critical role in the complex and well-orchestrated molecular interactions responsible for cell adhesion events required for normal and pathologic functions of the immune system. This review focuses on the diseases from various etiologies (genetic, bacterial, viral, neoplastic, allergic, and autoimmune) that are associated to lymphocyte function-associated antigen-1 with a tremendous impact on human and animal health. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: LFA-1; Disease; Bacteria; Virus; Allergy; Cancer

1. Introduction

Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) is a protein made of the union of the CD11a and CD18 subunits that each possesses a large extracellular domain but short transmembrane and cytoplasmic regions. The N-terminal parts of both subunits associate to form the integrin headpiece, which contains the ligand-binding site, whereas the C-terminal segments traverse the plasma membrane and mediate interactions with the cytoskeleton and with signaling proteins [1,2].

LFA-1 plays an important role in cell migration and in interactions between T cells and antigen presenting cells (APCs). However, LFA-1 is also associated to several diseases from various etiologies that exhibit a tremendous impact on human and animal health.

Abbreviations: CDT, cytolethal distending toxin; ICAM, intercellular adhesion molecule; LAD, leukocyte adhesion deficiency; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen-1; LKT, leukotoxin (from *M. haemolytica*); LTX, leukotoxin (from *A. actinomycetemcomitans*); mAb, monoclonal antibody; MIDAS, metal ion dependent adhesion site; TCR, T-cell receptor.

* Corresponding author. Tel.: +32 4 366 4075; fax: +32 4 366 4565.

E-mail address: daniel.desmecht@ulg.ac.be (D. Desmecht).

1529-1049/06/\$ — see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cair.2006.09.005

2. Diseases associated to LFA-1

2.1. Genetic diseases

2.1.1. Human leukocyte adhesion deficiency

Human leukocyte adhesion deficiency-1 is a genetic disease caused by mutations in the CD18 subunit. As the α and β subunits pair as precursors intracellularly and their transport to the cell surface is CD18 dependent, this leads to the lack of β_2 -integrin cell surface expression and hence, clinically, to recurrent severe bacterial infections and other immune deficiencies [3–10]. Transfection of the β_2 -integrin subunit complementary DNA into B lymphoblastoid cells from leukocyte adhesion deficiency (LAD) patients restored normal levels of LFA-1 to the cell surface as well as adhesion to intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 [11]. The disease has been identified in man [3,8,12,13], dog [14,15], and cattle [16] and is viewed primarily as a failure of neutrophils function as (1) they are essential first arrivals at sites of tissue injury, and (2) they rely most heavily on β_2 integrins because they lack significant levels of other integrins, contrary to monocytes and lymphocytes that are able to express $\alpha_4\beta_1$ when β_2 integrins are missing [17]. In addition, a CD18 gene-targeted mouse model has been generated, displaying a disease phenotype similar to the human form of the disease [18,19].

Most LAD-1 cases involve single point “missense” mutations; most of them are located in the β I domain, a region coded for by exons 5–9, which is highly conserved in all β subunits and that has been modeled to resemble the ligand-binding α I domain [9,17,20–22]. A second region of mutation of β_2 subunit centers on the last 2 cysteine-rich repeats coded for by exon 13, a heavily disulphide cross-linked region that is thought to provide structural rigidity for the β subunit and may influence either interdomain movement or the quaternary relationship between integrin subunits [17,22]. Rarer “nonsense” mutations can occur leading to an absence of transcription of the CD18 gene, to incorrect mRNA splicing and/or unstable mRNAs, and to truncated and often unstable proteins [8,21,22]. Two variant patients have also been described. The first one proved to be a heterozygote with one nonexpressing allele and the second allele that allowed normal expression but no β_2 integrin function due to a mutation in the metal ion dependent adhesion site motif [23]. The second variant was suspected to exhibit a mutation in a component of a critical signaling pathway leading to the activation of the β_2 integrins because no mutation was found in the CD18 gene [13].

Furthermore, a rare autosomal-recessive LAD-2 syndrome exists, which is characterized by a defect in fucosylation of glycoconjugates (such as ligands for the selectin family of adhesion molecules) caused by mutations in the gene for a GDP-fucose transporter of the Golgi [7,24–27]. LAD-2 is thus the first developmental and immune defect that is based on a malfunctioning nucleotide sugar transporter. LAD-2 patients suffer from problems with leukocytes adhesion and trafficking, severe psychomotor and growth retardation and have dysmorphic features, hypotonia, seizures, and strabismus [24,25,28,29].

Recent findings also indicate presence of a third form of LAD, a rare autosomal-recessive disease associated with severe defects in integrin activation by chemokine signals, despite normal ligand binding of leukocyte integrins. LAD III is caused by defects in G protein-coupled receptor-mediated integrin activation [10,30,31] as the small GTPase Rap1,

a key regulator of inside-out integrin activation, is abnormally regulated in LAD Epstein–Barr virus lymphocyte cells. Both constitutive and chemokine-triggered activation of Rap1 were abolished in LAD lymphocytes despite normal chemokine signaling. Nevertheless, Rap1 expression and activation by phorbol esters were intact, ruling out a LAD defect in Rap1 guanosine triphosphate loading. Thus, a defect in constitutive Rap1 activation results in an inability of ligand-occupied integrins to generate high-avidity binding to ligand under shear flow [32].

2.1.2. Bovine leukocyte adhesion deficiency

LAD has also been identified in Holstein cattle as an autosomal-recessive congenital disease characterized by recurrent bacterial infections, delayed wound healing and stunted growth, and is also associated with persistent marked neutrophilia. Affected cattle suffer from severe ulcers on oral mucous membranes, severe periodontitis, loss of teeth, chronic pneumonia, recurrent or chronic diarrhea, and die at an early age due to the infectious complications [33].

At the molecular level, 2-point mutations have been observed in the CD18 gene, 1 silent and 1 causing an aspartic acid to glycine substitution at amino acid 128 in the highly conserved extracellular β I domain, where several mutations have been found to cause human LAD [16]. The mutation has been perpetuated through selective breeding practices because it was traced back to a unique founder bull named Osborndale Ivanhoe and known as the Father of the Holstein breed through the use of artificial insemination in the 1950s and 1960s. After 5 generations, the carrier frequency for the aspartic acid to glycine substitution at amino acid 128 allele among Holstein cattle in the United States was approximately 15% among bulls and 6% among cows. Moreover, this mutation was also prevalent among Holstein cattle throughout the world, placing this disorder among the most common genetic diseases known in animal agriculture [10,16,34].

Peripheral blood leukocytes of normal, heterozygous, and homozygous for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) cows have been analyzed by flow cytometry for the intensity of their β_2 integrin expression: BLAD homozygotes revealed no or a very weak expression of the β_2 integrins and had a 10-fold and 4- to 5-fold increase in absolute number of neutrophils and monocytes, respectively, whereas the absolute number of lymphocytes remained normal, revealing that the LFA-1 expression could allow a ready identification of BLAD heterozygotes by flow cytometry [35]. Leukocytes from homozygous calves seem to upregulate alternative host defense capabilities (e.g., respiratory burst activity) to partially compensate for the lack of typical adherence-dependent host defense functions [36]. In contrast, the heterozygous BLAD genotype does not cause detectable functional differences in leukocytes, compared with those of clinically normal calves [36], and the mean fluorescence intensity of CD18 in heterozygous animals was 56–90% of that in the normal cows [35].

2.1.3. Canine leukocyte adhesion deficiency

Canine leukocyte adhesion deficiency is a fatal immunodeficiency disease found in Irish setter dogs that is very similar to LAD in humans and BLAD in cattle because it is characterized by a single missense mutation in the β I domain of the CD18 subunit that results in

very low levels of CD11/CD18 expression [10,14,15,37,38]. The mutation has been in the Irish Setter population for many generations spanning more than 2 decades [39].

The canine leukocyte adhesion deficiency is also present in a significant minority of Irish red and white setters, a related breed that has a history of interbreeding with Irish Setters and shares a common ancestry with the Irish Setter breed [39,40].

2.2. Bacterial diseases

Several studies have shown or suggest that LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$,) is centrally involved in the pathogenesis of diseases caused by repeats-in-toxin-producing Gram-negative bacteria such as *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Mannheimia haemolytica* [41].

2.2.1. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Periodontitis, the result of the response of the periodontium to the presence of certain members of the oral microbiota, is mankind's most common chronic inflammatory disease. One of its more severe form is localized aggressive periodontitis, which affects only the incisors and premolars [42]. The disease tends to afflict younger individuals and is associated with rapid destruction of the periodontal ligament and alveolar bone, which support the teeth. The main causative agent of this disease is *A. actinomycetemcomitans* [43] that produces both inflammation and damage to the extracellular matrices of ligament and bone. Although less well researched than enteric pathogens, this organism clearly packs a lot of virulence potential into its 2-Mb genome and interacts in a wide variety of ways with its cellular and extracellular host environments. The bacterium is also occasionally responsible for nonoral infections including endocarditis, bacteremia, pericarditis, septicemia, pneumonia, infectious arthritis, osteomyelitis, synovitis, skin infections, urinary tract infections, and abscesses [44]. Moreover, there is currently great interest in the possibility that periodontal diseases may be a contributing risk factor for development of cardiovascular disease [45] because *A. actinomycetemcomitans* has been detected in 18% of atherosclerotic plaque samples [46].

A number of interesting virulence factors are produced by this organism. Although many of them still await identification, leukotoxin (LTX), and the newly discovered cytolethal distending toxins (CDTs) are in the limelight. Leukotoxin is the first and most intensively studied of these toxins: it belongs to the repeats-in-toxin proteins family, so named because of the C-terminal amino acid repeats, that have channel forming activity and kill cells either by osmotic lysis or by induction of apoptosis [41,47]. The *A. actinomycetemcomitans* leukotoxin kills lymphoid and myeloid cells from human and some nonhuman primate [41], and the basis of this cell/species specificity is due to the binding to human cells via LFA-1 [48], which leads to perturbation of mitochondrial function. Indeed, after exposure to LTX, Epstein–Barr virus transformed B cells (JY cell line) exhibited the classical morphological features of apoptosis including decreased cell size, plasma membrane blebbing, selective alterations in plasma membrane permeability, and condensation of nuclear DNA. The morphologic changes were accompanied by swelling of the mitochondria, a decrease in mitochondrial transmembrane potential, hyperproduction of reactive oxygen intermediates, and release of cytochrome *c* from the intermembrane space. Subsequently, activation of the cysteine aspartate-specific proteases (caspases)-3 and -9, cleavage of the nuclear DNA repair enzyme, poly(ADP-ribose)polymerase, and internucleosomal DNA fragmentation were also

detected, indicating that perturbation of mitochondrial structure and function, in concert with activation of specific caspases, initiate the effector phase of LTX-induced apoptosis [49]. The second important virulence factor is known as the CDT produced by a small but diverse group of bacterial pathogens such as *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, and *Haemophilus ducreyi* [50]. This newly discovered toxin family has the ability to control cell cycle progression in eukaryotic cells by irreversibly blocking the G₂ phase of the cell cycle [50]. Recent studies have established that CDT is in fact a tripartite AB toxin in which CdtB is the active “A” subunit, and CdtA and CdtC constitute the heterodimeric “B” subunit required for the delivery of CdtB into the target cell [51]. CdtB has been identified as the active subunit of the CDT holotoxin which causes, through its nuclease activity, limited DNA damage, thereby triggering the DNA-damage response that ultimately results in the observed arrest of the cell cycle in G₂ [50,52]. However, it is not known what role the 2 main *A. actinomycetemcomitans* toxins play in bone resorption: the leukotoxin targets myeloid cells causing their apoptosis and could therefore affect osteoclasts and their precursors, which could inhibit osteoclastic bone resorption. Moreover, in preliminary studies, all 3 *A. actinomycetemcomitans* CDTs have been shown to stimulate bone resorption in vitro [42].

2.2.2. *Mannheimia haemolytica*

The bacterium *M. haemolytica* plays a major role as secondary pathogen in the final progression to severe pleuropneumonias in cattle, sheep, and goats. Its pathogenesis involves many predisposing agents such as viruses (Parainfluenza virus 3, Bovine Herpes virus 1, Bovine Respiratory Syncytial virus), bacteria (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*), environment (excessive temperatures, change of feed, dust...), or stress associated to weaning, dehorning, and shipping [53–57]. These factors seem to alter the upper respiratory tract epithelium allowing *M. haemolytica* to colonize it, escaping clearance, and to move from nasopharynx to lungs, leading to a broncho-alveolar kind of pneumonia, which is accompanied by high morbidity and mortality [58–60]. Pulmonary lesions are lobar, anteroventrally distributed, and are characterized by extensive infiltration of neutrophils (that fail to combat infection) [61,62] and exudation of fibrin into airways and alveoli. In these latter, multifocal areas of coagulation necrosis are observed, wrought by the cytolysis of many neutrophils and macrophages that pour a variety of toxic compounds in situ, which in turn aggravate pulmonary damage [53,55].

Several virulence factors have been described for *M. haemolytica*, the main of which being the lipopolysaccharide and the leukotoxin. The latter is cytotoxic only for ruminant leukocytes, a phenomenon that is correlated with its ability to bind and interact with the ruminant LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$), suggesting that the most widespread cattle respiratory disease, that with the most important impact on beef production worldwide, is probably due to a tiny ruminant-specific focal variation in the CD18- and/or CD11a-expressing genes [63]. The precise identification of the subunit that binds LKT appeared controversial [64–67] until the recent cloning, sequencing and characterization of the *Bos taurus* CD11a [68] give the first opportunity to express homologous and heterologous LFA-1 in vitro to definitely answer the question. As a result, recombinant expression of bovine LFA-1 has shown that LKT binds to both the CD18 and CD11a subunits [69,70] even though CD18 plays the crucial role because LKT do not bind heterologous LFA-1 made of bovine CD11a

and human CD18 [71]. In this way, comparing ruminant vs. nonruminant CD18 subunits has open the way to the identification of the precise molecular motif responsible for the species specificity of *M. haemolytica* [72], whereas apparently contradictory results were recently published, mapping the binding site for *M. haemolytica* LKT within amino acid residues 500–600 [71] or 1–291 [73], respectively, with bovine × human and bovine × murine CD18 chimeric constructs.

2.3. Viral diseases

Several cell adhesion molecules are subverted as virus receptors [74] and this may be more than coincidental. First, virus–cell and cell–cell adhesion are in principle very similar as both (1) require accessible cognate sites on the receptor, (2) involve multivalent interactions, and (3) may be facilitated by receptor redistribution to the site of adhesion. Second, binding to molecules that participate in the immune response has important consequences for the host–virus relationship [75]. In this way, several cell adhesion molecules have been shown to mediate viral budding and transfer in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection [75–77]. HIV-1 infects and kills or renders anergic CD4⁺ T-helper cells, and alter the expression of cell adhesion molecules in patients; for example, CD4⁺-lymphocyte expression of L-selectin and very late antigen-4 is down regulated, whereas ICAM-1 and LFA-1 are upregulated [78]. HIV-1 binds with its surface protein gp120 to CD4 whose expression is down regulated [79–82]. HIV-1 is also known to incorporate host-derived ICAM-1 on the viral particle surface, which can engage to LFA-1 on the T-cell surface, leading to a significant increase in viral infectivity [75,83–86]. Moreover, the ICAM-1/LFA-1 interaction plays an active role in syncytia formation (cell fusion) induced by HIV-1, which is a major cytopathic effect that may also represent an important mechanism of CD4⁺ T-cell depletion in individuals infected with HIV. Indeed, syncytia formation requires not only the interaction of CD4 on the surface of uninfected cells with gp120 expressed on HIV-infected cells but also the high affinity form of LFA-1 [87–89] and more exactly a peptide region in the N-terminal portion of CD18 (including the region between residues 200–206) that has been identified through phage-display technology [90]. To examine the role of LFA-1 expressed on target cells in HIV infection, Jurkat-derived Jbeta2.7 T-cell lines that express either wild-type LFA-1, a constitutively active mutant LFA-1, or no LFA-1 were used [91]. The presence of wild-type LFA-1 enhanced the initial processes of HIV infection, as well as the subsequent replication and transmission from cell to cell. In contrast, the constitutively active LFA-1 mutant failed to promote virus replication and spread, even though this mutant could help HIV enter cells and establish the initial infection. Consequently, LFA-1 contributes in the different stages of HIV infection and not only is LFA-1 expression important for initial HIV–cell interaction, subsequent replication, and transmission, but its activity must also be properly regulated [91]. Furthermore, it has been recently demonstrated that activation of primary human CD4⁺ T lymphocytes increases LFA-1 affinity and avidity states. Confocal analyses suggest that HIV-1 is concentrated in microdomains rich in LFA-1 clusters that also contain CD4 and CXCR4 molecules [92]. Therefore, one possible target for new Acquired Immune Deficiency Syndrome therapy is preventing the HIV from using adhesion molecules such as ICAM-1 and LFA-1 for budding and transfer processes [93].

Rhinoviruses (which cause common colds), by contrast, rather than thwarting the immune response, use it to their own ends as mucous secretions and sneezing induced by the immune response facilitate infection of other individuals. Moreover, although they have evolved more than 100 noncrossreactive variants in an attempt to evade the immune response, 90% of rhinoviruses, bind ICAM-1. If this latter has a signal transducing function on antigen presenting cells, this may be mimicked by the virus and may serve its ends by stimulating production of cytokines, which increase nasal secretions carrying the virus [75].

Furthermore, it is of considerable interest that viruses have evolved to bind to the same regions of CD4 and ICAM-1 as do their cell adhesion counter-structures. Indeed, HIV binds to the first and part of the second immunoglobulin-like domains of CD4 [75,94–96], the region that binds to major histocompatibility complex class II molecules [95]. In the same way, LFA-1 and rhinoviruses bind to overlapping but distinct regions of the first immunoglobulin-like domain of ICAM-1 [97–100]. A “canyon” on the rhinovirus surface that is too narrow to admit an antibody, has been hypothesized to be the binding site of LFA-1 [101], suggesting that rhinoviruses mimic LFA-1 in binding to the most membrane distal, and thus most accessible, site of ICAM-1 [97].

2.4. Cancer diseases

For tumor metastasis to occur through the blood and lymphatic vessel pathway, the tumor cells must first adhere to endothelial cells and thus tumor cells with high levels of cell adhesion molecules (the types of which varying with malignancy, site of metastasis, and tumor origin) are selected to form metastatic lesions [93,102]. In this way, the high expression of LFA-1 (CD11a/CD18) and ICAM-1 is associated, respectively, with lung cancer [103], pancreatic cancer, and pulmonary adenocarcinoma tumor progression [104,105], whereas gastric cancer cells and tumor cells from adenoid cystic carcinoma of the head and neck patients have lower ICAM-1 expression than normal cells, suggesting that decreased ICAM-1 expression may in turn decrease immune response mediated through LFA-1–dependent effector cell adhesion and that this escape from the immunosurveillance system may be one of the factors inducing lymph node metastasis [93,106,107].

On the other hand, recent studies have shown that high expression of the widely expressed cell surface glycoprotein CD44 in certain types of tumors is associated with the hematogenic spread of cancer cells. Indeed, cross-linking of CD44 results in a marked induction of the expression of LFA-1 and very late antigen-4 (VLA-4 or $\alpha_4\beta_1$) by exocytosis, and increases integrin-mediated adhesion to endothelial cells, resulting in the transendothelial migration of breast cancer cells [108]. Because these induced integrins promote tumor cell migration, they could be targeted by pharmacological means to cause a reduction in invasive capability and metastasis. Moreover, Jak tyrosine kinases that act downstream of LFA-1 are essential for lymphoma and metastasis and contribute in multiple ways to the induction of malignant behavior [109].

2.5. Allergic diseases

Allergic asthma is characterized by eosinophil migration in the airways, which is strictly dependent on the expression of adhesion molecules such as LFA-1 [110]. Accordingly,

eosinophils from atopic asthmatic subjects show increased expression of LFA-1, but not of Mac-1 or VLA-4. In addition, LFA-1 expression correlated positively with blood eosinophil number, while no correlations were observed between Mac-1 or very late antigen-4 (VLA-4; CD49d/CD29) expression and blood eosinophil number. Eosinophils migration through human umbilical vein was totally inhibited by preincubating eosinophils with anti-LFA-1, whereas anti-Mac-1 had no effect, suggesting that an early recruitment of blood eosinophils overexpressing LFA-1 occurs in atopic asthmatics in the first hours after allergen challenge [111,112]. Moreover, activated macrophages are present in increased numbers in the airways inflammation observed in asthma and it has been shown that expression of ICAM-1 and LFA-1 on alveolar macrophages was significantly increased in asthmatic patients. There was also a significant correlation with the percentage of cells expressing both markers in asthma, highlighting the importance of macrophages in the inflammation of asthma and suggesting that macrophage interactions with other cells play a role in this inflammation [113].

Furthermore, manipulation for inducing selective inactivation of antigen-specific Th2 cells provides a rational approach to the control of allergic inflammation [114,115] as induction of Th2 cell tolerance to a soluble antigen by blockade of the LFA-1-dependent pathway in vivo prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the tissue and antigen-specific IgE production [115,116]. Indeed, an ICAM-1/LFA-1 interaction is involved as a costimulatory signal in inducing T-cell tolerance to a soluble antigen, because in vivo pretreatment with the combination of anti-ICAM-1 monoclonal antibody (mAb), anti-LFA-1 mAb, and a soluble antigen, but not with a soluble antigen alone, induced T-cell tolerance and the subsequent inhibition of allergic inflammation [115]. This finding is consistent with the notion that the stimulation of T cells through the T-cell receptor in the absence of a costimulatory signal leads to T-cell tolerance [117,118] and that LFA-1 is a costimulatory molecule for T-cell receptor-mediated T-cell activation [119–121]. Moreover, in vivo coadministration of mAbs against LFA-1 and ICAM-1 suppresses the progression of experimental allergic encephalomyelitis in rats by preventing the infiltration of encephalitogenic cells into the central nervous system, suggesting that the administration together of mAbs against adhesion molecules including LFA-1 and ICAM-1 might provide a new immunotherapeutic approach for the treatment of multiple sclerosis [122].

Additionally, ICAM-1 expression was induced in allergic patients on epithelial cells of conjunctiva and in the nose, following allergen-specific challenge or both conjunctivitis and rhinitis due to pollen. ICAM-1 could be an activation marker on epithelial cells, or could enhance their susceptibility to bind offending cells such as eosinophils. As ICAM-1 is also a receptor for the vast majority of rhinoviruses, which are known to provoke, mainly in children, asthma attacks, allergy may be considered as a primary event leading to asthma (through rhinovirus infection) and nonspecific hyperreactivity [123]. Moreover, antibodies against ICAM-1 and LFA-1 significantly inhibit the development of the clinical and histologic signs of allergic conjunctivitis [124].

Besides, epidermal dendritic cells isolated from psoriasis or atopic dermatitis possess greatly enhanced T lymphocyte-activating properties, suggesting in psoriasis expression of surface antigens such as β_2 integrins and ICAM-1 [125].

LFA-1 plays also a significant role in the elicitation of allergic contact dermatitis reactions, as a specific anti-LFA-1 mAb injected into the ears of mice after sensitization but prior to

challenge with dinitrofluorobenzene dose dependently suppress ear swelling, which was accompanied by a reduction in dermal edema and leukocyte infiltration into the dermis [126].

2.6. Autoimmune diseases

The pathology of many autoimmune diseases such as multiple sclerosis, thyroiditis, rheumatoid arthritis, and insulin-dependent diabetes mellitus involve the infiltration of autoreactive lymphocytes to a certain organ or site in the body [93,127–129]. In this way, LFA-1 has been identified as a key contributor in the development of these disorders. Indeed, ICAM-1/LFA-1 interaction is essential for T-cell activation and for migration of T cells to target tissues. This interaction also functions, along with signal-1, as a costimulatory signal (signal-2) for T-cell activation, which is delivered by the T-cell receptor—major histocompatibility-peptide complex. Therefore, blocking ICAM-1/LFA-1 interaction can suppress T-cell activation in autoimmune diseases [93,130–132].

3. Conclusion

LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) not only plays a central role in major immune functions such as cell adhesion and migration, but is also implicated in several viral, neoplastic, allergic, and autoimmune diseases. Moreover, LFA-1 is able to engage bacterial repeats-in-toxins that induce cell death and thus promote disease progression in an “Achille’s heel mechanism.” In this way, extensive study of the interaction between LFA-1 and its natural or bacterial ligands could open new avenues in the therapeutic field.

4. Summary

LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) is a cell adhesion receptor associated to several diseases from various etiologies with a tremendous impact on human and animal health; for example, (1) genetic diseases are caused by mutations in the CD18 subunit that lead to the lack of β_2 -integrin cell surface expression and hence, to recurrent severe bacterial infections and other immune deficiencies in human, cattle, and dog, (2) LFA-1 contributes in the different stages of HIV infection, and (3) is centrally involved in the pathogenesis of diseases caused by repeats-in-toxin—producing Gram-negative bacteria such as *A. actinomycetemcomitans* and *M. haemolytica*. Moreover, the interaction between LFA-1 and its ligand ICAM-1 is implicated in the progression of (4) cancers, as well as (5) allergic, and (6) autoimmune diseases.

Acknowledgments

This study is supported by the Belgian federal services for public health and security of the food chain and environment, grant S-6107. P. Vanden Bergh is a recipient of a studentship from the “Fonds pour la formation à la Recherche dans l’Industrie et l’Agriculture,” rue d’Egmont 5, B-1000 Bruxelles.

References

- [1] Dib K. BETA 2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci* 2000;5:D438–51.

- [2] Humphries MJ, Symonds EJ, Mould AP. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:236–43.
- [3] Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150, 95 glycoproteins. *Annu Rev Med* 1987;38:175–94.
- [4] Anderson DC, Schmalsteig FC, Finegold MJ, Hughes BJ, Rothlein R, Miller LJ, et al. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* 1985;152:668–89.
- [5] Springer TA, Sastre L, Anderson DC. The LFA-1, Mac-1 leukocyte adhesion glycoprotein family and its deficiency in a heritable human disease. *Biochem Soc Trans* 1985;13:3–6.
- [6] Springer TA, Rothlein R, Anderson DC, Burakoff SJ, Krensky AM. The function of LFA-1 in cell-mediated killing and adhesion: studies on heritable LFA-1, Mac-1 deficiency and on lymphoid cell self-aggregation. *Adv Exp Med Biol* 1985;184:311–22.
- [7] Roos D, Law SK. Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:1000–4.
- [8] Kishimoto TK, Hollander N, Roberts TM, Anderson DC, Springer TA. Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150, 95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell* 1987;50:193–202.
- [9] Wardlaw AJ, Hibbs ML, Stacker SA, Springer TA. Distinct mutations in two patients with leukocyte adhesion deficiency and their functional correlates. *J Exp Med* 1990;172:335–45.
- [10] Gu YC, Bauer TR Jr, Ackermann MR, Smith CW, Kehrli ME Jr, Starost MF, et al. The genetic immunodeficiency disease, leukocyte adhesion deficiency, in humans, dogs, cattle, and mice. *Comp Med* 2004;54:363–72.
- [11] Hibbs ML, Wardlaw AJ, Stacker SA, Anderson DC, Lee A, Roberts TM, et al. Transfection of cells from patients with leukocyte adhesion deficiency with an integrin beta subunit (CD18) restores lymphocyte function-associated antigen-1 expression and function. *J Clin Invest* 1990;85:674–81.
- [12] Kishimoto TK, Springer TA. Human leukocyte adhesion deficiency: molecular basis for a defective immune response to infections of the skin. *Curr Probl Dermatol* 1989;18:106–15.
- [13] Kuijpers TW, Van Lier RA, Hamann D, de Boer M, Thung LY, Weening RS, et al. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J Clin Invest* 1997;100:1725–33.
- [14] Kijas JM, Bauer TR Jr, Gafvert S, Marklund S, Trowald-Wigh G, Johannisson A, et al. A missense mutation in the beta-2 integrin gene (ITGB2) causes canine leukocyte adhesion deficiency. *Genomics* 1999;61:101–7.
- [15] Giger U, Boxer LA, Simpson PJ, Lucchesi BR, Todd RF 3rd. Deficiency of leukocyte surface glycoproteins Mo1, LFA-1, and Leu M5 in a dog with recurrent bacterial infections: an animal model. *Blood* 1987;69:1622–30.
- [16] Shuster DE, Kehrli ME Jr, Ackermann MR, Gilbert RO. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9225–9.
- [17] Hogg N, Bates PA. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol* 2000;19:211–22.
- [18] Wilson RW, Ballantyne CM, Smith CW, Montgomery C, Bradley A, O'Brien WE, et al. Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. *J Immunol* 1993;151:1571–8.
- [19] Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K, van Nood N, Munoz F, Grabbe S, et al. Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* 1998;188:119–31.
- [20] Weitzman JB, Wells CE, Wright AH, Clark PA, Law SK. The gene organisation of the human beta 2 integrin subunit (CD18). *FEBS Lett* 1991;294:97–103.
- [21] Back AL, Kwok WW, Hickstein DD. Identification of two molecular defects in a child with leukocyte adherence deficiency. *J Biol Chem* 1992;267:5482–7.
- [22] Arnaout MA, Dana N, Gupta SK, Tenen DG, Fathallah DM. Point mutations impairing cell surface expression of the common beta subunit (CD18) in a patient with leukocyte adhesion molecule (Leu-CAM) deficiency. *J Clin Invest* 1990;85:977–81.

- [23] Hogg N, Stewart MP, Scarth SL, Newton R, Shaw JM, Law SK, et al. A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional beta2 integrins Mac-1 and LFA-1. *J Clin Invest* 1999;103:97–106.
- [24] Karsan A, Cornejo CJ, Winn RK, Schwartz BR, Way W, Lannir N, et al. Leukocyte adhesion deficiency type II is a generalized defect of de novo GDP-fucose biosynthesis. Endothelial cell fucosylation is not required for neutrophil rolling on human nonlymphoid endothelium. *J Clin Invest* 1998;101:2438–45.
- [25] Wild MK, Luhn K, Marquardt T, Vestweber D. Leukocyte adhesion deficiency II: therapy and genetic defect. *Cells Tissues Organs* 2002;172:161–73.
- [26] Luhn K, Wild MK, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R, Vestweber D. The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nat Genet* 2001;28:69–72.
- [27] Sturla L, Rampal R, Haltiwanger RS, Fruscione F, Etzioni A, Tonetti M. Differential terminal fucosylation of N-linked glycans versus protein O-fucosylation in leukocyte adhesion deficiency type II (CDG IIc). *J Biol Chem* 2003;278:26727–33.
- [28] Frydman M, Etzioni A, Eidlitz-Markus T, Avidor I, Varsano I, Shechter Y, et al. Rambam-Hasharon syndrome of psychomotor retardation, short stature, defective neutrophil motility, and Bombay phenotype. *Am J Med Genet* 1992;44:297–302.
- [29] Etzioni A, Tonetti M. Leukocyte adhesion deficiency II—from A to almost Z. *Immunol Rev* 2000;178:138–47.
- [30] Alon R, Aker M, Feigelson S, Sokolovsky-Eisenberg M, Staunton DE, Cinamon G, et al. A novel genetic leukocyte adhesion deficiency in subsecond triggering of integrin avidity by endothelial chemokines results in impaired leukocyte arrest on vascular endothelium under shear flow. *Blood* 2003;101:4437–45.
- [31] Alon R, Etzioni A. LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. *Trends Immunol* 2003;24:561–6.
- [32] Kinashi T, Aker M, Sokolovsky-Eisenberg M, Grabovsky V, Tanaka C, Shamri R, et al. LAD-III, a leukocyte adhesion deficiency syndrome associated with defective Rap1 activation and impaired stabilization of integrin bonds. *Blood* 2004;103:1033–6.
- [33] Nagahata H. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. *J Vet Med Sci* 2004;66:1475–82.
- [34] Nagahata H, Miura T, Tagaki K, Ohtake M, Noda H, Yasuda T, et al. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. *J Vet Med Sci* 1997;59:233–8.
- [35] Cox E, Mast J, MacHugh N, Schwenger B, Goddeeris BM. Expression of beta 2 integrins on blood leukocytes of cows with or without bovine leukocyte adhesion deficiency. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;58:249–63.
- [36] Sipes KM, Edens HA, Kehrli ME Jr, Miettinen HM, Cutler JE, Jutila MA, et al. Analysis of surface antigen expression and host defense function in leukocytes from calves heterozygous or homozygous for bovine leukocyte adhesion deficiency. *Am J Vet Res* 1999;60:1255–61.
- [37] Jobling AI, Ryan J, Augusteyn RC. The frequency of the canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) allele within the Irish Setter population of Australia. *Aust Vet J* 2003;81:763–5.
- [38] Bauer TR Jr, Gu YC, Creevy KE, Tuschong LM, Embree L, Holland SM, et al. Leukocyte adhesion deficiency in children and Irish setter dogs. *Pediatr Res* 2004;55:363–7.
- [39] Foureman P, Whiteley M, Giger U. Canine leukocyte adhesion deficiency: presence of the Cys36Ser beta-2 integrin mutation in an affected US Irish Setter cross-breed dog and in US Irish Red and White Setters. *J Vet Intern Med* 2002;16:518–23.
- [40] Debenham SL, Millington A, Kijast J, Andersson L, Binns M. Canine leukocyte adhesion deficiency in Irish red and white setters. *J Small Anim Pract* 2002;43:74–5.
- [41] Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* 1999;7:356–61.
- [42] Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:29–55.
- [43] Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000 1999;20:82–121.

- [44] van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol* 2000 1999;20:122–35.
- [45] Genco R, Offenbacher S, Beck J. Periodontal disease and cardiovascular disease: epidemiology and possible mechanisms. *J Am Dent Assoc* 2002;133(Suppl):14S–22S.
- [46] Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000;71:1554–60.
- [47] Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* 2002;84:337–56.
- [48] Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green CL, Rosenbloom J, Korostoff J, et al. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem* 1997;272:30463–9.
- [49] Korostoff J, Yamaguchi N, Miller M, Kieba I, Lally ET. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. *Microb Pathog* 2000;29:267–78.
- [50] Pickett CL, Whitehouse CA. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol* 1999;7:292–7.
- [51] Lara-Tejero M, Galan JE. Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol* 2002;10:147–52.
- [52] De Rycke J, Oswald E. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? *FEMS Microbiol Lett* 2001;203:141–8.
- [53] Dungworth D. The respiratory system. In: Jubb K, Kennedy P, Palmer N, editors. *Pathology of Domestic Animals*. San Diego: Academic Press; 1992. p. 589–663.
- [54] Lopez A. Respiratory system, thoracic cavity and pleura. In: McGavin M, Carlton W, Zachary J, editors. *Thomson's Special Veterinary Pathology*. St. Louis, Missouri: Mosby; 2001. p. 125–96.
- [55] Yates WD. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med* 1982;46:225–63.
- [56] Yates WD, Jericho KW, Doige CE. Effect of bacterial dose on pneumonia induced by aerosol exposure of calves to bovine herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res* 1983;44:238–43.
- [57] Yates WD, Jericho KW, Doige CE. Effect of viral dose on experimental pneumonia caused by aerosol exposure of calves to bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*. *Can J Comp Med* 1983;47:57–63.
- [58] Edwards AJ. Respiratory diseases of feedlot cattle in the central USA. *Bovine Pract* 1996;5–7.
- [59] Jensen R, Pierson RE, Braddy PM, Saari DA, Lauerman LH, England JJ, et al. Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1976;169:500–6.
- [60] Vogel JG, Parrott C. Mortality survey in feedyards: the incidence of death from digestive, respiratory and other causes in feedyards on the Great plains. *Comp Cont Educ Prac Vet* 1994;227–34.
- [61] Slocombe RF, Malark J, Ingersoll R, Derksen FJ, Robinson NE. Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am J Vet Res* 1985;46:2253–8.
- [62] Walker RD, Hopkins FM, Schultz TW, McCracken MD, Moore RN. Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res* 1985;46:2429–33.
- [63] Zecchinon L, Fett T, Desmecht D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res* 2005;36:133–56.
- [64] Ambagala TC, Ambagala AP, Srikumaran S. The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to beta(2) integrins on bovine leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 1999;179:161–7.
- [65] Jeyaseelan S, Hsuan SL, Kannan MS, Walcheck B, Wang JF, Kehrli ME, et al. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. *Infect Immun* 2000;68:72–9.
- [66] Deshpande MS, Ambagala TC, Ambagala AP, Kehrli ME Jr, Srikumaran S. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis. *Infect Immun* 2002;70:5058–64.
- [67] Li J, Clinkensbeard KD, Ritchey JW. Bovine CD18 identified as a species specific receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet Microbiol* 1999;67:91–7.

- [68] Fett T, Zecchinon L, Baise E, Desmecht D. The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA: molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene* 2004;325:97–101.
- [69] Thumbikat P, Dileepan T, Kannan MS, Maheswaran SK. Characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin interaction with bovine alveolar macrophage beta2 integrins. *Vet Res* 2005;36:771–86.
- [70] Dileepan T, Thumbikat P, Walcheck B, Kannan MS, Maheswaran SK. Recombinant expression of bovine LFA-1 and characterization of its role as a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Microb Pathog* 2005;38:249–57.
- [71] Dileepan T, Kannan MS, Walcheck B, Thumbikat P, Maheswaran SK. Mapping of the binding site for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin within bovine CD18. *Infect Immun* 2005;73:5233–7.
- [72] Zecchinon L, Fett T, Baise E, Desmecht D. Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*. *Mol Membr Biol* 2004;21:289–95.
- [73] Gopinath RS, Ambagala TC, Deshpande MS, Donis RO, Srikumaran S. *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin binding domain lies within amino acids 1 to 291 of bovine CD18. *Infect Immun* 2005;73:6179–82.
- [74] White JM, Littman DR. Viral receptors of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 1989;56:725–8.
- [75] Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425–34.
- [76] Nordoy I, Aukrust P, Muller F, Froland SS. Abnormal levels of circulating adhesion molecules in HIV-1 infection with characteristic alterations in opportunistic infections. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;81:16–21.
- [77] Shrikant P, Benos DJ, Tang LP, Benveniste EN. HIV glycoprotein 120 enhances intercellular adhesion molecule-1 gene expression in glial cells. Involvement of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and protein kinase C signaling pathways. *J Immunol* 1996;156:1307–14.
- [78] Park SW, Royal W 3rd, Semba RD, Wiegand GW, Griffin DE. Expression of adhesion molecules and CD28 on T lymphocytes during human immunodeficiency virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:583–7.
- [79] Sattentau QJ, Clapham PR, Weiss RA, Beverley PC, Montagnier L, Alhalabi MF, et al. The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *AIDS* 1988;2:101–5.
- [80] Sattentau QJ, Weiss RA. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* 1988;52:631–3.
- [81] Sattentau QJ. The role of the CD4 antigen in HIV infection and immune pathogenesis. *AIDS* 1988;2(Suppl 1):S11–6.
- [82] Weiss RA, Clapham PR, McClure MO, McKeating JA, McKnight A, Dalgleish AG, et al. Human immunodeficiency viruses: neutralization and receptors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1988;1:536–41.
- [83] Fortin JF, Cantin R, Tremblay MJ. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *J Virol* 1998;72:2105–12.
- [84] Beausejour Y, Tremblay MJ. Susceptibility of HIV type 1 to the fusion inhibitor T-20 is reduced on insertion of host intercellular adhesion molecule 1 in the virus membrane. *J Infect Dis* 2004;190:894–902.
- [85] Giguere JF, Bounou S, Paquette JS, Madrenas J, Tremblay MJ. Insertion of host-derived costimulatory molecules CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) into human immunodeficiency virus type 1 affects the virus life cycle. *J Virol* 2004;78:6222–32.
- [86] Bounou S, Giguere JF, Cantin R, Gilbert C, Imbeault M, Martin G, et al. The importance of virus-associated host ICAM-1 in human immunodeficiency virus type 1 dissemination depends on the cellular context. *FASEB J* 2004;18:1294–6.
- [87] Hildreth JE, Orentas RJ. Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation. *Science* 1989;244:1075–8.
- [88] Pantaleo G, Butini L, Graziosi C, Poli G, Schnittman SM, Greenhouse JJ, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) infection in CD4+ T lymphocytes genetically deficient in LFA-1: LFA-1 is required for HIV-mediated cell fusion but not for viral transmission. *J Exp Med* 1991;173:511–4.

- [89] Barbeau B, Fortin JF, Genois N, Tremblay MJ. Modulation of human immunodeficiency virus type 1-induced syncytium formation by the conformational state of LFA-1 determined by a new luciferase-based syncytium quantitative assay. *J Virol* 1998;72:7125–36.
- [90] Poloni F, Puddu P, Moretti F, Flego M, Romagnoli G, Tombesi M, et al. Identification of a LFA-1 region involved in the HIV-1-induced syncytia formation through phage-display technology. *Eur J Immunol* 2001;31:57–63.
- [91] Hioe CE, Chien PC Jr, Lu C, Springer TA, Wang XH, Bandres J, et al. LFA-1 expression on target cells promotes human immunodeficiency virus type 1 infection and transmission. *J Virol* 2001;75:1077–82.
- [92] Tardif MR, Tremblay MJ. Regulation of LFA-1 activity through cytoskeleton remodeling and signaling components modulates the efficiency of HIV type-1 entry in activated CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2005;175:926–35.
- [93] Anderson ME, Siahaan TJ. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides* 2003;24:487–501.
- [94] Landau NR, Warton M, Littman DR. The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* 1988;334:159–62.
- [95] Clayton LK, Sieh M, Pious DA, Reinherz EL. Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 gp120 binding. *Nature* 1989;339:548–51.
- [96] Peterson A, Seed B. Genetic analysis of monoclonal antibody and HIV binding sites on the human lymphocyte antigen CD4. *Cell* 1988;54:65–72.
- [97] Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* 1990;61:243–54.
- [98] Bella J, Rossmann MG. Review: rhinoviruses and their ICAM receptors. *J Struct Biol* 1999;128:69–74.
- [99] Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG. The structure of the two amino-terminal domains of human intercellular adhesion molecule-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor. *Virus Res* 1999;62:107–17.
- [100] Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4140–5.
- [101] Rossmann MG. The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J Biol Chem* 1989;264:14587–90.
- [102] Koga H, Naito S, Nakashima M, Hasegawa S, Watanabe T, Kumazawa J. A flow cytometric analysis of the expression of adhesion molecules on human renal cell carcinoma cells with different metastatic potentials. *Eur Urol* 1997;31:86–91.
- [103] Izycka A, Jablonska E, Izycki T, Chyczewska E. Expression of adhesion molecules LFA-1 and L-selectin on PMN and level of soluble sE-selectin and sL-selectin in the serum of patients with small cell lung cancer. *Pneumonol Alergol Pol* 2002;70:403–8.
- [104] Jiang Z, Woda BA, Savas L, Fraire AE. Expression of ICAM-1, VCAM-1, and LFA-1 in adenocarcinoma of the lung with observations on the expression of these adhesion molecules in non-neoplastic lung tissue. *Mod Pathol* 1998;11:1189–92.
- [105] Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Widmaier U, Oohara T, Beger HG. Overexpression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in pancreatic adenocarcinoma in comparison with normal pancreas. *Pancreas* 1997;14:181–6.
- [106] Shirai A, Furukawa M, Yoshizaki T. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 2003;113:1955–60.
- [107] Fujihara T, Sawada T, Hirakawa K, Chung YS, Yashiro M, Inoue T, et al. Establishment of lymph node metastatic model for human gastric cancer in nude mice and analysis of factors associated with metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:389–98.
- [108] Wang HS, Hung Y, Su CH, Peng ST, Guo YJ, Lai MC, et al. CD44 cross-linking induces integrin-mediated adhesion and transendothelial migration in breast cancer cell line by up-regulation of LFA-1 (alpha Lbeta2) and VLA-4 (alpha4beta1). *Exp Cell Res* 2005;304:116–26.

- [109] Opdam FJ, Kamp M, de Bruijn R, Roos E. Jak kinase activity is required for lymphoma invasion and metastasis. *Oncogene* 2004;23:6647–53.
- [110] Walsh GM, Hartnell A, Wardlaw AJ, Kurihara K, Sanderson CJ, Kay AB. IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. *Immunology* 1990;71:258–65.
- [111] Lantero S, Spallarossa D, Silvestri M, Sabatini F, Scarso L, Crimi E, et al. In allergic asthma experimental exposure to allergens is associated with depletion of blood eosinophils overexpressing LFA-1. *Allergy* 2002;57:1036–43.
- [112] Lantero S, Alessandri G, Spallarossa D, Scarso L, Rossi GA. LFA-1 expression by blood eosinophils is increased in atopic asthmatic children and is involved in eosinophil locomotion. *Eur Respir J* 1998;12:1094–8.
- [113] Chanez P, Vignola AM, Lacoste P, Michel FB, Godard P, Bousquet J. Increased expression of adhesion molecules (ICAM-1 and LFA-1) on alveolar macrophages from asthmatic patients. *Allergy* 1993;48:576–80.
- [114] Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145–73.
- [115] Iwamoto I, Nakao A. Induction of Th2 cell tolerance to a soluble antigen by blockade of the LFA-1-dependent pathway prevents allergic inflammation. *Immunol Res* 1995;14:263–70.
- [116] Nakao A, Nakajima H, Tomioka H, Nishimura T, Iwamoto I. Induction of T cell tolerance by pretreatment with anti-ICAM-1 and anti-lymphocyte function-associated antigen-1 antibodies prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. *J Immunol* 1994;153:5819–25.
- [117] Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989;7:445–80.
- [118] Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990;248:1349–56.
- [119] Siu G, Hedrick SM, Brian AA. Isolation of the murine intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene. ICAM-1 enhances antigen-specific T cell activation. *J Immunol* 1989;143:3813–20.
- [120] Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 1990;144:4579–86.
- [121] Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 1992;148:1985–92.
- [122] Kobayashi Y, Kawai K, Honda H, Tomida S, Niimi N, Tamatani T, et al. Antibodies against leukocyte function-associated antigen-1 and against intercellular adhesion molecule-1 together suppress the progression of experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol* 1995;164:295–305.
- [123] Canonica GW, Ciprandi G, Pesce GP, Buscaglia S, Paolieri F, Bagnasco M. ICAM-1 on epithelial cells in allergic subjects: a hallmark of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:99–102.
- [124] Whitcup SM, Chan CC, Kozhich AT, Magone MT. Blocking ICAM-1 (CD54) and LFA-1 (CD11a) inhibits experimental allergic conjunctivitis. *Clin Immunol* 1999;93:107–13.
- [125] McGregor JM, Barker JN, Ross EL, MacDonald DM. Epidermal dendritic cells in psoriasis possess a phenotype associated with antigen presentation: in situ expression of beta 2-integrins. *J Am Acad Dermatol* 1992;27:383–8.
- [126] Kondo S, Kono T, Brown WR, Pastore S, McKenzie RC, Sauder DN. Lymphocyte function-associated antigen-1 is required for maximum elicitation of allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol* 1994;131:354–9.
- [127] Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996;85:299–302.
- [128] Steinman L. A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2253–6.
- [129] Hersmann GH, Kriegsmann J, Simon J, Huttich C, Brauer R. Expression of cell adhesion molecules and cytokines in murine antigen-induced arthritis. *Cell Adhes Commun* 1998;6:69–82.

- [130] Kevil CG, Hicks MJ, He X, Zhang J, Ballantyne CM, Raman C, et al. Loss of LFA-1, but not Mac-1, protects MRL/MpJ-Fas(lpr) mice from autoimmune disease. *Am J Pathol* 2004;165:609–16.
- [131] Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev* 2002;22:146–67.
- [132] Moriyama H, Yokono K, Amano K, Nagata M, Hasegawa Y, Okamoto N, et al. Induction of tolerance in murine autoimmune diabetes by transient blockade of leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 pathway. *J Immunol* 1996;157:3737–43.

4.5. La pathogénie de la mannheimiose

Fett T., Zecchinon L., Vanden Bergh P., Desmecht D.

La mannheimiose :

d'une liaison (moléculaire) fatale à une des principales maladies d'élevage des ruminants.

Ann Med Vet, 2009, 152, 31-53.

FORMATION CONTINUE - ARTICLES DE SYNTHÈSE

La mannheimiose : d'une liaison (moléculaire) fatale à une des principales maladies d'élevage des ruminants

FETT T.[£], ZECCHINON L.[£], VANDEN BERGH P., DESMECHT D.[£] Ont contribué de manière équivalente au travail

Département de Morphologie et Pathologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, 20 Boulevard de Colonster, Bâtiment B43, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Prof. D. Desmecht

Email : daniel.desmecht@ulg.ac.be

RESUME

Les pneumonies bactériennes constituent un problème majeur dans l'élevage et l'engraissement des bovins, avec des répercussions très élevées en termes de morbidité et de mortalité. Parmi les différentes causes biologiques recensées, *Mannheimia haemolytica* tient le haut de l'affiche puisqu'elle est connue comme agent pathogène compliquant principal, voire systématique.

Une de ses particularités est qu'elle ne déclenche de pneumonie broncho-alvéolaire fibrino-hémorragique que chez les ruminants. Les lésions observées résultent d'une nécrose en masse des neutrophiles et macrophages et du relargage de leurs différents constituants. Au niveau moléculaire, cette spécificité trouve son origine dans l'intimité de la liaison entre la leucotoxine, le facteur de virulence majeur de la bactérie, et la sous-unité CD18 des récepteurs de surface leucocytaires β_2 -intégrines.

La revue décrit cette liaison et ses conséquences aux niveaux macroscopique et microscopique, avant de faire le point sur les dernières avancées de la recherche et d'ébaucher quelques perspectives thérapeutiques.

1. INTRODUCTION

1.1. Contexte

Si l'Homme a rapidement compris qu'il était plus rentable pour lui de se livrer à des activités d'élevage plutôt que de chasse, il s'est cependant rendu compte au fil du temps qu'une bonne santé des populations animales de rente, si elle était un gage de qualité et de lucrativité, n'était pas chose aisée. L'abattage sanitaire, la quarantaine, la restriction des importations, la vaccination et les traitements médicamenteux ont donc depuis toujours œuvré en vue, sinon d'une éradication, au moins d'un contrôle des maladies rencontrées. Dans le même ordre d'idées, l'administration, à grande échelle, de substances antibiotiques permet de lutter contre les agents pathogènes qui trouvent dans les conditions d'élevage concentrationnaires une niche de choix extrêmement propice à la contagion.

Ces pratiques séculaires présentent malheureusement des inconvénients

majeurs dont la prise de conscience est pourtant relativement récente : tout d'abord, la pression de sélection appliquée par l'Homme envers les animaux d'élevage s'exerce unilatéralement en faveur des critères relatifs aux productions alors que les bovins n'ont jamais été soumis à des pressions d'infection plus agressives qu'aujourd'hui. Ensuite, il est maintenant unanimement reconnu que l'administration à grande échelle de substances médicamenteuses en élevage bovin pose non seulement le délicat problème de leur rémanence ou de celle de leurs résidus dans les produits de consommation mais également celui de l'impact des antibiotiques, clairement établi, sur l'émergence de maladies dues à la prépondérance de souches multirésistantes (Ferber, 2000 ; Angulo *et al.*, 2004 ; Molbak, 2004). Cette situation est particulièrement préoccupante dans notre pays puisque des études publiées récemment démontrent que la Belgique fait partie des six pays européens qui consomment le plus d'an-

tibiotiques (Goossens *et al.*, 2005 ; Ferech *et al.*, 2006 ; van de Sande-Bruinsma *et al.*, 2008).

Le secteur des productions animales s'oriente donc de plus en plus d'une part vers une meilleure connaissance des maladies prédominantes et, d'autre part, vers la sélection d'animaux plus résistants à celles-ci. Du point de vue sociétal, l'intérêt est multiple puisque se donner les moyens de renoncer à injecter systématiquement des antibiotiques, des anti-inflammatoires et des bronchodilatateurs dès lors que des bovins manifestent des signes cliniques ne peut qu'aller dans le sens (i) d'une diminution du risque d'émergence de bactéries multirésistantes pathogènes (notamment pour l'Homme), (ii) d'une plus-value de la qualité de la viande en termes de contenu en résidus et (iii) d'une amélioration du bien-être et de la santé des animaux (iv) sans aucun impact négatif sur la rentabilité des exploitations, ni sur le prix de la viande à l'étal.

1.2. Les pneumonies des bovins

Diminuer l'importance des maladies bovines est donc devenu une priorité absolue, puisque l'on sait que ce sont les coûts liés aux maladies qui ont l'impact le plus important sur la rentabilité des fermes et ce, indépendamment du cours du marché (Gardner *et al.*, 1996). Ces coûts sont, sans la moindre équivoque, surtout causés par les maladies respiratoires dont l'incidence chez les veaux est de 25 % durant la première année. Les mâles sont plus touchés que les femelles, à la fois durant les périodes de présevrage et d'engraissement (Martin, 1981 ; Muggli-Cockett *et al.*, 1992 ; Griffin *et al.*, 2000 ; Speer *et al.*, 2001).

Parmi les maladies respiratoires, ce sont les pneumonies qui exercent, de loin, l'impact le plus flagrant : quelles que soient les conditions, elles sont responsables d'environ 75 % des maladies diagnostiquées (Jensen *et al.*, 1976 ; Roth, 1986 ; Edwards, 1996). Sur le plan de la morbidité, les taux moyens varient entre 15 et 45 % (Kelly, 1986) et sur celui de la létalité, les pneumonies sont directement incriminées dans 45 à 55 % des cas de maladie respiratoire (Perino, 1992 ; Vogel et Parrott, 1994 ; Edwards, 1996). D'un autre côté, la mise en œuvre des traitements médicamenteux censés guérir les maladies respiratoires génère approximativement 8 % des coûts de production totaux (Martin, 1981 ; Griffin *et al.*, 1995 ; Griffin, 1997), sans tenir compte des pertes encourues du fait de performances zootechniques (gain quotidien moyen, indice de consommation et production laitière) moindres. Par ailleurs, la race Blanc Bleu Belge, numéro un chez nous, se distingue des autres races bovines par des capacités pulmonaires et cardiaques largement inférieures à celles des autres bovins (Lekeux *et al.*, 1994). Ces déficits tant anatomiques que fonctionnels en font des animaux moins résistants en cas de maladie respiratoire avec une morbidité associée de 36 % (Bureau *et al.*, 2001). De plus, la même enquête démontre que le taux de mortalité associé aux maladies respiratoires pendant la première année de vie vaut 2,1 % en spéculation Blanc Bleu Belge alors qu'il n'est que de 1,4 % dans les autres races (Muggli-Cockett *et al.*, 1992 ; Bureau *et al.*, 2001).

Les principaux agents biologiques responsables des pneumonies des bovins

incluent (i) le nématode *Dictyocaulus viviparus*, (ii) les virus BHV-1 (bovine herpesvirus-1), RSV (respiratory syncytial virus), Pi (parainfluenza)-3, BVD-MD (bovine viral diarrhoea-mucosal disease), adénovirus et coronavirus et (iii) les bactéries *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni* et *Arcanobacterium pyogenes* (Dungworth, 1992 ; Lopez, 2001). Ces auteurs s'accordent cependant pour dire que, quelle que soit la cause initiale de l'atteinte pulmonaire (environnementale, virale, bactérienne ou parasitaire), c'est *M. haemolytica* que l'on retrouve le plus systématiquement comme agent compliquant. Tout se passe comme si les facteurs environnementaux et les agents microbiens « faisaient le lit » de *M. haemolytica* dans les poumons, cette dernière « faisant à son tour le lit » d'autres bactéries au premier rang desquelles on retrouve *P. multocida* et *A. pyogenes*.

L'utilisation d'antibiotiques à grande échelle en prophylaxie, métaphylaxie ou stimulation de croissance a favorisé l'émergence de souches de *M. haemolytica* résistantes à une large gamme d'antimicrobiens comme les β -lactames, les tétracyclines, les sulfonamides et les aminoglycosides (Watts *et al.*, 1994 ; Martel *et al.*, 1995 ; Hormansdorfer et Bauer, 1996 ; Caprioli *et al.*, 2000 ; Kehrenberg *et al.*, 2001). La plupart des gènes de résistance, dont certains ont pu être clonés et séquencés (Highlander, 2001), sont associés aux éléments génétiques mobiles et peuvent donc être aisément échangés entre bactéries (Kehrenberg *et al.*, 2001).

En résumé, diminuer l'impact de la mannheimiose tout en réduisant l'administration massive d'antibiotiques est une priorité tant du point de vue économique que de ceux de la santé publique et du bien-être animal.

2. LA MANNHEIMIOSE

2.1. *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica est un coccobacille à gram négatif, faiblement hémolytique, dont la taxonomie complète est : super-royaume des bactéries ; phylum des protéobactéries ; classe des gammaprotéobactéries ; ordre des pasteurellales ; famille des *pasteurellaceae* ; genre *Mannheimia*. Elle changea, depuis sa découverte

en 1885 par Théodore Kitt, plusieurs fois « d'identité » : baptisée *Bacterium bipolare multocidum* (Kitt, 1885), on la connut ensuite un certain temps sous le nom de *Pasteurella bovisseptica* (Jones, 1921) avant d'être renommée *Pasteurella haemolytica* en 1932 (Newson, 1932) et classifiée en deux biotypes, A et T, sur base de leur capacité à fermenter l'arabinose et le thréhalose, respectivement (Smith, 1961). Treize sérotypes A et quatre sérotypes T furent identifiés (Younan et Fodor, 1995), ces derniers étant reclassifiés en tant que *Pasteurella threhalosi* en 1990 (Bingham *et al.*, 1990 ; Sneath et Stevens, 1990). Neuf ans plus tard, des études basées sur des hybridations ADN-ADN et du séquençage de l'ARN 16S ont conduit à renommer les sérotypes A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16 et A17 en tant que *Mannheimia haemolytica* (en hommage au biologiste allemand Walter Mannheim dont les recherches ont significativement contribué à la connaissance de la taxonomie de la famille des *pasteurellaceae*) alors que le dernier sérotype A11 devenait *Mannheimia glucosida* (Younan et Fodor, 1995 ; Angen *et al.*, 1999).

Des douze sérotypes décrits, A1 et A2 prévalent de par le monde. A1 est connu comme l'agent causal majeur de la mannheimiose bovine, aussi connue sous le nom de pasteurellose ou fièvre des transports (*shipping fever*), même si d'autres sérotypes comme A6, A7, A9, A11 et A12 peuvent aussi être isolés (Quirie *et al.*, 1986). A1 et A2 sont tous deux capables de coloniser le tractus respiratoire supérieur des bêtes bovine et ovine mais sont souvent spécifiques. Ainsi, les bovins sains sont fréquemment porteurs du sérotype A2 dans leur tractus respiratoire supérieur mais sous l'effet d'un stress ou d'une coinfection, A1 remplace rapidement A2 en tant que sérotype principal (Frank et Smith, 1983), probablement suite à un transfert horizontal à partir d'animaux infectés (Highlander, 2001). Le sérotype A6 serait quant à lui en prévalence croissante au Royaume-Uni (Donachie, 1998) et aux Etats-Unis (Purdy *et al.*, 1997 ; Al-Ghamdi *et al.*, 2000) avec environ 30 % des souches sérotypées. Néanmoins, sur base des profils des lipopolysaccharides et des protéines de la membrane externe de chaque sérotype, il a été conclu que, excepté la nature de leurs capsules, les sérotypes A1 et A6 étaient extrêmement

similaires (Davies et Donachie, 1996 ; Morton *et al.*, 1996).

Les bases génétiques de la variation clonale entre les sérotypes n'ont pas encore été étudiées, même si la séquence complète d'une souche A1 a été publiée par le *Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center* (Highlander et Weinstock, 2004).

2.2. Pathogénie

La pathogénie des pneumonies à *M. haemolytica* fait intervenir différents paramètres comme des virus (*bovine parainfluenza virus 3*, *bovine herpes virus 1* et *bovine respiratory syncytial virus*), des bactéries (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* et *Arcanobacterium pyogenes*), l'environnement (charge élevée en poussières, changements d'alimentation, températures excessives...), l'administration de glucocorticoïdes, le creux immunitaire ou encore le stress associé au sevrage, à l'écorne ou au transport, qui prédisposent l'animal (Yates, 1982 ; Dungworth, 1992 ; Lopez, 2001). Ces différents facteurs semblent altérer l'épithélium du tractus respiratoire supérieur de manière à permettre à la bactérie de le coloniser et de migrer du nasopharynx aux poumons où elle cause une pneumonie dite « de type bronchoalvéolaire » qui s'accompagne d'une morbidité et d'une mortalité élevées (Jensen *et al.*, 1976 ; Vogel et Parrott, 1994 ; Edwards, 1996).

Les signes cliniques sont variables quant à leur intensité, de frustes à très sévères, mais quelques faits caractéristiques peuvent être mentionnés : il y a toujours de la dépression et de l'anorexie, de la fièvre jusqu'à 42°C, une augmentation de la fréquence cardiaque, une perte de poids substantielle et une rhinite résultant en une décharge nasale mucopurulente ou un mucus sec et encroûté. Un larmolement accru et une toux sont souvent présents. La fréquence respiratoire augmente dans les tous premiers stades, suivie par une dyspnée de sévérité telle qu'elle cause une respiration buccale et des grognements respiratoires dans certains cas. L'auscultation révèle des sons bronchiaux et vésiculaires accrus antéro-ventralement, se muant en râles d'abord humides puis secs. On peut aussi entendre des frictions pleurales. Les veaux peuvent se tenir avec les coudes en abduction et le cou étendu

(orthopnée). Certains animaux peuvent souffrir de diarrhée (Yates, 1982 ; Zecchinon *et al.*, 2005).

Macroscopiquement, ce type de pneumonie est caractérisé par une consolidation avec hépatisations rouge et grise des parties antéro-ventrales des poumons, parfois accompagnées de zones de pleurésie fibrineuse (figure 1) (Zecchinon *et al.*, 2005).

Microscopiquement, de larges zones de nécrose, ceinturées par des amas de neutrophiles dégénérants (ou pyocytes) en quantités très importantes, constituent la signature de *M. haemolytica* (figure 2). L'ampleur de cette nécrose est en fait concomitante à la cytolyse d'un nombre anormalement élevé de neutrophiles et macrophages

qui, via le déversement d'une multitude de composés toxiques (enzymes, histamine, prostaglandines...) *in situ*, aggravent les lésions pulmonaires (Yates, 1982 ; Slocombe *et al.*, 1985 ; Dungworth, 1992 ; Lopez, 2001 ; Zecchinon *et al.*, 2005).

Sur un plan biologique plus général, il faut constater que *M. haemolytica* n'est pas responsable de pneumonies chez les animaux non ruminants, ce qui suggère l'existence d'une virulence qui s'exprime spécifiquement envers ces derniers.

2.3. La leucotoxine

Plusieurs facteurs de virulence sont décrits pour *M. haemolytica* (Confer

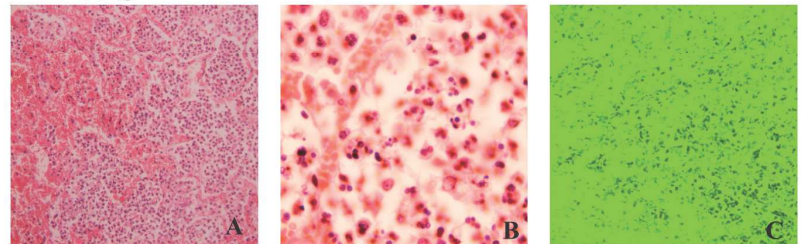
Figure 1 : Pneumonie nécrosante multifocale et pleurésie fibrineuse viscérale où *Mannheimia haemolytica* a pu être mise en évidence.

Larges plages de nécrose observées sur un lobe diaphragmatique gauche coupé transversalement dans son tiers proximal.



Figures 2 : Lésions histologiques pulmonaires d'une infection à *Mannheimia haemolytica* (hématoxyline-éosine).

On constate une infiltration massive dans les alvéoles de leucocytes (a) (grossissement 200 x), s'avérant être des polymorphonucléaires neutrophiles (b) (grossissement 400 x) qui vont rapidement se nécroser en masse (c) (grossissement 200 x).



et al., 1990 ; Whiteley *et al.*, 1992 ; Tatum *et al.*, 1998 ; Jeyaseelan *et al.*, 2002) : ils incluent la capsule qui joue un rôle important dans l'adhérence et l'invasion, les protéines de la membrane externe qui provoquent la réponse immunitaire, des adhésines qui sont impliquées dans la colonisation, une neuraminidase qui réduit la viscosité du mucus et permet une approche plus « intime » de la bactérie à la surface des cellules épithéliales, le lipopolysaccharide (LPS) et la leucotoxine (LktA).

Celle-ci est une protéine de 102 kDa sécrétée en phase logarithmique de croissance et appartient à la famille des toxines dites RTX (*repeats in toxin*), lesquelles comprennent toutes, près de leur extrémité N-terminale, des régions hautement conservées consistant en répétitions d'un nonapeptide de type L/I/V/F-X-GG-X-G-N/D-D-X (avec X = n'importe quel résidu), dont le nombre varie de 6 (comme la LktA) à 41 (Lo, 1990 ; Coote, 1992 ; Jeyaseelan *et al.*, 2002 ; Mena-Rojas *et al.*, 2004). Ces toxines comptent dans leurs rangs outre la LktA (Lilie *et al.*, 2000), les toxines de *M. glucosida* (Davies *et al.*, 2001 ; Davies *et al.*, 2002), *M. ruminantis* (GenBank AY425280), *M. varigena* (AY425279), *M. granulomatis* (AY425278) et *Pasteurella trehalosi* (Davies *et al.*, 2001 ; Davies *et al.*, 2002) ; la PILktA de souches *M. haemolytica-like* (Chang *et al.*, 1993a) ; les toxines ApxIA, -IIA, et -IIIA d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Frey *et al.*, 1991 ; Chang *et al.*, 1993b ; Schaller *et al.*, 1999) ; les variants ApxIA and -IIA d'*A. suis* (AshA) (Burrows *et al.*, 1992 ; Kamp *et al.*, 1994 ; Schaller *et al.*, 2001 ; Satran et Nedbalcova, 2002), ApxIIA and -IIIA d'*A. rossii* (Schaller *et al.*, 2000), ApxIA d'*A. lignieresii* (Kolodrubetz *et al.*, 1989 ; Burrows et Lo, 1992 ; Satran et Nedbalcova, 2002), et ApxIIA d'*A. porcitisillarum* (Kuhnert *et al.*, 2005) ; AqxA d'*Actinobacillus equuli* (Berthoud *et al.*, 2002) ; PaxA de *Pasteurella aerogenes* (Kuhnert *et al.*, 2000) ; LtxA d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Kolodrubetz *et al.*, 1989 ; Lally *et al.*, 1989) ; MbxA de *Moraxella bovis* (Hess et Angelos, 2006), *M. bovoculi* et *M. ovis* (Angelos *et al.*, 2007) ; KkxA de *Kingella kingae* (Kehl-Fie et St Geme, 2007) ; HlyA et EhxA d'*Escherichia coli* uropathogènes et EHEC, respectivement (Welch *et al.*, 1983 ; Felmlee *et al.*, 1985) ; et

CyaA de *Bordetella bronchiseptica* et *B. pertussis* (Glaser *et al.*, 1988).

La LktA de *M. haemolytica* partage avec deux de ces toxines (la LtxA d'*A. actinomycetemcomitans* et l'ApxIIIA d'*A. pleuropneumoniae*) un ensemble de caractéristiques biologiques : tout d'abord, chacune d'elles est sécrétée par une bactérie qui n'est pathogène que pour une espèce donnée, causant respectivement une pneumonie broncho-alvéolaire fibrino-hémorragique chez les ruminants, une périodontite agressive chez l'Homme et une pleuropneumonie fibrino-hémorragique chez le porc. Dans les trois cas, les lésions sont caractérisées par des aires de nécrose de coagulation multifocales engendrées par la présence d'un nombre exceptionnellement élevé de neutrophiles et macrophages dégénérés ou en nécrose. Enfin, les trois toxines sont reconnues comme facteurs de virulence majeurs puisque (i) leur administration, sous formes native ou recombinante purifiées, conduit aux signes cliniques et au développement de lésions sévères (Kamp *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1998b ; Ambagala *et al.*, 1999 ; Sun *et al.*, 1999b ; Jeyaseelan *et al.*, 2000 ; Sun *et al.*, 2000 ; Cudd *et al.*, 2001 ; Jeyaseelan *et al.*, 2001a ; Deshpande *et al.*, 2002 ; Davies et Baillie, 2003) alors que (ii) les bactéries ne produisant plus les toxines perdent leur pouvoir pathogène (Tatum *et al.*, 1998). Ainsi, l'inactivation de la LktA par *gene knock-out* cause une inactivation partielle de virulence et ne déclenche presque plus de lésions pulmonaires bien que les souches sauvages et mutantes soient tout aussi capables de coloniser le tractus respiratoire supérieur des veaux (Highlander *et al.*, 2000).

Il est de plus intéressant de constater que si la leucotoxine doit son nom à la spécificité de liaison qu'elle exhibe vis-à-vis des leucocytes de plusieurs espèces de mammifères, elle n'induit la mort cellulaire que lorsqu'elle est fixée à ceux des ruminants (Kaehler *et al.*, 1980 ; Shewen et Wilkie, 1982 ; Silflow et Foreyt, 1994 ; Dassanayake *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2007 ; Fett *et al.*, 2008), suggérant que la spécificité d'interaction entre la LktA et les leucocytes des ruminants pourrait être tenue pour responsable de la cytotoxicité spécifique de *M. haemolytica* envers ces derniers.

3. LES CIBLES CHEZ L'HÔTE

3.1. Neutrophiles et macrophages

La pathogénie de la mannheimiose implique les neutrophiles et les macrophages dont le rôle central a été démontré expérimentalement par plusieurs équipes indépendantes ; ainsi, une exposition par aérosol à *M. haemolytica* induit, chez des veaux, une infiltration rapide de neutrophiles dans les poumons et une augmentation significative du *ratio* neutrophile/macrophage dans le liquide de lavage pulmonaire (Walker *et al.*, 1985). Parmi les leucocytes, les macrophages sont plus résistants que les neutrophiles aux effets lytiques de la LktA, et les macrophages alvéolaires des bêtes adultes sont plus résistants que ceux des veaux de moins de 16 semaines (O'Brien et Duffus, 1987).

Par ailleurs, lorsque des bovins sont déplétés de leurs propres neutrophiles circulants par un traitement à l'hydroxyurée, la pneumonie est moins sévère et moins étendue que chez l'animal normalement pourvu en neutrophiles (Slocombe *et al.*, 1985 ; Breider *et al.*, 1988 ; Weiss *et al.*, 1991). Ces données *a priori* paradoxales suggèrent que les neutrophiles endossent un rôle proactif dans la progression de la mannheimiose.

3.2. Rôle primordial du CD18

Une autre observation intéressante a permis de poser une hypothèse quant à la nature de l'interaction entre la LktA et les neutrophiles des ruminants : la LktA n'induit pas de cytolysse des leucocytes si ces derniers sont prélevés chez des animaux *BLAD* (acronyme désignant la maladie génétique baptisée *bovine leukocyte adhesion deficiency*) (Jeyaseelan *et al.*, 2000). Ce résultat est de nouveau paradoxal parce que ces animaux souffrent d'un déficit fonctionnel de leurs polymorphonucléaires neutrophiles qui ralentit voire abolit leur capacité à s'extraire du torrent sanguin par diapédèse, ce qui cause l'apparition récurrente de maladies. Au niveau moléculaire, le phénotype *BLAD* est causé par la mutation D128G dans la sous-unité β (ou CD18) des β_2 -intégrines (Shuster *et al.*, 1992) qui entraîne une diminution très importante de leur expression en surface (Cox *et al.*, 1997).

Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui jouent un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire bien

Tableau I : La famille des intégrines (tableau non exhaustif)

Sous-unités	Ligands et contre-récepteurs	Expression
β_1	α_1	Collagènes, laminine
	α_2	Collagènes, laminine
	α_3	Fibronectine, laminine, collagènes
	α_4	Fibronectine (V25), VCAM-1
	α_5	Fibronectine
	α_6	Laminine
	α_7	Laminine
	α_8	?
	α_v	Vibronectine, fibronectine (?)
β_2 (CD18)	α_L ou CD11a	ICAM-1, ICAM-2
	α_M ou CD11b	Composant C3b du complément (inactivé), fibrinogène, facteur X, ICAM-1
	α_X ou CD11c	Fibrinogène, composant C3b du complément (inactivé) ?
	CD11d	?
β_3	α_{IIb}	Fibrinogène, fibronectine, facteur de von Willebrand, vitronectine, thrombospondine
	α_v	Vitronectine, fibrinogène, fibronectine, facteur de von Willebrand, thrombospondine, fibronectine, ostéopontine, collagènes
β_4	α_6	Laminine ?
β_5	α_v	Vitronectine
β_6	α_v	Fibronectine
β_7	α_4	Fibronectine (V25), VCAM-1
	α_{TEL}	?
β_8	α_v	?

B : lymphocyte B ; B* : lymphocyte B activé ; CL : cellule de Langerhans ; F : fibroblaste ; L : leucocyte ; LAK : cellule NK activée par l'IL-2 ; Mo : monocyte ; N : neutrophile ; NK : natural killer ; pl : plaquettes ; T : lymphocyte T ; T* : lymphocyte T activé ; Tc : lymphocyte T cytotoxique.

que leur reconnaissance en tant que récepteurs de surface ne date que de 1987 (Hynes, 1987). Depuis, elles ont été étudiées intensivement (plus de 40000 articles à ce jour) et semblent impliquées dans de nombreux processus biologiques, physiologiques et pathologiques. Toutes les intégrines sont des hétérodimères dont les sous-unités α et β sont associées non covalentiellement et possèdent chacune un domaine extracellulaire volumineux et des domaines transmembranaire et cytoplasmique plutôt courts (Hynes, 1992). Une vingtaine d'intégrines sont actuellement décrites ; elles sont classées en huit sous-familles selon leur sous-unité β commune (tableau I), par exemple la famille des β_2 -intégrines dont la sous-unité β_2 est le CD18.

Celle-ci s'associe avec les sous-unités α CD11a-d, formant ainsi les hété-

rodimères CD11a/CD18 ou LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) qui est quantitativement majoritaire, CD11b/CD18 ou Mac-1 (*Macrophage antigen-1*) ou encore CR3 (*Complement receptor 3*), CD11c/CD18 ou CR4 (*Complement receptor 4*) et CD11d/CD18 (Berman *et al.*, 2003). Les récepteurs CD11a-d/CD18 sont présents à la surface de tous les leucocytes et médient une adhésion de haute affinité à une grande variété de types cellulaires qui expriment un ou plusieurs de leurs ligands, à savoir les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM)-1 à -5 et la *Junctional adhesion molecule (JAM)*-A. Cette sous-famille d'intégrines est ainsi responsable de la fixation des leucocytes à la surface des endothéliums, une des étapes préliminaires qui permet leur déplacement vers les lieux de la réaction inflammatoire (Bailey *et*

al., 1995 ; Gahmberg, 1997 ; Tian *et al.*, 1997 ; Zecchinon *et al.*, 2006a ; Zecchinon *et al.*, 2006b).

Dans le contexte de l'interaction de la LktA avec les β_2 -intégrines des ruminants, plusieurs études ont montré que l'effet cytotoxique de la LktA est atténué, voire supprimé, lorsque des leucocytes bovins sont incubés préalablement avec des anticorps dirigés contre les sous-unités CD11a ou CD18 du LFA-1 (Ambagala *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1999 ; Jeyaseelan *et al.*, 2000). L'identification précise de la sous-unité liant la LktA a toutefois longtemps été controversée, le CD18 (Wang *et al.*, 1998a ; Ambagala *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1999) et le CD11a (Jeyaseelan *et al.*, 2000) ayant chacun leurs partisans. Aujourd'hui cependant, les auteurs s'accordent sur le rôle primordial du CD18 et ce, grâce à quel-

ques avancées significatives ; ainsi, le professeur Srikumaran et son équipe ont tout d'abord mis en évidence par immunomarquage et séquençage N-terminal que la leucotoxine se fixait sur les différentes β_2 -intégrines contenues dans des lysats de neutrophiles bovins et qu'une préincubation de ces neutrophiles avec un anticorps monoclonal spécifique du CD18 réduisait les effets cytotoxiques (Ambagala *et al.*, 1999). Ils ont ensuite élégamment démontré que le CD18 était, selon leurs propres termes, nécessaire et suffisant pour médier la cytolyse de leucocytes en rendant une lignée murine, réputée résistante à la leucotoxine, sensible à cette dernière en la transfectant de manière stable avec l'ADN complémentaire encodant pour le CD18 bovin, lequel se retrouvait exprimé en surface associé au CD11a murin (Deshpande *et al.*, 2002). Ils ont par ailleurs, tout récemment, réitéré l'expérience avec le CD18 ovin (*Ovis aries* et *Ovis canadensis*) et obtenu des résultats similaires (Dassanayake *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2007). De plus, ils observent une forte corrélation entre le degré d'expression en surface du CD18 bovin (PMNs bovins>lymphocytes bovins~lignée transfectée) et le degré de cytolyse de ces cellules, ce qui s'explique par le fait que si les lymphocytes et la lignée transfectée n'expriment que le LFA-1 bovin et murin/bovin, respectivement, les PMNs quant à eux arborent toutes les β_2 -intégrines ; on sait en effet que la LktA se lie également au CD18 du Mac-1 bovin ou ovin (Lawrence *et al.*, 2008). De son côté, l'équipe du professeur Maheswaran a montré que si la leucotoxine se liait à la fois au CD18 du LFA-1 et du Mac-1 (Thumbikat *et al.*, 2005) ainsi qu'au LFA-1 porcin (Jeyaseelan *et al.*, 2000), les événements postérieurs à la liaison comme l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire et la phosphorylation de la queue cytoplasmique du CD18 n'étaient observés qu'avec le LFA-1 bovin (Jeyaseelan *et al.*, 2000 ; Jeyaseelan *et al.*, 2001a ; Thumbikat *et al.*, 2005). D'autre part, des expérimentations avec des inhibiteurs du *I domain* du CD11a et des anticorps dirigés contre le *I-like domain* du CD18 donnent à penser que la leucotoxine se lie au CD18 (mais pas au niveau du *I-like domain* bien que celui-ci jouerait un rôle critique dans la signalisation induite par la leucotoxine conduisant à l'activation) et qu'à hautes concentrations en toxine, cette liaison serait suf-

fisante pour provoquer l'oligomérisation toxinique, la formation de pores, un influx de calcium et des dommages cellulaires menant à la cytolyse via toutes les β_2 -intégrines (Thumbikat *et al.*, 2005). La leucotoxine interagirait également avec le *I domain* du CD11a, mais ni avec le CD11b ou le CD11c (Jeyaseelan *et al.*, 2000), pour initier une cascade de signalisation conduisant à l'activation cellulaire (Yoo *et al.*, 1995) et à l'apoptose (Stevens et Czuprynski, 1996), événements qui prendraient toute leur ampleur lorsque la leucotoxine se trouverait en plus faible concentration (Thumbikat *et al.*, 2005). Par ailleurs, la cotransfection de la lignée d'origine humaine K-562, n'exprimant naturellement aucune β_2 -intégrine, par les CD11a et CD18 bovins, conduit à l'expression en surface de l'hétérodimère, à la liaison de la leucotoxine sur le LFA-1 ainsi que sur le CD11a et le CD18 seuls (par déplétion de lysats cellulaires par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps spécifiques), à la phosphorylation de la tyrosine de la queue cytoplasmique du CD18, à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et à la cytolyse (Dileepan *et al.*, 2005b). Enfin, la cotransfection de cette même lignée avec les ADN complémentaires encodant pour les CD11a bovin et CD18 humain conduit à l'expression en surface de l'hétérodimère mais pas à la fixation de la leucotoxine (Dileepan *et al.*, 2005a).

En conclusion, toutes ces données suggèrent dans leur ensemble que c'est l'interaction entre la LktA et la sous-unité CD18 des β_2 -intégrines des ruminants qui est responsable de la spécificité de la virulence de la LktA, et donc de *M. haemolytica*, envers les leucocytes de ces derniers. Plus précisément, (i) la leucotoxine doit nécessairement se fixer sur la sous-unité CD18 des β_2 -intégrines des ruminants et du porc à un domaine autre que le *I-like domain*, (ii) cette liaison serait, à haute concentration en toxine, suffisante pour induire la formation de pores et la nécrose et (iii) la liaison avec le CD11a des ruminants (via le *I domain*) ou de la souris permettrait, à plus faibles concentrations en toxine, de par une interaction avec le *I-like domain* du CD18, le déclenchement des cascades d'activation cellulaire conduisant à l'apoptose. Dès lors, diminuer voire supprimer l'impact de la mannheimiose en spéculation

bovine revient à identifier le site de liaison précis de la leucotoxine sur le CD18, de manière (i) à ouvrir la voie à la sélection d'animaux naturellement résistants et/ou (ii) à mettre en œuvre une stratégie médicamenteuse spécifique pour augmenter la productivité et le bien-être animal tout en réduisant les apports massifs d'antibiotiques, anti-inflammatoires et bronchodilatateurs. Signalons par ailleurs que le même raisonnement peut être appliqué à LtxA et ApxIIIa qui se lient également au CD18 des leucocytes de leur espèce-cible (Li *et al.*, 1999 ; Dileepan *et al.*, 2007a ; Vanden Bergh *et al.*, soumis).

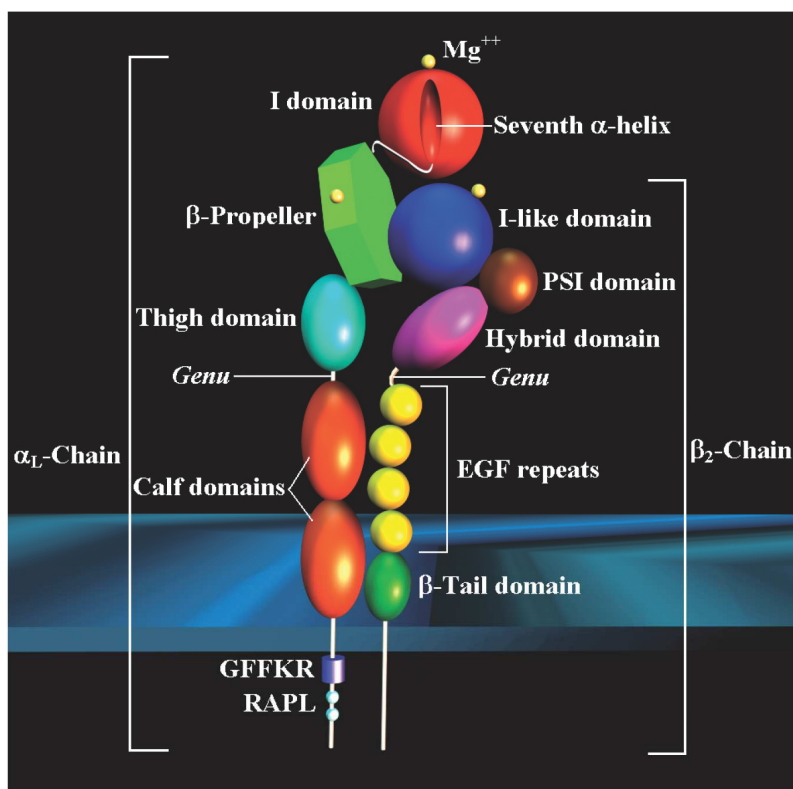
3.3. Motif(s) moléculaire(s) du CD18 interagissant avec la LktA

Des résultats contradictoires

Récemment, deux équipes visant à identifier le site précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18 bovin publièrent des résultats apparemment contradictoires. Elles ont tablé sur l'ingénierie de lignées cellulaires stables exprimant des LFA-1 chimériques murin/bovin (Gopinath *et al.*, 2005) ou humain/bovin (Dileepan *et al.*, 2005a) mais selon deux principes opposés ; soit rendre sensible une lignée cellulaire qui ne l'est pas en intégrant des fragments du CD18 bovin dans un LFA-1 murin (Gopinath *et al.*, 2005), soit rendre résistante une lignée sensible en intégrant des fragments du CD18 humain dans un LFA-1 bovin (Dileepan *et al.*, 2005a). Le site de liaison de la leucotoxine entraînant les effets biologiques fut ainsi annoncé soit dans les 291 premiers résidus du CD18 (Gopinath *et al.*, 2005), c'est-à-dire dans la portion extracellulaire contenant le domaine *PSI* (*plexin-semaphorin-integrin*), le site d'adhésion dépendant des ions métalliques (*MIDAS*, *metal ion-dependent adhesion site*) et une partie du *I-like domain*, sur lequel la toxine n'était pas sensée se lier selon des expérimentations réalisées par l'équipe concurrente avec des anticorps dirigés contre ce domaine (Thumbikat *et al.*, 2005), soit entre les résidus 500 et 600 de la portion extracellulaire du CD18, correspondant aux domaines *EGF* (*epidermal growth factor*) -2 à -4 (Dileepan *et al.*, 2005a), puis plus précisément entre les résidus 541-581 correspondant au domaine *EGF*-3 (Dileepan *et al.*, 2007b) (figure 3).

Figure 3 : Représentation schématique des domaines structuraux du récepteur LFA-1 (α L β 2 ou CD11a/CD18).

Les sous-unités CD11a et CD18 possèdent chacune un large domaine extracellulaire et de courtes portions transmembranaire et cytoplasmique. Chez le CD11a, le *I domain* (rouge) lie les ICAMs sous la dépendance du magnésium (jaune clair) au niveau du *Metal Ion Dependent Adhesion Site (MIDAS)*. La septième hélice α du *I domain* relie celui-ci à la β -propeller region (vert mat) qui se prolonge par le *thigh domain* (turquoise) puis les *calf domains* (orange). Chez le CD18, le *domain plexin-semaphorin-integrin (PSI)*, coloré en chocolat, est relié par des ponts disulfures à l'*hybrid domain* (mauve) au centre de la région qui relie le *I-like domain* aux quatre répétitions *EGF-like* (jaune). Le quatrième module s'étend par le β -tail domain (vert brillant) au travers de la membrane. Le motif charnière (*GFFKR*) et le site *RAPL* sont indiqués respectivement par un cylindre mauve clair et de petites sphères bleues claires. Les sites de liaison des cations bivalents sont représentés par de petites sphères jaunes. Le schéma a été réalisé avec le programme Ulead Cool 3D 3.5. Les différents domaines ne sont pas strictement dessinés à l'échelle.



Chacune de ces approches a bien entendu ses inconvénients puisque le remplacement d'un domaine conférant ou abolissant la liaison de la toxine ne signifie pas automatiquement que celle-ci s'y lie ou non. En effet, la modification de tel ou tel domaine peut entraîner des modifications de structure (par exemple lors du repliement de la protéine) qui, indirectement, modifient le site de liaison. Ainsi, si le *I domain* du CD11a se replie avant l'association avec le CD18, il n'en est pas de même pour le β -propeller qui reste non replié dans les 12 heu-

res suivant la synthèse du CD11a seul, suggérant que le *I domain* et le β -propeller se replient indépendamment l'un de l'autre et que le second arbore une interface avec le CD18 (Huang et Springer, 1997). Des résultats similaires sont d'ailleurs observés avec le CD11b (Lu *et al.*, 1998).

Ensuite, notons que les CD18 bovin et humain sont constitués de 769 résidus alors que le murin comprend deux résidus supplémentaires, un au niveau du peptide signal et l'autre étant le 7^e résidu après le dernier domaine *EGF*. Du point de vue des identités, le CD18

présente un pourcentage de 83 % par rapport à son homologue humain et 81 % par rapport à son homologue murin. *A priori*, ces différences ne devraient donc pas rendre compte des différents résultats obtenus. Par contre, il est intéressant de noter que le protocole de purification de la leucotoxine diffère pour les deux expérimentations ; la protéine ayant été purifiée par chromatographie d'immunoaffinité (Gopinath *et al.*, 2005) ou par extraction après électrophorèse en conditions dénaturantes (Dileepan *et al.*, 2005a), ce qui peut sembler *a priori* problématique pour des études de liaison.

Par ailleurs, une approche plus « chirurgicale » découlant du relevé des 16 sites individuels pour lesquels un résidu « A » était systématiquement conservé chez les ruminants alors qu'il était systématiquement remplacé par un résidu « B » chez l'homme, la souris et le chien (Zecchinon *et al.*, 2004) et consistant à construire les CD18 bovins mutants correspondants, n'a donné aucun résultat probant, c'est-à-dire qu'aucun d'eux n'est, à titre individuel, responsable de la spécificité d'espèces qu'exhibe la LktA vis-à-vis des CD18 des ruminants (Zecchinon *et al.*, soumis). Il est toutefois possible que plusieurs sites, voire plusieurs domaines, soient nécessaires à l'induction d'une toxicité spécifique.

Des chimères construites cette fois en remplaçant uniquement des régions bien définies du CD18 bovin (le domaine *PSI*, le *I-like domain* ou les domaines *EGFs*) par leur correspondant humain, de manière à perturber le moins possible la structure tridimensionnelle de l'intégrine résultante et ce, contrairement aux équipes précédentes qui ont divisé le CD18 de manière plus aléatoire, ont confirmé le rôle des domaines *EGFs* (Zecchinon *et al.*, soumis). Il a aussi été montré que les modules *EGF*-2, 3, et 4 du CD18 humain étaient critiques pour l'induction de la leucolyse par la LtxA d'*A. actinomycetemcomitans* (Dileepan *et al.*, 2007a).

Une nouvelle théorie

Par contre, le remplacement du module *EGF*-3 bovin par celui d'une autre espèce insensible que l'Homme, à savoir le porc, ne permet pas d'abolir la sensibilité à la leucotoxine des transfectants générés (Zecchinon *et al.*, soumis). La substitution du

module *EGF-3* du CD18 bovin par celui d'un CD18 LktA-résistant ne résulte donc pas automatiquement en la suppression de la signalisation *outside-in* déclenchée par la liaison de la LktA et conduisant aux phénomènes d'apoptose/nécrose, ce qui confirme cette fois les données observées avec la chimère bovine/murine B291M (module *EGF-3* d'origine murine) pour laquelle un effet cytotoxique est induit par la LktA (Gopinath *et al.*, 2005) alors qu'il est clairement établi que les leucocytes murins sont insensibles (Deshpande *et al.*, 2002).

Pris dans leur ensemble, toutes ces données suggèrent que l'effet cytotoxique de la LktA envers les leucocytes bovins serait en fait médié par deux sous-domaines distincts du CD18, le premier, encore à découvrir, présent entre les résidus 1 à 291 (Gopinath *et al.*, 2005) et le second étant le domaine *EGF-3*. Ainsi, si l'on accepte cette hypothèse, toutes les données publiées à ce jour concordent : les CD18 murin et porcine possèderaient un domaine *EGF* fonctionnel, mais pas le CD18 humain. Par contre, celui-ci arborerait le bon motif N-terminal, contrairement aux CD18 murin et porcine. Les CD18 des ruminants contiendraient bien évidemment les deux motifs. De plus, il a été montré que ni l'acylation de la LktA ni ses 344 résidus N-terminaux ne sont requis pour la liaison au CD18 alors qu'ils sont essentiels pour l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire, la génération des espèces réactives de l'oxygène, la production d'interleukine-8 et la cytolyse des cellules-cibles (Thumbikat *et al.*, 2003), plaidant ainsi pour la présence de deux motifs sur la toxine également. Ce n'est donc pas parce qu'une toxine RTX se lie à un récepteur LFA-1 qu'il se produit inexorablement un effet cytotoxique ; il se pourrait ainsi que ces toxines doivent passer par une première étape de liaison aspécifique du récepteur suivie d'une seconde plus spécifique, indispensable à l'induction des mécanismes cytopathogènes.

Des sucres responsables ?

Enfin, un rôle éventuel des glycosylations du CD18 n'est pas à exclure. Les deux sous-unités des β_2 -intégrines sont en effet des glycoprotéines de type I qui sont soumises à plusieurs processus de modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique rugueux (dont la glycosylation) indis-

pensables à l'expression en surface d'un récepteur fonctionnel. Plusieurs sites potentiels de *N*-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) ont été révélés par des programmes bioinformatiques au sein de l'hétérodimère (Zecchinon *et al.*, 2006a) et des analyses structurales ont montré que le LFA-1 humain contenait des taux élevés de chaînes oligosaccharidiques complexes de haut poids moléculaire et mannosylées sans qu'il y ait un type de glycosylation spécifique d'une sous-unité (Asada *et al.*, 1991). Ces glycosylations jouent un rôle dans l'interaction des toxines RTX avec leur récepteur β_2 -intégrine puisque le traitement de cellules sensibles par des glycosidases ou la tunicamycine (un antibiotique qui bloque la *N*-glycosylation des protéines néosynthétisées) diminue la liaison de la toxine CyaA de *B. pertussis* à ces cellules et réduit également son activité cytotoxique adénylate cyclase (Morova *et al.*, 2008). De plus, certains saccharides libres (*N,N'*-diacétylchitobiose, *N,N',N''*-triacétylchitotriose, D-mannose, *N*-acétyllactosamine, acide sialique) sont capables d'inhiber la liaison de cette toxine à la surface cellulaire (Morova *et al.*, 2008). Enfin, le traitement par ces glycosidases diminue également le taux de mortalité cellulaire induit par les toxines LtxA et HlyA (Morova *et al.*, 2008).

Lorsqu'on étudie la structure de ces fonctions saccharidiques, on peut les comparer aux branches d'un arbre ; plus on s'éloigne du tronc, plus les branches se ramifient et plus la composition en sucre peut varier. Ce phénomène est appelé la microhétérogénéité (Varki et Sharon, 2008) : à un site d'attachement d'un glycan sur une protéine donnée, synthétisée par un type cellulaire, un éventail de variations peut être trouvé dans la structure de ces chaînes. Celle-ci peut varier considérablement d'un site de glycosylation à un autre, d'une glycoprotéine à une autre et d'un type cellulaire à un autre (Varki et Sharon, 2008). Ainsi, une protéine donnée, codée par un seul gène, peut exister sous plusieurs « glycoformes » constituant chacune une espèce moléculaire distincte. Cette microhétérogénéité s'expliquerait par la rapidité avec laquelle de multiples réactions de glycosylations et déglycosylations, séquentielles et partiellement compétitives, se déroulent dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi au cours du proces-

sus de synthèse de la glycoprotéine.

S'il est reconnu que le *core* des principales classes de glycanes tend à être conservé au travers des espèces (Varki et Sharon, 2008), il y a cependant une diversité considérable au niveau des chaînes externes, même entre espèces relativement proches. Le rôle de cette variabilité n'est pas clair, elle pourrait être une sorte de générateur de diversité, modulant les fonctions de reconnaissance endogènes et/ou permettant d'échapper à l'infection par des microbes et parasites pouvant se lier avec une haute spécificité à certaines structures des glycanes (Varki et Sharon, 2008). Les branches variables terminales ne devraient donc pas constituer un site de liaison spécifique de la LktA, du fait même de la diversité qui doit y être générée puisque pour un même site de *N*-glycosylation sur deux récepteurs LFA-1 exprimés par un même leucocyte, les branches saccharidiques terminales peuvent varier. Etant donné que (i) ces glycosylations interviennent dans l'adhésion de certaines toxines RTX sur la β_2 -intégrine (Morova *et al.*, 2008) et (ii) que la leucotoxine semble pouvoir se lier au LFA-1 de différentes espèces sans induire nécessairement l'effet toxique (Sun *et al.*, 1999b ; Jeyaseelan *et al.*, 2001a ; Jeyaseelan *et al.*, 2001b), il se pourrait que la LktA parvienne à se lier au *core* d'un (de) *N*-glycane(s) (hautement conservé entre espèces), peut-être en association avec des résidus peptidiques également conservés. Toutefois, dans le cadre des β_2 -intégrines, certains indices nous permettent d'émettre l'hypothèse que les structures saccharidiques pourraient être dans leur ensemble bien conservées d'une espèce à l'autre du fait (i) de la conservation des sites de *N*-glycosylations sur le LFA-1 (Varki et Sharon, 2008), (ii) du rôle prépondérant de ces *N*-glycanes dans les processus physiologiques centraux faisant intervenir l'adhésion β_2 -intégrine/ligand (Becker et Lowe, 1999 ; Zhao *et al.*, 2008) et (iii) de la capacité des leucocytes d'une espèce à s'extravaser dans une xénogreffe et à la détruire mettant donc en bon rapport les β_2 -intégrines glycosylées d'une espèce avec les ligands endothéliaux d'une autre espèce (Ohta *et al.*, 1998 ; Hauzenberger *et al.*, 2000 ; Holgersson *et al.*, 2002). L'interaction induisant l'action cytotoxique spécifique doit donc sans doute être uniquement attribuée à des résidus pep-

tidiques spécifiques du CD18 des ruminants.

3.4. *Liaison et mort cellulaire*

Plusieurs modes d'action sont proposés pour expliquer les effets délétères consécutifs à la liaison de la LktA sur le CD18.

Radeaux lipidiques et internalisation

En conditions physiologiques, lorsque le récepteur LFA-1 entre en contact avec son ligand, il se produit une activation de la calpaïne qui va cliver la taline, protéine qui accroche le LFA-1 au cytosquelette par la queue cytoplasmique du CD18. Cette libération du récepteur permet alors le regroupement des LFA-1 dans les radeaux lipidiques (RL), des régions particulières de la membrane cytoplasmique riches en cholestérol et en sphingolipides dans lesquelles se regroupent certaines protéines membranaires dans un but fonctionnel (Luo *et al.*, 2008). Il a été montré récemment qu'ils jouaient un rôle actif dans l'effet induit par la LktA et la LtxA puisqu'(i) une diminution de l'effet cytotoxique de ces dernières est observée lorsque les leucocytes sont incubés avec un chélateur du cholestérol membranaire (Fong *et al.*, 2006 ; Atapattu et Czuprynski, 2007), (ii) une préincubation avec la filipine qui séquestre les RL, inhibe l'effet de la LktA (Atapattu et Czuprynski, 2007) et que (iii) leur reconstitution par l'apport de cholestérol exogène restaure l'effet cytopathogène de ces toxines (Fong *et al.*, 2006 ; Atapattu et Czuprynski, 2007).

Fong et ses collaborateurs ont aussi montré que la LtxA et son récepteur LFA-1 humain se retrouvaient en plus grosse quantité dans la fraction des RL des cellules exposées à la toxine et en ont conclu que deux conditions semblent nécessaires à la lyse cellulaire induite par la LtxA : (i) la liaison de la toxine au LFA-1 (des cellules déficientes en LFA-1 n'accumulent pas la toxine dans les radeaux et ne sont pas lysées) et (ii) la migration et le regroupement de ces complexes dans les RL (Fong *et al.*, 2006). Par contre, si la cytochalasine (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine) permet bien le regroupement des LFA-1 humains dans les radeaux lipidiques, en présence ou l'absence de la LtxA, elle inhibe néanmoins l'effet de la LtxA, indiquant que le regroupement des

LFA-1 par eux-mêmes ne suffit pas pour reproduire le mécanisme d'action cytotoxique et qu'il doit être médié par l'actine (Fong *et al.*, 2006).

Cependant, des résultats différents (mais les deux équipes n'ont pas étudié tout à fait de la même façon l'incorporation potentielle des récepteurs LFA-1 dans les RL) ont été obtenus par Atapattu et son équipe concernant l'incorporation du LFA-1 bovin dans les RL de leucocytes exposés à la LktA puisque le récepteur ne se retrouvait pas dans les RL des cellules, qu'elles soient ou non traitées avec la LktA. Celle-ci ne se retrouverait associée que pour ~4 % au LFA-1, pour ~47 % aux RL, et le restant (~49 %) ne serait ni associé au LFA-1 ni aux fractions lipidiques des radeaux (Atapattu et Czuprynski, 2007). Dès lors, ils suggèrent que la liaison au LFA-1 pourrait être une étape intermédiaire, temporaire mais indispensable, d'un processus qui aboutirait ensuite à la dissociation du complexe toxine/récepteur et à son transfert à un autre partenaire, trouvé dans les radeaux lipidiques. Par ailleurs, la LktA est internalisée au cours du processus cytotoxique et la cytochalasine réduit cette incorporation cellulaire mais également l'effet cytopathogène de la LktA (Atapattu et Czuprynski, 2007), ce qui s'expliquerait par le fait que l'internalisation de la LktA puisse se produire sans être complexée au LFA-1. Parmi les voies d'endocytose, on distingue celles qui dépendent de la clathrine de celles qui dépendent des radeaux lipidiques. Il semble ainsi que la LktA puisse, en plus de se retrouver dans les radeaux lipidiques, être internalisée par la cellule selon la voie dépendante de la clathrine (Atapattu et Czuprynski, 2007) en faisant intervenir notamment la dynamine-2 (Urrutia *et al.*, 1997 ; Atapattu *et al.*, 2008), la protéine Eps15 en association avec l'adaptateur AP2 (Rappoport *et al.*, 2004) et la β -actine (Dykstra *et al.*, 2003).

Enfin, étant donné la faible quantité de toxine associée au récepteur, il se pourrait aussi qu'il serve plusieurs fois de distributeur de toxine aux RL.

Lkt et voies de signalisation intracellulaires

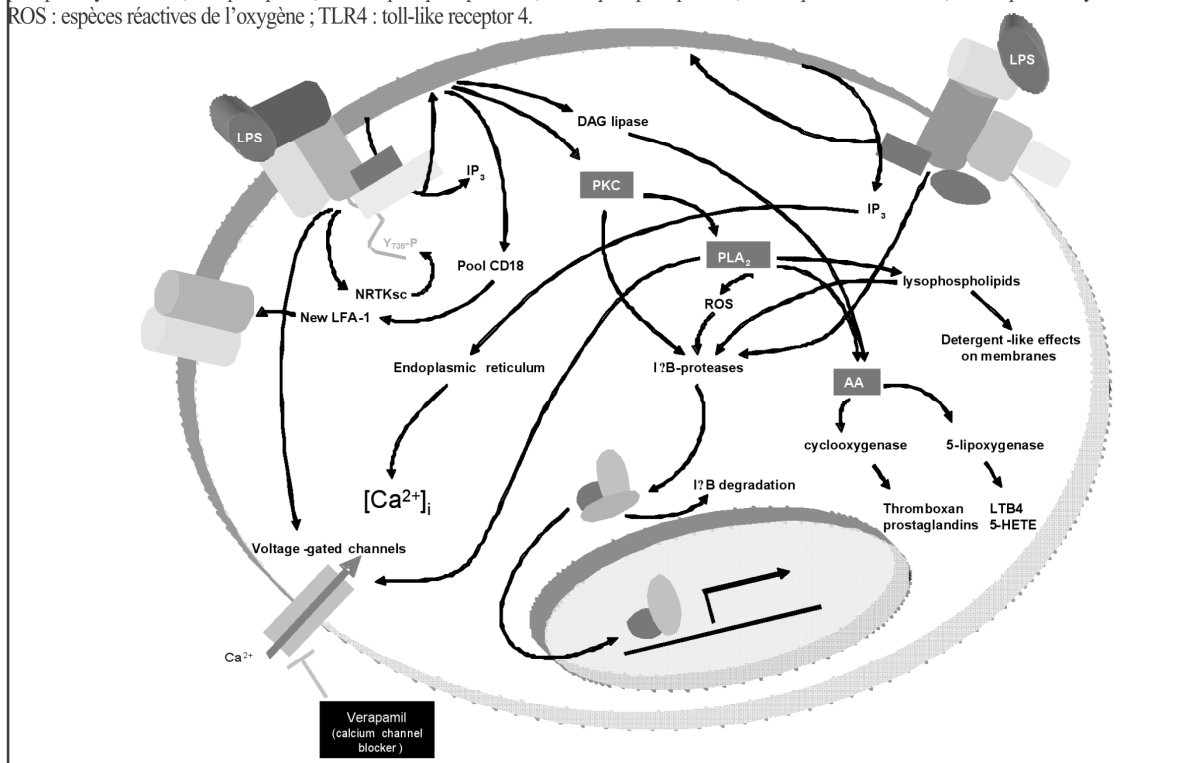
Brièvement, suivant que la LktA soit en faible ou haute concentration, elle induit respectivement l'apoptose ou la nécrose chez les leucocytes bovins,

ovins ou caprins. Il n'est cependant pas aisé de distinguer les effets de la LktA et ceux des LPS, étant donné qu'ils peuvent agir ensemble (quand ils forment des complexes) ou séparément selon de multiples voies cellulaires (Sun *et al.*, 2000 ; Cudd *et al.*, 2001) dont les principales sont reprises à la figure 4 (Zecchinon *et al.*, 2005) pour conduire entre autres à une élévation de la concentration de calcium intracellulaire (Ortiz-Carranza et Czuprynski, 1992), une poussée oxydative (Maheswaran *et al.*, 1992) et la production de plusieurs médiateurs lipidiques (Henricks *et al.*, 1992 ; Clinkenbeard *et al.*, 1994) et de cytokines proinflammatoires (Yoo *et al.*, 1995).

Le premier effet induit par la liaison de la LktA au LFA-1 bovin est une phosphorylation de la queue cytoplasmique du CD18 via une cascade indépendante de tyrosine kinases mais impliquant des kinases Src et PI3 (Jeyaseelan *et al.*, 2001a) comme cela se produit lorsque ce récepteur lie ses ligands physiologiques. Cette interaction mimerait donc les effets d'une activation du récepteur par la voie *outside-in* pouvant expliquer la mobilisation consécutive des complexes toxine/LFA-1 dans les radeaux lipidiques (Atapattu et Czuprynski, 2007). Cette liaison est connue pour impliquer des protéines G (Hsuan *et al.*, 1998 ; Jeyaseelan *et al.*, 2001b) et pour causer, d'une façon dose-dépendante, une élévation marquée et rapide de la concentration en calcium intracellulaire dans les leucocytes bovins (Czuprynski *et al.*, 1991 ; Ortiz-Carranza et Czuprynski, 1992 ; Hsuan *et al.*, 1998 ; Jeyaseelan *et al.*, 2001a) qui résulte principalement d'un flux entrant du milieu extracellulaire via des canaux (*voltage-gated channels*) (Gerbig *et al.*, 1989 ; Ortiz-Carranza et Czuprynski, 1992 ; Hsuan *et al.*, 1998 ; Hsuan *et al.*, 1999). Cette entrée de calcium est clairement impliquée dans la cytolysse (Gerbig *et al.*, 1989) et est essentielle pour déclencher la translocation du NF- κ B dans le noyau (détectable après cinq minutes d'exposition) ainsi que la production de cytokines proinflammatoires (Yoo *et al.*, 1995 ; Lafleur *et al.*, 1998). *A contrario*, de faibles concentrations en LktA provoquent une élévation de calcium sensiblement retardée et proportionnellement moindre (Hsuan *et al.*, 1998). Classiquement, il est reconnu qu'à haute concentration, les

Figure 4 : Voies de signalisation déclenchées par la LktA et le LPS pour induire la cytolyse des leucocytes

AA : acide arachidonique ; DAG : diacylglycérol ; 5-HETE : acide 5-hydroxy-eicosatétraénoïque ; IP₃ : inositol triphosphate ; LBP : LPS binding protein ; LKTA : leucotoxine ; LPS : lipopolysaccharide ; LTB₄ : leucotriène B₄ ; NRTKsc : nonreceptor tyrosine kinase signalling cascade ; PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PLA₂ : phospholipase A₂ ; PLC : phospholipase C ; PKC : protéine kinase C ; PTK : protéine tyrosine kinase ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; TLR4 : toll-like receptor 4.



toxines RTX induisent très rapidement (< 20 minutes) de la nécrose cellulaire sans signes d'apoptose (Clinkenbeard *et al.*, 1989a ; Clinkenbeard *et al.*, 1989b ; Taichman *et al.*, 1991 ; Eguchi *et al.*, 1997 ; Korostoff *et al.*, 1998) tandis qu'à faible concentration, elles provoqueraient au terme de plusieurs heures de la pyroptose (Fink et Cookson, 2005), une mort cellulaire programmée proinflammatoire (Mangan *et al.*, 1991 ; Stevens et Czuprynski, 1996 ; Korostoff *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1998a ; Sun *et al.*, 1999a ; Yamaguchi *et al.*, 2001). L'équilibre entre nécrose et pyroptose dépendrait donc de la dose en toxine.

Dans les lésions pulmonaires, les zones de nécrose de coagulation sont séquestrées par une enveloppe dense de cellules inflammatoires à des stades divers de dégénérescence et dans laquelle se retrouve *M. haemolytica*. Lorsqu'un leucocyte sort du vaisseau sanguin pour s'y intégrer, il doit donc être confronté à des concentrations croissantes de LktA, au départ sous-lytiques et apoptotiques (les cellules en pyroptose vivent encore plusieurs heures, libérant des cytokines inflammatoires entretenant l'appel neutrophili-

que) et ensuite nécrotiques (le contenu libéré des neutrophiles nécrosés va digérer le tissu pulmonaire). Aux doses sous-lytiques, le développement de la pyroptose par la toxine RTX pourrait provenir : (i) de la liaison et de l'activation des récepteurs β_2 -intégrines déclenchant des cascades de signaux intracellulaires, (ii) de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire provoquée par l'activation du récepteur et la formation de pores membranaires (en quantité insuffisante pour produire la cytolyse) et (iii) de l'altération d'organites tels que les mitochondries suite à l'endocytose et le trafic intracellulaire de la toxine (Karakelian *et al.*, 1998). Par contre, l'incorporation d'une grande quantité de toxine dans les RL (processus initial et rapide) pourrait être responsable des lésions membranaires létales générant un influx d'eau et d'électrolytes (K⁺ et Cl⁻) causant une chute du potentiel membranaire, le gonflement cellulaire et l'explosion membranaire qui correspondraient à l'action cytolytique et nécrotique rapide (Karakelian *et al.*, 1998 ; Korostoff *et al.*, 1998).

De fait, l'exposition *in vitro* des leucocytes à des doses sous-lytiques de

LtxA et LktA induit, au bout de nombreuses heures, les signes classiques d'apoptose : une diminution de la taille cellulaire, le bourgeonnement de la membrane cytoplasmique par réorganisation du cytosquelette, des altérations sélectives dans la perméabilité membranaire, la condensation de l'ADN nucléaire, une flambée respiratoire avec production de réactifs de l'oxygène, une diminution du potentiel transmembranaire $\Delta\Psi_m$ mitochondrial, un gonflement de la matrice et une déchirure de la membrane externe des mitochondries aboutissant à une libération du cytochrome C de l'espace intermembranaire dans le cytosol, l'activation de Apaf-1 et des pro-caspases-1, -3 et -9, le clivage caspase-dépendant de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et la fragmentation de l'ADN (Dyer *et al.*, 1985 ; Czuprynski *et al.*, 1991 ; Maheswaran *et al.*, 1992 ; Korostoff *et al.*, 2000 ; Yamaguchi *et al.*, 2001 ; Kelk *et al.*, 2003 ; Atapattu et Czuprynski, 2005 ; Dileepan *et al.*, 2005a ; Atapattu *et al.*, 2008 ; Chien *et al.*, 2008). La façon dont la toxine enclenche cette voie apoptotique n'est pas encore claire. Il est reconnu depuis plusieurs décennies

que la séquestration de larges quantités de calcium dans la mitochondrie se produit dans différentes conditions pathophysiologiques et peut déjà à elle seule induire de l'apoptose (Hajnóczky *et al.*, 2006). Ainsi, lorsqu'un processus délétère pour la cellule induit une perte de l'équilibre homéostatique entre l'influx et l'efflux de calcium au niveau de la membrane cytoplasmique, il s'en suit une élévation de la concentration de calcium cytosolique qui va se répercuter sur la concentration de calcium mitochondrial (Hajnóczky *et al.*, 2006). La mitochondrie possède des mécanismes de régulation de son homéostasie calcique mais lorsqu'une forte quantité de calcium est brusquement accumulée dans le cytoplasme et se transmet dans la matrice mitochondriale, ces mécanismes régulateurs peuvent être dépassés. Le calcium peut alors interagir avec la cyclophiline D pour induire l'ouverture de pores PTP (*Permeability Transition Pore*) qui traversent à la fois les membranes mitochondriales interne et externe et permettent le passage de calcium, d'autres ions et de petites molécules (Hajnóczky *et al.*, 2006). De plus, l'augmentation de la concentration en calcium mitochondrial stimule aussi la synthèse de dérivés toxiques de l'oxygène qui participent à leur tour à l'ouverture des pores PTP qui va causer la dissipation du $\Delta\Psi_m$ et la libération du calcium. Si la surcharge en calcium cytoplasmique persiste (ce qui doit être le cas avec les toxines RTX), le PTP reste ouvert et permet l'accumulation de solutés dans la matrice mitochondriale, aboutissant à l'expansion de l'espace matriciel et à la rupture de la membrane mitochondriale externe tout en libérant le contenu de l'espace intermembranaire dont le cytochrome C (Hajnóczky *et al.*, 2006). Finalement, l'atteinte de la fonction mitochondriale et l'activation de mécanismes cytoplasmiques par les facteurs mitochondriaux libérés mènent à l'exécution de la cellule par apoptose. Atapattu et ses collaborateurs ont d'ailleurs démontré tout récemment que la LktA internalisée pouvait exercer une action cytotoxique directe sur la mitochondrie en liant la membrane mitochondriale externe et en provoquant l'effondrement du potentiel membranaire $\Delta\Psi_m$ et la libération du cytochrome C dans le cytosol (Atapattu *et al.*, 2008). Ces effets de la toxine ont ensuite été antagonisés par la cyclosporine, un stabilisateur de la membrane mitochondriale

(Atapattu *et al.*, 2008). La LktA serait aussi capable de lier la cyclophiline D (Atapattu *et al.*, 2008).

Formation de pores

Par ailleurs, l'appartenance de la LktA à la famille des toxines RTX sous-entend qu'elle puisse induire la cytolysse via la formation de pores entraînant un efflux de K^+ , un influx de Ca^{2+} , un gonflement osmotique colloïdal et éventuellement la lyse cellulaire. La taille du pore varie selon les toxines de 0,6-1 nm (dans le cas de la LktA) (Clinkenbeard *et al.*, 1989a ; Iwase *et al.*, 1990 ; Ehrmann *et al.*, 1991) à 2-3 nm de diamètre (Bhakdi *et al.*, 1986; Lalonde *et al.*, 1989). Le mécanisme de formation du pore lui-même n'a pas encore été décrit mais peut être approché théoriquement en fonction de ce qui est connu pour d'autres toxines RTX. Ainsi, il ne faut que quelques secondes à la LtxA d'*A. actinomycetemcomitans* (en hautes concentrations) pour induire une forte conductance et des changements morphologiques à des cellules HL-60 humaines d'origine lymphoblastique, alors qu'aucun effet n'est observé lorsque la LtxA est ajoutée à une bicouche artificielle, sauf si la toxine est ajoutée à la monocouche lipidique avant la formation de la bicouche. Ceci peut être expliqué par le fait que la forme hydrosoluble de la toxine ne s'incorpore pas spontanément dans une bicouche mais que si elle est partiellement dénaturée comme c'est le cas à l'interface monocouche lipidique-eau, l'insertion a lieu et les pores sont formés. Ceci expliquerait également la nécessité pour ces toxines d'interagir avec un récepteur de surface comme le LFA-1 (Lear *et al.*, 1995 ; Lally *et al.*, 1997 ; Karakelian *et al.*, 1998). De même, l'étude du mode d'action de l'hémolysine HlyA d'*E. coli* (Menestrina *et al.*, 1987 ; Menestrina, 1988 ; Benz *et al.*, 1989 ; Ludwig *et al.*, 1991) suggère la nécessité d'un récepteur pour un processus en deux étapes où la liaison à la cellule-cible nécessiterait les répétitions riches en glycines et l'acylation de la toxine alors que les régions hydrophobes N-terminales permettraient la formation du pore (Coote, 1992). La spécificité de la cellule-cible serait dès lors due soit à une liaison spécifique au récepteur, soit à la capacité de la toxine à interagir avec la membrane ou encore aux deux phénomènes. Enfin, il a été montré que l'hémolysine, dans des conditions

conduisant à la cytolysse, s'insérerait dans la membrane-cible à la façon des protéines intrinsèques ou intégrales en n'occupant qu'une seule monocouche. En conséquence, l'insertion d'une ou plusieurs molécules de toxine induirait une augmentation de la pression latérale qui à terme entraînerait une fracture de la membrane (Soloaga *et al.*, 1999).

4. Perspectives

4.1. Inventaire de la variation génétique spontanée du CD18

L'identification du motif précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18 permettrait la mise en œuvre (i) d'un inventaire de la variation génétique spontanée présente dans les races viandeuses Blanc Bleu Belge et internationales au niveau dudit motif et (ii) d'un service de génotypage avec pour but d'éliminer certains taureaux d'insémination artificielle et/ou de proposer une tactique d'accouplement préférentielle permettant de disséminer le plus rapidement possible un trait de résistance innée à la mannheimiose au sein des populations bovines belge et internationale. Si à première vue, il semble peu probable que la variation intra *Bos taurus* soit supérieure à la variation inter-ruminants, l'exemple du mouflon canadien (*Bighorn sheep*, *Ovis canadensis*) dont les polymorpho-nucléaires sont quatre à huit fois plus sensibles à la leucotoxine que ceux du mouton domestique (*Ovis aries*) (Silflow et Foreyt, 1994), alors que leurs CD18 présentent 99 % d'identité (Liu *et al.*, 2006), nous donne à penser que cette piste vaut néanmoins la peine d'être explorée.

4.2. Chimiothérapie

Cibler et inhiber l'interaction spécifique entre la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* et la sous-unité CD18 des ruminants constituerait également une stratégie de choix pour lutter contre la mannheimiose sans recourir systématiquement à l'administration massive d'antibiotiques. Ainsi, l'élaboration d'un jeu de peptides compétiteurs du LFA-1 pour la fixation à la leucotoxine, c'est-à-dire qui seraient inhibiteurs de son activité leucotoxique *in vitro* et de la virulence de *M. haemolytica in vivo*, permettrait de proposer un peptide thérapeutique injectable à substituer aux traitements antibiotiques ne générant ni résidus

ni antibiorésistance et fonctionnant à la manière d'un leurre pour la leucotoxine. Nous pouvons aussi nous inspirer des nombreuses recherches menées sur le récepteur LFA-1, qui de par sa contribution active aux interactions moléculaires complexes responsables de nombreuses fonctions normales et pathologiques du système immunitaire, se retrouve à l'origine de nombreuses maladies d'étiologies diverses (génétique, bactérienne, virale, néoplasique, allergique et auto-immune), avec des impacts divers sur les santé humaine et animale (Zecchinon *et al.*, 2006c). De l'étude intensive de son interaction avec son principal ligand CD54 ou *ICAM-1* (*intercellular adhesion molecule-1*) furent en effet développés, à but thérapeutique, des anticorps, des peptides, des peptidomimétiques et des petites molécules inhibitrices (Zecchinon *et al.*, 2006b).

Bien que l'efficacité de certains anticorps ait été clairement démontrée, leur utilisation ainsi que celle de peptides en tant qu'agents thérapeutiques présentent un certain nombre de défis pharmaceutiques dus à leurs propriétés physico-chimiques : ils sont difficilement délivrables oralement, sont coûteux à produire et enclins à la dégradation physique ou chimique, sont rapidement éliminés par voie hépatique ou rénale, et peuvent également générer de l'immunogénicité lors d'injections répétées (Anderson et Siahaan, 2003). En élevage bovin, une administration d'anticorps par intraveineuse paraît néanmoins tout à fait plausible, d'autant qu'il est connu que ceux-ci peuvent passer la barrière alvéolo-capillaire pour se retrouver au niveau des lobes antéro-ventraux colonisés par *M. haemolytica*, mais il faudrait, pour ce faire, plutôt identifier le motif d'interaction de la leucotoxine et non pas celui situé sur le CD18.

Le développement de peptidomimétiques, des mimes pseudo-peptidiques ou non peptidiques de peptides biologiquement actifs, adaptés à l'usage thérapeutique (Gante, 1994), permettrait par ailleurs d'apporter une solution à l'identification d'un motif de liaison non linéaire, comme l'atteste le développement d'inhibiteurs peptidomimétiques de l'interaction ICAM-1/LFA-1, résultant du transfert d'un épitope non linéaire (identifié au niveau du domaine I d'ICAM-1 comme étant essentiel pour l'interaction avec LFA-1), à une trame moléculaire non pep-

tidique (*small-molecule framework*), supposée surmonter les limitations pharmaceutiques de peptides et en particulier leur délivrance inefficace par voie orale (Fisher *et al.*, 1997 ; Casasnovas *et al.*, 1998 ; Gadek *et al.*, 2002). Les antagonistes se lient au LFA-1, inhibent la liaison d'ICAM-1 aux leucocytes aussi bien que la réaction mixte lymphocytaire et exhibent, par comparaison à un anticorps anti-LFA-1, des effets anti-inflammatoires significatifs *in vivo*. La réalisation d'études de relation structure-activité conduisit par ailleurs au développement de deux molécules plus puissantes (Burdick *et al.*, 2003 ; Burdick *et al.*, 2004).

Quant aux petites molécules inhibitrices du LFA-1, deux classes mécanistiques distinctes, dénommées antagonistes allostériques α I et α II-like, ont récemment été développées, avec des effets opposés sur la conformation, et donc l'activation, de l'intégrine (Shimaoka et Springer, 2004 ; Zecchinon *et al.*, 2006b). Il nous semble assez difficile d'obtenir, par cette voie, des résultats spécifiques de la mannheimiose puisqu'une action au niveau de la conformation de l'intégrine aura automatiquement des répercussions sur ses fonctions « physiologiques ».

Des glucoconjugués solubles arborant les glycanes que lie la toxine sur le récepteur β_2 -intégrine (*N,N'*-diacétylchitobiose, *N,N',N''*-triacétylchitotriose, D-mannose, *N*-acétyllactosamine et acide sialique (Morova *et al.*, 2008)) pourraient aussi être produits. Ces dernières années, les progrès qui ont été fait dans la synthèse enzymatique *in vitro* des glycanes ont permis de complexer ces oligosaccharides à la mucine ou, en très grand nombre, dans des structures synthétiques appelées glycodendromères. Ces composés pourraient être administrés à l'animal (Roy, 2003 ; Tanaka *et al.*, 2008 ; Varki et Sharon, 2008 ; Wang, 2008) ; confrontés à la toxine, ils agiraient comme des leurres inhibant sa liaison au récepteur en écartant le développement de l'effet cytotoxique (Touaibia et Roy, 2007), à l'image des résultats obtenus par l'équipe de Morova et collaborateurs (Zhao *et al.*, 2008). De tels composés ont déjà été utilisés pour neutraliser d'autres facteurs de virulence bactériens (Imberty *et al.*, 2008).

Enfin, une dernière catégorie d'agents

inhibiteurs qui pourrait être développée contre la toxine ou la sous-unité CD18 sont de courtes séquences d'acides nucléiques appelées aptamères. Ces molécules sont généralement créées au terme de plusieurs cycles de sélection réalisés *in vitro* (SELEX, *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) au sein d'un énorme pool de séquences nucléiques aléatoires mis en présence de la cible moléculaire que l'on cherche à lier et inhiber (Kaur et Roy, 2008 ; Shamah *et al.*, 2008). Les aptamères offrent des avantages sur les anticorps puisque leur synthèse peut se dérouler entièrement *in vitro*, ils possèdent des propriétés de stockage intéressantes et stimulent peu ou pas du tout le système immunitaire (Kaur et Roy, 2008). Par ailleurs, ils ont la capacité de lier le récepteur ou la toxine quelle que soit la nature des sites d'interaction en jeu (peptidique, saccharidique ou lipidique). Il est aussi possible d'envisager d'inhiber l'activation des voies de signalisation intracellulaires par la LktA et par là son action cytotoxique. Ainsi, des aptamères ont par exemple été sélectionnés contre la queue cytoplasmique du CD18 en vue d'inhiber l'adhésion cellulaire à ICAM-1 (Blind *et al.*, 1999 ; Famulok *et al.*, 2001). De même, des aptamères sélectionnés contre la cytohesine-1, un facteur d'échange de nucléotide guanine qui régulerait l'adhésion du LFA-1 à ICAM-1, et exprimés intracellulairement, bloquent la fonction de cette molécule, provoquent un réarrangement du cytosquelette d'actine et inhibent l'activité du LFA-1 dans l'adhésion leucocytaire (Famulok *et al.*, 2001 ; Mayer *et al.*, 2001). Ces aptamères peuvent donc potentiellement inhiber l'action de la LktA et il serait intéressant de les faire exprimer par les leucocytes bovins lors de la mannheimiose. Leur synthèse pourrait s'inspirer de la technique que Blind et collaborateurs (1999) ont utilisé pour les produire dans des lymphocytes T humains : l'expression contrôlée de l'aptamère par l'ARN polymérase T7 via l'infection par des poxvirus vaccinaux recombinants incapables de se propager (Famulok *et al.*, 2001).

Bien entendu, à l'image de l'utilisation des antibiotiques dans cette maladie, ces médicaments devraient être administrés le plus rapidement possible après l'infection et idéalement avant même que les signes cliniques n'apparaissent, ce qui n'est pas réalisable en

pratique. Toutefois, si ces molécules sont administrées suffisamment tôt au cours de la maladie, elle permettraient de limiter sérieusement le développement des lésions et seraient donc un complément intéressant à l'antibiothérapie et à la vaccination qui n'apportent en général qu'une diminution de la mortalité et de la morbidité lors de l'infection de l'élevage. Cette vitesse d'action impose aussi l'utilisation d'un médicament qui puisse être administré facilement et dont le principe actif diffuse rapidement dans le système circulatoire et respiratoire. Enfin, l'utilisation de substances inhibant l'extravasation leucocytaire n'est pas envisageable sur de longues périodes ou lors d'une infection concomitante avec un autre agent pathogène. Leur administration devrait être ponctuelle car le gain qu'elles apportent dans la mannheimiose pourrait être contrebalancé par le fait qu'elles affaiblissent le système immunitaire et sensibilisent donc l'animal aux autres infections. Par ailleurs, en comparaison des mammifères, le pouvoir évolutif générationnel des bactéries (vitesse de production des générations, transfert et plasticité génétique...) est très important. Ainsi, l'utilisation intensive des antibiotiques dans des conditions de pression d'infection élevée, sans pratiques prophylactiques adéquates, a abouti à l'apparition d'antibiorésistances bactériennes. De la même façon, les propositions thérapeutiques qui sont faites ici peuvent ne pas être infaillibles et, si elles ne sont pas intégrées dans un programme prophylactique drastique, risquent d'être très vite dépassées par la capacité d'adaptation des bactéries.

4.3. Transgénèse

Dans le cas où l'inventaire de la variation génétique spontanée présente dans les races viandeuses Blanc Bleu Belge et internationales au niveau du motif précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18 ne donne aucun résultat concluant, il serait possible d'envisager d'engager un processus d'ingénierie génétique visant à corriger par transgénèse la séquence responsable de la sensibilité des ruminants à la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica*.

En effet, la transgénèse animale est une technologie qui permet le transfert stable d'une information génétique connue dans un génome donné de manière plus précise que la sélection

conventionnelle. Depuis ses débuts en 1980, elle ne fait que prendre de l'importance, grâce notamment aux récentes avancées techniques et aux découvertes de gènes d'intérêt facilitées par le séquençage des génomes des animaux d'élevage. De plus, la taille de l'ADN étranger n'est plus un problème puisqu'il est maintenant possible d'insérer des vecteurs microchromosomiques stables porteurs de millions de paires de bases d'ADN, contenant un centromère, deux télomères et des origines de réplifications (Kuroiwa *et al.*, 2002). Ses applications peuvent être divisées en trois grandes catégories : (i) l'obtention d'informations sur la fonction et la régulation des gènes, que ce soit dans un contexte normal ou pathologique, (ii) l'obtention de produits de haute valeur destinés à la thérapie humaine comme des protéines recombinantes à vocation pharmaceutique et des xéno-organes pour humains et (iii) l'amélioration des produits animaux de consommation (Houdebine, 2005), tels ces poissons transgéniques de diverses espèces (saumon, truite, tilapia, carpe...) qui contiennent plusieurs copies du gène de la somatotropine et qui présentent donc une croissance plus rapide (Muir, 2004). Les Nations-Unies recommandent même l'implémentation de l'approche transgénique pour améliorer la santé des pays en voie de développement, bien que cette exhortation ne concerne principalement pour l'instant que les cultures (Acharya *et al.*, 2003).

La lutte contre les pathologies animales apparaît également comme un secteur prioritaire puisque la sélection d'animaux transgéniques plus résistants pourrait théoriquement permettre (i) de réduire l'usage de médicaments dont les antibiotiques, (ii) d'accroître le bien-être animal, (iii) de faciliter le travail de l'éleveur, (iv) de diminuer les coûts via l'amélioration du rendement en élevage et (v) d'amoindrir la fréquence de transmission des maladies de l'animal à l'Homme (Houdebine, 2005). Ainsi, par exemple, (i) des bovins chez qui les gènes PrP ont été inactivés par recombinaison homologe (Kuroiwa *et al.*, 2004) sont résistants à la propagation du prion *in vitro*, tout en étant à 20 mois, normaux des points de vue clinique, physiologique, histopathologique, immunologique et reproductif (Richt *et al.*, 2007) et (ii) divers animaux secrètent dans leur lait des molécules exhibant des proprié-

tés antibactériennes (Zuelke, 1998); (Mitra *et al.*, 2003 ; Donovan *et al.*, 2005 ; Wall *et al.*, 2005 ; Maga *et al.*, 2006) ou antivirales (Castilla *et al.*, 1998a ; Castilla *et al.*, 1998b ; Sola *et al.*, 1998), supposées protéger à la fois les consommateurs et les glandes mammaires contre les infections (Soler *et al.*, 2006).

Du point de vue pratique, la transgénèse doit cependant faire face à différents défis : la sélection du gène à ajouter, substituer ou neutraliser, la construction de vecteurs permettant une expression fiable du transgène, le transfert et l'intégration de celui-ci et enfin, l'interprétation des données. Par ailleurs, le transfert de gènes reste peu efficace dans certaines espèces et peut induire des effets secondaires imprévisibles dus à l'interférence du transgène avec le génome de l'hôte au niveau du site d'insertion ou par l'interaction de l'ARN ou de la protéine correspondante avec les mécanismes cellulaires (Houdebine, 2005 ; Houdebine, 2007). De plus, au-delà des problèmes éthiques posés (notamment la manipulation des embryons), si la reproduction par clonage supprime certains des problèmes qui accompagnent la reproduction sexuée (notamment en terme de sélection d'animaux « naturellement » plus résistants à certaines pathologies), elle en engendre d'autres (Houdebine, 2005 ; Houdebine et Renard, 2005 ; Houdebine, 2007 ; Robl *et al.*, 2007) : (i) le patrimoine génétique des cellules donneuses de noyau n'est pas strictement connu, (ii) le statut génétique des clones ne l'est pas d'avantage, (iii) la reprogrammation du génome des cellules donneuses de noyau par le cytoplasme de l'ovocyte est fréquemment incomplète, (iv) les animaux obtenus par clonage, bien qu'essentiellement génétiquement identiques à leurs géniteurs, sont souvent épigénétiquement modifiés sans que l'on puisse en prévoir les effets, (v) le clonage peut être, si l'on n'y prend garde, réducteur de biodiversité et accentuer les effets indésirables de la sélection moderne qui repose sur un nombre de plus en plus restreint de géniteurs, (vi) l'introduction d'un gène dans un génome animal peut réactiver un transposon ou un génome rétroviral intégré et induire ainsi une multiplication du transposon ou la production de particules virales infectieuses potentiellement pathogènes et (vii) les effets directs et indirects des transgènes ne peuvent être tous prévisibles (ce qui quelque part

fait leur charme pour les généticiens) et il n'est pas exclu que les animaux transgéniques deviennent plus sensibles à certaines maladies, le système immunitaire des clones étant souvent imparfaitement fonctionnel (Ellis, 2004). Par contre, certaines anomalies observées peuvent être abolies par la reproduction sexuée, celle-ci étant capable d'éliminer les gamètes anormaux et de parfaire la reprogrammation des génomes. Ainsi, les télomères anormalement courts chez certains clones retrouvent une longueur normale chez tous les descendants (Shiels et Jardine, 2003).

Des mesures de confinement spécifiques sont aussi nécessaires pour permettre l'élevage de ces animaux dans des conditions de sécurité élevée et éviter tout risque de dissémination involontaire dans la chaîne alimentaire humaine, l'alimentation du bétail ou l'environnement, même si la transmissibilité à l'Homme de certaines toxines ou la dissémination incontrôlée du transgène semblent moins probables que ce qui est observé chez les végétaux (Houdebine et Renard, 2005). Par ailleurs, le coût des animaux transgéniques de rente reste élevé, principalement du fait que la dissémination des traits d'intérêt porté par un transgène n'est pas aussi simple et rapide que pour les plantes et que les transgènes doivent être source d'un très haut profit potentiel pour être utilisables. Quoi qu'il en soit, des tests permettent d'évaluer la toxicité, l'allergénicité et l'infectiosité des animaux obtenus par clonage ou transgénèse (risques auxquels n'échappent d'ailleurs pas les animaux issus de la sélection classique) et, jusqu'à ce jour, la littérature scientifique ne relate aucun effet négatif, que ce soit en termes de composition globale du lait ou de la viande, de digestibilité, de toxicité et d'alimentarité, d'allergénicité, de mutagénicité ou de présence de particules rétrovirales (Houdebine et Renard, 2005).

5. CONCLUSION

Les caractères de résistance innée aux maladies ont été, depuis des millénaires, largement disséminés dans les populations animales grâce à la sélection naturelle, ne favorisant la survie que d'individus résistants à telle ou telle maladie. La domestication a, quant à elle, fait intervenir un élément neuf, à savoir la sélection artificielle de caractères rela-

tifs aux productions. Concomitamment, les conditions d'élevage ont évolué vers un système concentrationnaire où l'extrême densité des populations animales a fourni aux agents pathogènes une niche infiniment plus propice à la contagion. Le résultat est que les populations animales n'ont jamais été soumises à des pressions d'infection plus intenses que celles qui prévalent aujourd'hui, tout en comptant progressivement moins d'individus résistants, à mesure que la pression de sélection s'exerce unilatéralement en faveur des productions. Une des conséquences en est le recours à l'administration massive d'antibiotiques, avec les répercussions que l'on connaît sur l'émergence de souches multi résistantes (Ferber, 2000 ; Angulo *et al.*, 2004 ; Molbak, 2004). Identifier des critères permettant de restaurer une pression de sélection favorable à la dissémination la plus large possible de traits de résistance aux maladies va donc dans le sens d'un renforcement de l'autonomie et du profit des éleveurs, rendus moins dépendants des substances médicamenteuses, des retards de croissance et des saisies à l'abattage mais rencontre également le souci du consommateur de disposer d'une alimentation pécuniairement abordable, saine et sans résidus.

De ce qui précède, il ressort qu'une des priorités de la recherche dans une discipline comme la pathologie vétérinaire est l'étude des maladies qui touchent les animaux de rente, comme les pneumonies bactériennes à *Mannheimia haemolytica* qui constituent un problème majeur dans l'élevage et l'engraissement des bovins, avec des répercussions très élevées en termes de morbidité et de mortalité. Parmi les différents facteurs de virulence produits par la bactérie, la leucotoxine joue un rôle de tout premier plan puisqu'elle est responsable de la spécificité d'espèces qu'exhibe *M. haemolytica* envers les ruminants en provoquant la lyse de leurs leucocytes et ce, via une interaction spécifique avec la sous-unité CD18 de leurs β_2 -intégrines (Ambagala *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1999 ; Jeyaseelan *et al.*, 2000 ; Deshpande *et al.*, 2002 ; Jeyaseelan *et al.*, 2002 ; Dileepan *et al.*, 2005b ; Zecchinon *et al.*, 2005 ; Fett *et al.*, 2008). L'identification du ou des motif(s) moléculaire(s) du CD18 qui confère(nt) aux ruminants une sensibilité spécifique à la leucotoxine pourrait être valorisée de multiples façons : sélection assistée par marqueurs au sein de la population bovine mondiale après inventaire de la variation génétique spontanée au niveau dudit motif,

développement de molécules à usage thérapeutique (anticorps, peptides, peptidomimétiques, inhibiteurs allostériques, glucoconjugués, aptamères...) ou encore mise en place d'une stratégie de transgénèse.

En conclusion, la mise en évidence de ce(s) motif(s) représente donc le challenge majeur de cette recherche, d'autant plus que les récentes avancées semblaient jusqu'il y a peu se contredire.

Financement

P. Vanden Bergh a bénéficié d'une bourse du Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture, rue d'Egmont 5, B-1000 Bruxelles.

Mannheimiosis: from a (molecular) fatal attraction to one of the most important ruminant breeding disease

Summary

Bacterial pneumonias represent the major problem in ruminant breeding and fattening, with high morbidity and mortality levels. Besides the several biological factors incriminated, *Mannheimia haemolytica* plays a great role as a complicating agent.

One of its features is the fact that it does not lead to broncho-alveolar fibrino-haemorrhagic pneumonias in non-ruminant species. Lesions result from massive necrosis of neutrophils and macrophages and from the release of their constituents. At the molecular level, this specificity is due to the tight interaction between leukotoxin, the major bacterial virulence factor, and the CD18 subunit of the leukocytic surface receptors β_2 -integrins.

The review describes the consequences of this binding at the macroscopic and microscopic levels and starts up a few therapeutic perspectives based on recent research findings.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHARYA T., DAAR A.S., SINGER P.A. Biotechnology and the UN's Millennium Development Goals. *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 1434-1436.
- AL-GHAMDI G.M., AMES T.R., BAKER J.C., WALKER R., CHASE C.C., FRANK G.H., MAHESWARAN S.K. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2000, **12**, 576-578.
- AMBAGALA T.C., AMBAGALA A.P., SRIKUMARAN S. The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to beta(2) integrins on bovine leukocytes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, **179**, 161-167.
- ANDERSON M.E., SIAHAAN T.J. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides*, 2003, **24**, 487-501.
- ANGELOS J.A., BALL L.M., HESS J.F. Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Vet. Microbiol.*, 2007, **125**, 73-79.
- ANGEN O., MUTTERS R., CAUGANT D.A., OLSEN J.E., BISGAARD M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, **49**, 67-86.
- ANGULO F.J., NARGUND V.N., CHILLER T.C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2004, **51**, 374-379.
- ASADA M., FURUKAWA K., KANTOR C., GAHMBERG C.G., KOBATA A. Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell adhesion molecules CD11/CD18. *Biochemistry*, 1991, **30**, 1561-1571.
- ATAPATTU D.N., ALBRECHT R.M., MCCLENAHAN D.J., CZUPRYNSKI C.J. Dynamin-2-dependent targeting of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin to mitochondrial cyclophilin D in bovine lymphoblastoid cells. *Infect. Immun.*, 2008, **76**, 5357-5365.
- ATAPATTU D.N., CZUPRYNSKI C.J. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin induces apoptosis of bovine lymphoblastoid cells (BL-3) via a caspase-9-dependent mitochondrial pathway. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 5504-5513.
- ATAPATTU D.N., CZUPRYNSKI C.J. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin binds to lipid rafts in bovine lymphoblastoid cells and is internalized in a dynamin-2- and clathrin-dependent manner. *Infect. Immun.*, 2007, **75**, 4719-4727.
- BAILLY P., TONTTI E., HERMAND P., CARTRON J.P., GAHMBERG C.G. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur. J. Immunol.*, 1995, **25**, 3316-3320.
- BECKER D.J., LOWE J.B. Leukocyte adhesion deficiency type II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1455**, 193-204.
- BENZ R., SCHMID A., WAGNER W., GOEBEL W. Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect. Immun.*, 1989, **57**, 887-895.
- BERMAN A.E., KOZLOVA N.I., MOROZEVICH G.E. Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc.)*, 2003, **68**, 1284-1299.
- BERTHOUD H., FREY J., KUHNERT P. Characterization of Aqx and its operon: the hemolytic RTX determinant of *Actinobacillus equuli*. *Vet. Microbiol.*, 2002, **87**, 159-174.
- BHAKDI S., MACKMAN N., NICAUD J.M., HOLLAND I.B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.*, 1986, **52**, 63-69.
- BINGHAM D.P., MOORE R., RICHARDS A.B. Comparison of DNA: DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella haemolytica* and related species. *Am. J. Vet. Res.*, 1990, **51**, 1161-1166.
- BLIND M., KOLANUS W., FAMULOK M. Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 3606-3610.
- BREIDER M.A., WALKER R.D., HOPKINS F.M., SCHULTZ T.W., BOWERSOCK T.L. Pulmonary lesions induced by *Pasteurella haemolytica* in neutrophil sufficient and neutrophil deficient calves. *Can. J. Vet. Res.*, 1988, **52**, 205-209.
- BURDICK D.J., MARSTERS J.C., JR., ALIAGAS-MARTIN I., STANLEY M., BERESINI M., CLARK K., MCDOWELL R.S., GADEK T.R. N-Benzoyl amino acids as ICAM/LFA-1 inhibitors. Part 2: structure-activity relationship of the benzoyl moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 2055-2059.
- BURDICK D.J., PARIS K., WEESE K., STANLEY M., BERESINI M., CLARK K., MCDOWELL R.S., MARSTERS J.C., GADEK T.R. N-Benzoyl amino acids as LFA-1/ICAM inhibitors 1: amino acid structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 1015-1018.
- BUREAU F., DETILLEUX J., DORTS T., UYSTEPRUYST C., COGHE J., LEROY P.L., LEKEUX P. Spirometric performance in Belgian Blue calves: I. Effects on economic losses due to the bovine respiratory disease complex. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 1301-1304.
- BURROWS L.L., LO R.Y. Molecular characterization of an RTX toxin determinant from *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 2166-2173.

- CAPRIOLIA., BUSANIL., MARTEL J.L., HELMUTH R. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, **14**, 295-301.
- CASASNOVAS J.M., STEHLE T., LIU J.H., WANG J.H., SPRINGER T.A. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, **95**, 4134-4139.
- CASTILLA J., PINTADO B., SOLA I., SANCHEZ-MORGADO J.M., ENJUANES L. Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk. *Nat. Biotechnol.*, 1998a, **16**, 349-354.
- CASTILLA J., SOLA I., PINTADO B., SANCHEZ-MORGADO J.M., ENJUANES L. Lactogenic immunity in transgenic mice producing recombinant antibodies neutralizing coronavirus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998b, **440**, 675-686.
- CHANG Y.F., MA D.P., SHI J., CHENGAPPA M.M. Molecular characterization of a leukotoxin gene from a *Pasteurella haemolytica*-like organism, encoding a new member of the RTX toxin family. *Infect. Immun.*, 1993a, **61**, 2089-2095.
- CHANG Y.F., SHI J., MA D.P., SHIN S.J., LEIN D.H. Molecular analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin-III gene cluster. *DNA Cell. Biol.*, 1993b, **12**, 351-362.
- CHIEN M.S., CHAN Y.Y., CHEN Z.W., WU C.M., LIAO J.W., CHEN T.H., LEE W.C., YE H.K.S., HSUAN S.L. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.*, 2009, **135**, 327-333.
- CLINKENBEARD K.D., CLARKE C.R., HAGUE C.M., CLINKENBEARD P., SRIKUMARAN S., MORTON R.J. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced synthesis of eicosanoids by bovine neutrophils in vitro. *J. Leukoc. Biol.*, 1994, **56**, 644-649.
- CLINKENBEARD K.D., MOSIER D.A., CONFER A.W. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 1989a, **57**, 420-425.
- CLINKENBEARD K.D., MOSIER D.A., TIMKO A.L., Confer A.W. Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on cultured bovine lymphoma cells. *Am. J. Vet. Res.*, 1989b, **50**, 271-275.
- CONFER A.W., PANCIERA R.J., CLINKENBEARD K.D., MOSIER D.A. Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, S48-52.
- COOTE J.G. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1992, **8**, 137-161.
- COX E., MAST J., MACHUGH N., SCHWENGER B., GODDEERIS B.M. Expression of beta 2 integrins on blood leukocytes of cows with or without bovine leukocyte adhesion deficiency. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1997, **58**, 249-263.
- CUDD L.A., OWNBY C.L., CLARKE C.R., SUN Y., CLINKENBEARD K.D. Effects of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on apoptosis and oncosis of bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 136-141.
- CZUPRYNSKI C.J., NOEL E.J., ORTIZ-CARRANZA O., SRIKUMARAN S. Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 3126-3133.
- DASSANAYAKE R.P., SHANTHALINGAM S., DAVIS W.C., SRIKUMARAN S. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of ovine (*Ovis aries*) leukocytes is mediated by CD18, the beta subunit of beta(2)-integrins. *Microb. Pathog.*, 2007, **42**, 167-173.
- DAVIES R.L., BAILLIE S. Cytotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene lktA. *Vet. Microbiol.*, 2003, **92**, 263-279.
- DAVIES R.L., CAMPBELL S., WHITTAM T.S. Mosaic structure and molecular evolution of the leukotoxin operon (lktCABD) in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *J. Bacteriol.*, 2002, **184**, 266-277.
- DAVIES R.L., DONACHIE W. Intra-specific diversity and host specificity within *Pasteurella haemolytica* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. *Microbiology*, 1996, **142**, 1895-1907.
- DAVIES R.L., WHITTAM T.S., SELANDER R.K. Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (lktA) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 1394-1404.
- DESHPANDE M.S., AMBAGALA T.C., AMBAGALA A.P., KEHRLI M.E., JR., SRIKUMARAN S. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 5058-5064.
- DILEEPAN T., KACHLANY S.C., BALASHOVA N.V., PATEL J., MAHESWARAN S.K. Bovine CD18 is the functional receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 2007a, **75**, 4851-4856.
- DILEEPAN T., KANNAN M.S., WALCHECK B., MAHESWARAN S.K. Integrin-EGF-3 domain of bovine CD18 is critical for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin species-specific susceptibility. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007b, **274**, 67-72.
- DILEEPAN T., KANNAN M.S., WALCHECK B., THUMBIKAT P., MAHESWARAN S.K. Mapping of the binding site for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin within bovine CD18. *Infect. Immun.*, 2005a, **73**, 5233-5237.
- DILEEPAN T., THUMBIKAT P., WALCHECK B., KANNAN M.S., MAHESWARAN S.K.

- Recombinant expression of bovine LFA-1 and characterization of its role as a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Microb. Pathog.*, 2005b, **38**, 249-257.
- DONACHIE W. Bacteriology of bovine respiratory disease. *U.K. VET.*, 1998, **3**, 44-46.
- DONOVAN D.M., KERR D.E., WALL R.J. Engineering disease resistant cattle. *Transgenic Res.*, 2005, **14**, 563-567.
- DUNGWORTH D. The respiratory system. In : K. Jubb, Kennedy P., Palmer N. (Eds), Pathology of domestic animals. Academic Press: San Diego, 1992, 589-663.
- DYER R.M., BENSON C.E., BOY M.G. Production of superoxide anion by bovine pulmonary macrophages challenged with soluble and particulate stimuli. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 336-341.
- DYKSTRA M., CHERUKURI A., SOHN H.W., TZENG S.J., PIERCE S.K. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, **21**, 457-481.
- EDWARDS A.J. Respiratory diseases of feedlot cattle in the central USA. *Bov. Prac.*, 1996, 5-7.
- EGUCHI Y., SHIMIZU S., TSUJIMOTO Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.*, 1997, **57**, 1835-1840.
- EHRMANN I.E., GRAY M.C., GORDON V.M., GRAY L.S., HEWLETT E.L. Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *FEBS Lett.*, 1991, **278**, 79-83.
- ELLIS S.A. Immune status: normal expression of MHC class I in the placenta and what is expected in clones. *Cloning Stem Cells*, 2004, **6**, 121-125.
- FAMULOK M., BLIND M., MAYER G. Intramers as promising new tools in functional proteomics. *Chem. Biol.*, 2001, **8**, 931-939.
- FELMLEE T., PELLETT S., WELCH R.A. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.*, 1985, **163**, 94-105.
- FERBER D. Antibiotic resistance. Superbugs on the hoof? *Science*, 2000, **288**, 792-794.
- FERECH M., COENEN S., MALHOTRA-KUMAR S., DVORAKOVA K., HENDRICKX E., SUETENS C., GOOSSENS H. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, **58**, 401-407.
- FETT T., ZECCHINON L., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of caprine (*Capra hircus*) leukocytes is mediated by the CD18 subunit of beta(2)-integrins. *Microb. Pathog.*, 2008, **45**, 337-342.
- FINK S.L., COOKSON B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 1907-1916.
- FISHER K.L., LU J., RIDDLE L., KIM K.J., PRESTA L.G., BODARY S.C. Identification of the binding site in intercellular adhesion molecule 1 for its receptor, leukocyte function-associated antigen 1. *Mol. Biol. Cell.*, 1997, **8**, 501-515.
- FONG K.P., PACHECO C.M., OTIS L.L., BARANWAL S., KIEBA I.R., HARRISON G., HERSH E.V., BOESZE-BATTAGLIA K., LALLY E.T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin requires lipid microdomains for target cell cytotoxicity. *Cell. Microbiol.*, 2006, **8**, 1753-1767.
- FRANK G.H., SMITH P.C. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44**, 981-985.
- FREY J., MEIER R., GYGI D., NICOLET J. Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 3026-3032.
- GADEK T.R., BURDICK D.J., MCDOWELL R.S., STANLEY M.S., MARSTERS J.C., JR., PARIS K.J., OARE D.A., REYNOLDS M.E., LADNER C., ZIONCHECK K.A., LEE W.P., GRIBLING P., DENNIS M.S., SKELTON N.J., TUMAS D.B., CLARK K.R., KEATING S.M., BERESINI M.H., TILLEY J.W., PRESTA L.G., BODARY S.C. Generation of an LFA-1 antagonist by the transfer of the ICAM-1 immunoregulatory epitope to a small molecule. *Science*, 2002, **295**, 1086-1089.
- GAHMBERG C.G. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1997, **9**, 643-650.
- GANTE J. Peptidomimetics-tailored enzyme inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, **33**, 1699-1720.
- GARDNER B.A., NORTHCUTT S.L., DOLEZAL H.G., GILL D.R., RAY F.K., MORGAN J.B., SHEARHART C.W. Factors influencing profitability of feedlot steers. *Animal Science Research Report, Oklahoma Ag Experiment Station, Oklahoma State University, Stillwater, OK*, 1996, 164-172.
- GERBIG D.G., JR., WALKER R.D., BAKER J.C., FOSTER J.S., MOORE R.N. Calcium ion involvement in the action of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet. Microbiol.*, 1989, **19**, 325-335.
- GLASER P., DANCHINA., LADANT D., BARZU O., ULLMANN A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai. J. Exp. Clin. Med.*, 1988, **13**, 239-252.
- GOOSSENS H., FERECH M., VANDER STICHELE R., ELSEVIERS M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, 2005, **365**, 579-587.
- GOPINATH R.S., AMBAGALA T.C., DESHPANDE M.S., DONIS R.O., SRIKUMARAN S. *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* Leukotoxin Binding Domain Lies within Amino Acids 1 to 291 of Bovine CD18. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 6179-6182.
- GRIFFIN D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 1997, **13**, 367-377.
- GRIFFIN D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Calf News Mag.*, 2000, **138**, 19-21.

- GRIFFIN D., PERINO L., WITTUM T. Feedlot respiratory disease: cost, value of preventives and intervention. In : Proceedings of the Twenty Seventh Annual Convention American Association of Bovine Practitioners, Pittsburgh, Pennsylvania, USA, September 22-25, 1994. American Association of Bovine Practitioners : Stillwater, 1995, 157-160.
- HAJNOCZKY G., CSORDAS G., DAS S., GARCIA-PEREZ C., SAOTOME M., SINHA ROY S., YI M. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, 2006, **40**, 553-560.
- HAUZENBERGER E., HAUZENBERGER D., HULTENBY K., HOLGERSSON J. Porcine endothelium supports transendothelial migration of human leukocyte subpopulations: anti-porcine vascular cell adhesion molecule antibodies as species-specific blockers of transendothelial monocyte and natural killer cell migration. *Transplantation*, 2000, **69**, 1837-1849.
- HENRICKS P.A., BINKHORST G.J., DRIJVER A.A., NIJKAMP F.P. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin enhances production of leukotriene B₄ and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 3238-3243.
- HESS J.F., ANGELOS J.A. The *Moraxella bovis* RTX toxin locus mbx defines a pathogenicity island. *J. Med. Microbiol.*, 2006, **55**, 443-449.
- HIGHLANDER S., WEINSTOCK G. *Mannheimia haemolytica* PHL213. [en ligne] (08/10/2006) Adresse URL : http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial/microbial-detail.jsp?project_id=122, consulté le 3 avril 2009.
- HIGHLANDER S.K. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. *Front. Biosci.*, 2001, **6**, 1128-1150.
- HIGHLANDER S.K., FEDOROVA N.D., DUSEK D.M., PANCIERA R., ALVAREZ L.E., RINEHART C. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 3916-3922.
- HOLGERSSON J., EHRNFELT C., HAUZENBERGER E., SERRANDER L. Leukocyte endothelial cell interactions in pig to human organ xenograft rejection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002, **87**, 407-415.
- HORMANSDORFER S., BAUER J. Resistance pattern of bovine *Pasteurella*. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 1996, **109**, 168-171.
- HOUEBINE L.M. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod. Domest. Anim.*, 2005, **40**, 269-281.
- HOUEBINE L.M. Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol. Biol.*, 2007, **360**, 163-202.
- HOUEBINE L.M., RENARD J.P. *Confinement et consommation des animaux clones et transgéniques*. *Rev. Sci. Tech.*, 2005, **24**, 265-274.
- HSUAN S.L., KANNAN M.S., JEYASEELAN S., PRAKASH Y.S., MALAZDREWICH C., ABRAHAMSEN M.S., SIECK G.C., MAHESWARAN S.K. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin and endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages requires NF-kappaB activation and calcium elevation. *Microb. Pathog.*, 1999, **26**, 263-273.
- HSUAN S.L., KANNAN M.S., JEYASEELAN S., PRAKASH Y.S., SIECK G.C., MAHESWARAN S.K. *Pasteurella haemolytica* A1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 2836-2844.
- HUANG C., SPRINGER T.A. Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, 3162-3167.
- HYNES R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 1987, **48**, 549-554.
- HYNES R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992, **69**, 11-25.
- IMBERTY A., CHABRE Y.M., ROY R. Glycomimetics and glycodendrimers as high affinity microbial anti-adhesins. *Chemistry*, 2008, **14**, 7490-7499.
- IWASE M., LALLY E.T., BERTHOLD P., KORCHAK H.M., TAICHMAN N.S. Effects of cations and osmotic protectants on cytolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 1782-1788.
- JENSEN R., PIERSON R.E., BRADY P.M., SAARI D.A., LAUERMAN L.H., ENGLAND J.J., KEYVANFAR H., COLLIER J.R., HORTON D.P., MCCHESENEY A.E., BENITEZ A., CHRISTIE R.M. Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1976, **169**, 500-506.
- JEYASEELAN S., HSUAN S.L., KANNAN M.S., WALCHECK B., WANG J.F., KEHRLI M.E., LALLY E.T., SIECK G.C., MAHESWARAN S.K. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 72-79.
- JEYASEELAN S., KANNAN M.S., BRIGGS R.E., THUMBIKAT P., MAHESWARAN S.K. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects. *Infect. Immun.*, 2001a, **69**, 6131-6139.
- JEYASEELAN S., KANNAN M.S., HSUAN S.L., SINGH A.K., WALSETHT.F., MAHESWARAN S.K. *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin-induced cytotoxicity of bovine leukocytes: role of arachidonic acid and its regulation. *Microb. Pathog.*, 2001b, **30**, 59-69.

- JEYASEELAN S., SREEVATSAN S., MAHESWARAN S.K. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim. Health Res. Rev.*, 2002, **3**, 69-82.
- JONES F.A. A study of *Bacillus bovisepitiscus*. *J. Exp. Med.*, 1921, **34**, 561-577.
- KAEHLER K.L., MARKHAM R.J., MUSCOPLAT C.C., JOHNSON D.W. Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. *Infect. Immun.*, 1980, **30**, 615-616.
- KAMP E.M., STOCKHOFF-ZURWIEDEN N., VAN LEENGOED L.A., SMITS M.A. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 4350-4354.
- KAMP E.M., VERMEULEN T.M., SMITS M.A., HAAGSMA J. Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 4063-4065.
- KARAKELIAN D., LEAR J.D., LALLY E.T., TANAKA J.C. Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin pore formation in HL60 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1406**, 175-187.
- KAUR G., ROY I. Therapeutic applications of aptamers. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 2008, **17**, 43-60.
- KEHL-FIET E., ST GEME J.W., 3RD. Identification and characterization of an RTX toxin in the emerging pathogen *Kingella kingae*. *J. Bacteriol.*, 2007, **189**, 430-6.
- KEHRENBURG C., SCHULZE-TANZI G., MARTEL J.L., DANCLA E.C., SCHWARZ S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet. Res.*, 2001, **32**, 323-339.
- KELK P., JOHANSSON A., CLAESON R., HANSTROM L., KALFAS S. Caspase 1 involvement in human monocyte lysis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 4448-4455.
- KELLY A.P., JANZEN, E.D. A review of morbidity and mortality rates and disease occurrence in North American feedlot cattle. *Can. Vet. J.*, 1986, 496-500.
- KITT T. Über eine experimentelle, der Rinderseuche ähnliche Infektionskrankheit. *Sitzungsber. Ges. Morphol. Physiol. Muenchen*, 1885, 140-168.
- KOLODRUBETZ D., DAILEY T., EBERSOLE J., KRAIGE. Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.*, 1989, **57**, 1465-1469.
- KOROSTOFF J., WANG J.F., KIEBA I., MILLER M., SHENKER B.J., LALLY E.T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 4474-4483.
- KOROSTOFF J., YAMAGUCHI N., MILLER M., KIEBA I., LALLY E.T. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. *Microb. Pathog.*, 2000, **29**, 267-278.
- KUHNERT P., HEYBERGER-MEYER B., NICOLET J., FREY J. Characterization of PaxA and its operon: a cohemolytic RTX toxin determinant from pathogenic *Pasteurella aerogenes*. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 6-12.
- KUHNERT P., SCHLATTER Y., FREY J. Characterization of the type I secretion system of the RTX toxin ApxII in "*Actinobacillus porcitonisillarum*". *Vet. Microbiol.*, 2005, **107**, 225-232.
- KUROIWA Y., KASINATHAN P., CHOI Y.J., NAEEM R., TOMIZUKA K., SULLIVAN E.J., KNOTT J.G., DUTEAU A., GOLDSBY R.A., OSBORNE B.A., ISHIDA I., ROBL J.M. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nat. Biotechnol.*, 2002, **20**, 889-894.
- KUROIWA Y., KASINATHAN P., MATSUSHITA H., SATHIYASELAN J., SULLIVAN E.J., KAKITANI M., TOMIZUKA K., ISHIDA I., ROBL J.M. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat. Genet.*, 2004, **36**, 775-780.
- LAFLEUR R.L., ABRAHAMSEN M.S., MAHESWARAN S.K. The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 4087-4092.
- LALLY E.T., GOLUB E.E., KIEBA I.R., TAICHMAN N.S., ROSENBLUM J., ROSENBLUM J.C., GIBSON C.W., DEMUTH D.R. Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. Delineation of unique features and comparison to homologous toxins. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 15451-15456.
- LALLY E.T., KIEBA I.R., SATO A., GREEN C.L., ROSENBLUM J., KOROSTOFF J., WANG J.F., SHENKER B.J., ORTLEPP S., ROBINSON M.K., BILLINGS P.C. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 30463-30469.
- LALONDE G., MCDONALD T.V., GARDNER P., O'HANLEY P.D. Identification of a hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and characterization of its channel properties in planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 13559-13564.
- LAWRENCE P.K., NELSON W.R., LIU W., KNOWLES D.P., FOREYT W.J., SRIKUMARAN S. beta(2) integrin Mac-1 is a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine and ovine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2008, **122**, 285-294.
- LEAR J.D., FURBLUR U.G., LALLY E.T., TANAKA J.C. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin forms large conductance, voltage-gated ion channels when incorporated into planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1238**, 34-41.
- LEKEUX P., AMORY H., DESMECHT D., GUSTIN P., LINDEN A., ROLLIN F. Oxygen transport chain in double-muscling blue Belgian cattle. *Br. Vet. J.*, 1994, **150**, 463-471.

- LI J., CLINKENBEARD K.D., RITCHEY J.W. Bovine CD18 identified as a species specific receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet. Microbiol.*, 1999, **67**, 91-97.
- LILIE H., HAEHNEL W., RUDOLPH R., BAUMANN U. Folding of a synthetic parallel beta-roll protein. *FEBS Lett.*, 2000, **470**, 173-177.
- LIU W., BRAYTON K.A., DAVIS W.C., MANSFIELD K., LAGERQUIST J., FOREYT W., SRIKUMARAN S. *Mannheimia (pasteurella) haemolytica* leukotoxin utilizes CD18 as its receptor on bighorn sheep leukocytes. *J. Wildl. Dis.*, 2007, **43**, 75-81.
- LIU W., BRAYTON K.A., LAGERQUIST J., FOREYT W.J., SRIKUMARAN S. Cloning and comparison of bighorn sheep CD18 with that of domestic sheep, goats, cattle, humans and mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2006, **110**, 11-16.
- LO R.Y. Molecular characterization of cytotoxins produced by *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, S33-35.
- LOPEZ A. Respiratory system, thoracic cavity and pleura. In: Thomson's Special Veterinary Pathology, M. McGavin, W. Carlton et J. Zachary: Saint-Louis Missouri, 2001, 125-196.
- LU C., OXVIG C., SPRINGER T.A. The structure of the beta-propeller domain and C-terminal region of the integrin alphaM subunit. Dependence on beta subunit association and prediction of domains. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 15138-15147.
- LUDWIG A., SCHMID A., BENZ R., GOEBEL W. Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, **226**, 198-208.
- LUO C., WANG K., LIU DE Q., LI Y., ZHAO Q.S. The functional roles of lipid rafts in T cell activation, immune diseases and HIV infection and prevention. *Cell. Mol. Immunol.*, 2008, **5**, 1-7.
- MAGA E.A., CULLOR J.S., SMITH W., ANDERSON G.B., MURRAY J.D. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2006, **3**, 384-392.
- MAHESWARAN S.K., WEISS D.J., KANNAN M.S., TOWNSEND E.L., REDDY K.R., WHITELEY L.O., SRIKUMARAN S. Effects of *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxin on bovine neutrophils: degranulation and generation of oxygen-derived free radicals. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1992, **33**, 51-68.
- MANGAN D.F., TAICHMAN N.S., LALLY E.T., WAHL S.M. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 3267-3272.
- MARTEL J.L., CHASLUS-DANCLA E., COUDERT M., POUMARAT F., LAFONT J.P. Survey of antimicrobial resistance in bacterial isolates from diseased cattle in France. *Microb. Drug Resist.*, 1995, **1**, 273-283.
- MARTIN S.W., MEEK A.H., DAVIS J.A., CURTIS R.A. Factors associated with morbidity and mortality in feedlot cattle calves. The Bruce County Beef Project, year two. *Can. J. Comp. Med.*, 1981, 103-112.
- MAYER G., BLIND M., NAGEL W., BOHMT., KNORR T., JACKSON C.L., KOLANUS W., FAMULOK M. Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, **98**, 4961-4965.
- MENA-ROJAS E., VAZQUEZ CRUZ C., VACA PACHECO S., GARCIA GONZALEZ O., PEREZ-MARQUEZ V.M., PEREZ-MENDEZ A., IBARRA-CABALLERO J., DE LA GARZA M., ZENTENO E., NEGRETE-ABASCAL E. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110-kDa putative RTX protein. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, **232**, 83-87.
- MENESTRINA G. *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism. *FEBS Lett.*, 1988, **232**, 217-220.
- MENESTRINA G., MACKMAN N., HOLLAND I.B., BHAKDI S. *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **905**, 109-117.
- MITRA A., HRUSKA K.S., WELLNITZ O., KERR D.E., CAPUCO A.V., WALL R.J. EXPRESSION of lysostaphin in milk of transgenic mice affects the growth of neonates. *Transgenic Res.*, 2003, **12**, 597-605.
- MOLBAK K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2004, **51**, 364-369.
- MOROVA J., OSICKA R., MASIN J., SEBOP. RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, **105**, 5355-5360.
- MORTON R.J., SIMONS K.R., CONFER A.W. Major outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serovars 1-15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars. *Vet. Microbiol.*, 1996, **51**, 319-330.
- MUGGLI-COCKETT N.E., CUNDIFF L.V., GREGORY K.E. Genetic analysis of bovine respiratory disease in beef calves during the first year of life. *J. Anim. Sci.*, 1992, **70**, 2013-2019.
- MUIR W.M. The threats and benefits of GM fish. *EMBO Rep.*, 2004, **5**, 654-659.
- NCBI TAXONOMY BROWSER *Mannheimia haemolytica* serotype 1. [en ligne] (sans date) Adresse URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=45201&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock, consulté le 3 avril 2009.
- NEWSON I.E., CROSS, F. Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1932, **80**, 711-719.
- O'BRIEN J.K., DUFFUS W.P. *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: relative susceptibility of bovine

- leucocytes. *Vet. Microbiol.*, 1987, **13**, 321-334.
- OHTA Y., GOTOH M., OHZATO H., FUKUZAKI T., NISHIHARA M., DONO K., UMESHITA K., SAKON M., YAGITA H., OKUMURA K., TANAKA T., KAWASHIMA H., MIYASAKA M., MONDEN M. Direct antigen presentation through binding of donor intercellular adhesion molecule-1 to recipient lymphocyte function-associated antigen-1 molecules in xenograft rejection. *Transplantation*, 1998, **65**, 1094-1100.
- ORTIZ-CARRANZA O., CZUPRYNSKI C.J. Activation of bovine neutrophils by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin is calcium dependent. *J. Leukoc. Biol.*, 1992, **52**, 558-564.
- PERINO L.J. Overview of the bovine respiratory disease complex. *Comp. Cont. Educ. Prac. Vet.*, 1992, 53-56.
- PURDY C.W., RALEIGH R.H., COLLINS J.K., WATTS J.L., STRAUS D.C. Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves. *Curr. Microbiol.*, 1997, **34**, 244-249.
- QUIRIE M., DONACHIE W., GILMOUR N.J. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet. Rec.*, 1986, **119**, 93-94.
- RAPPOPORT J.Z., SIMON S.M., BENMERAH A. Understanding living clathrin-coated pits. *Traffic*, 2004, **5**, 327-337.
- RICHT J.A., KASINATHAN P., HAMIR A.N., CASTILLA J., SATHIYASEELAN T., VARGAS F., SATHIYASEELAN J., WU H., MATSUSHITA H., KOSTER J., KATO S., ISHIDA I., SOTO C., ROBL J.M., KUROIWA Y. Production of cattle lacking prion protein. *Nat. Biotechnol.*, 2007, **25**, 132-138.
- ROBL J.M., WANGZ., KASINATHAN P., KUROIWA Y. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology*, 2007, **67**, 127-133.
- ROTH J.A. Immunosuppression and immunomodulation in bovine respiratory disease. In : Loan R.W. (Ed.), proceedings of bovine respiratory disease, a symposium, Amarillo, Texas on 7th September 1983. A&M University: Texas, 1984, 143-192.
- ROY R. A decade of glycodendrimer chemistry. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2003, **15**, 291-310.
- SATRAN P., NEDBALCOVA K. Prevalence of serotypes, production of Apx toxins, and antibiotic resistance in strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in the Czech Republic. *Vet. Med.*, 2002, **47**, 92-98.
- SCHALLER A., DJORDJEVIC S.P., EAMENS G.J., FORBES W.A., KUHN R., KUHNERT P., GOTTSCHALK M., NICOLET J., FREY J. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. *Vet. Microbiol.*, 2001, **79**, 47-62.
- SCHALLER A., KUHN R., KUHNERT P., NICOLET J., ANDERSON T.J., MACINNES J.I., SEGERS R.P., FREY J. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 1999, **145**, 2105-2116.
- SCHALLER A., KUHNERT P., DE LA PUENTE-REDONDO V.A., NICOLET J., FREY J. Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. *Vet. Microbiol.*, 2000, **74**, 365-376.
- SHAMAH S.M., HEALY J.M., CLOAD S.T. Complex target SELEX. *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 130-138.
- SHEWEN P.E., WILKIE B.N. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect. Immun.*, 1982, **35**, 91-94.
- SHIELS P.G., JARDINE A.G. Dolly, no longer the exception: telomeres and implications for transplantation. *Cloning Stem Cells*, 2003, **5**, 157-160.
- SHIMAOKA M., SPRINGER T.A. Therapeutic antagonists and the conformational regulation of the beta2 integrins. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004, **4**, 1485-1495.
- SHUSTER D.E., KEHRLI M.E., JR., ACKERMANN M.R., GILBERT R.O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, **89**, 9225-9229.
- SILFLOW R.M., FOREYT W.J. Susceptibility of phagocytes from elk, deer, bighorn sheep, and domestic sheep to *Pasteurella haemolytica* cytotoxins. *J. Wildl. Dis.*, 1994, **30**, 529-535.
- SLOCOMBE R.F., MALARK J., INGERSOLL R., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 2253-2258.
- SMITH G.R. The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions of sheep. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1961, **81**, 431-440.
- SNEATH P.H., STEVENS M. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1990, **40**, 148-153.
- SOLA I., CASTILLA J., PINTADO B., SANCHEZ-MORGADO J.M., WHITELAW C.B., CLARK A.J., ENJUANES L. Transgenic mice secreting coronavirus neutralizing antibodies into the milk. *J. Virol.*, 1998, **72**, 3762-3772.
- SOLER E., THEPOT D., RIVAL-GERVIER S., JOLIVET G., HOUEBINE L.M. Preparation of recombinant proteins in milk to improve human and animal health. *Reprod. Nutr. Dev.*, 2006, **46**, 579-588.
- SOLOAGA A., VEIGA M.P., GARCIA-SEGURA L.M., OSTOLAZA H., BRASSEUR R., GONI F.M. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol. Microbiol.*, 1999, **31**, 1013-1024.
- SPEER N.C., YOUNG C., ROEBER D. The importance of preventing bovine respiratory disease: a beef industry review. *Bov. Prac.*, 2001, **35**, 189-196.

- STEVENS P.K., CZUPRYNSKI C.J. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytesto undergo morphologic changes consistent with apoptosis in vitro. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 2687-2694.
- SUN Y., CLINKENBEARD K.D., CLARKE C., CUDD L., HIGHLANDER S.K., DABO S.M. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induced apoptosis of bovine lymphocytes involves DNA fragmentation. *Vet. Microbiol.*, 1999a, **65**, 153-166.
- SUN Y., CLINKENBEARD K.D., CUDD L.A., CLARKE C.R., CLINKENBEARD P.A. Correlation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin binding with susceptibility to intoxication of lymphoid cells from various species. *Infect. Immun.*, 1999b, **67**, 6264-6269.
- SUN Y., CLINKENBEARD K.D., OWNBY C.L., CUDD L., CLARKE C.R., HIGHLANDER S.K. Ultrastructural characterization of apoptosis in bovine lymphocytes exposed to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, 2000, **61**, 51-56.
- TAICHMAN N.S., IWASE M., LALLY E.T., SHATTIL S.J., CUNNINGHAM M.E., KORCHAK H.M. Early changes in cytosolic calcium and membrane potential induced by *Actinobacillus actinomyces* *temcomitans* leukotoxin in susceptible and resistant target cells. *J. Immunol.*, 1991, **147**, 3587-3594.
- TANAKA K., FUJIMOTO Y., TANAKA S.-I., MORI Y., FUKASE K. Chemistry and chemical biology. Springer: Berlin, 2008, 1240.
- TATUM F.M., BRIGGS R.E., SREEVATSAN S.S., ZEHR E.S., LING HSUAN S., WHITELEY L.O., AMES T.R., MAHESWARAN S.K. Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence. *Microb. Pathog.*, 1998, **24**, 37-46.
- THUMBIKAT P., BRIGGS R.E., KANNAN M.S., MAHESWARAN S.K. Biological effects of two genetically defined leukotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*. *Microb. Pathog.*, 2003, **34**, 217-26.
- THUMBIKAT P., DILEEPAN T., KANNAN M.S., MAHESWARAN S.K. Characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin interaction with bovine alveolar macrophage beta2 integrins. *Vet. Res.*, 2005, **36**, 771-786.
- TIAN L., YOSHIHARA Y., MIZUNO T., MORI K., GAHMBERG C.G. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J. Immunol.*, 1997, **158**, 928-36.
- TOUAIBIA M., ROY R. Glycodendrimers as anti-adhesion drugs against type 1 fimbriated *E. coli* uropathogenic infections. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2007, **7**, 1270-83.
- URRUTIA R., HENLEY J.R., COOK T., MCNIVEN M.A. The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, 377-84.
- VAN DE SANDE-BRUIJNSMA N., GRUNDMANN H., VERLOO D., TIEMERSMA E., MONEN J., GOOSSENS H., FERECHE M. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008, **14**, 1722-30.
- VANDENBERGH P.G., ZECCHINON L., FETT T., DESMECHT D. Lymphocyte function-associated antigen-1 is a receptor for *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIII toxin on porcine (*Sus scrofa*) leukocytes, *soumis*.
- VARKI A., SHARON N. Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 2008, 653 p.
- VOGEL J.G., PARROTT C. Mortality survey in feedyards: the incidence of death from digestive, respiratory and other causes in feedyards on the Great plains. *Compend. Contin. Educ. Prac. Vet.*, 1994, **16**, 227-234.
- WALKER R.D., HOPKINS F.M., SCHULTZ T.W., MCCracken M.D., MOORE R.N. Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 2429-2433.
- WALL R.J., POWELL A.M., PAAPE M.J., KERR D.E., BANNERMAN D.D., PURSEL V.G., WELLS K.D., TALBOT N., HAWK H.W. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol.*, 2005, **23**, 445-451.
- WANG J.F., KIEBA I.R., KOROSTOFF J., GUO T.L., YAMAGUCHI N., ROZMIAREK H., BILLINGS P.C., SHENKER B.J., LALLY E.T. Molecular and biochemical mechanisms of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced cell death. *Microb. Pathog.*, 1998a, **25**, 317-331.
- WANG L.X. Chemoenzymatic synthesis of glycopeptides and glycoproteins through endoglycosidase-catalyzed transglycosylation. *Carbohydr. Res.*, 2008, **343**, 1509-1522.
- WANG Z., CLARKE C., CLINKENBEARD K. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils. *Infect. Immun.*, 1998b, **66**, 1885-1890.
- WATTS J.L., YANCEY R.J., JR., SALMON S.A., CASE C.A. A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, **32**, 725-731.
- WEISS D.J., BAUER M.C., WHITELEY L.O., MAHESWARAN S.K., AMES T.R. Changes in blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 337-344.
- WELCH R.A., HULL R., FALKOW S. Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1983, **42**, 178-186.
- WHITELEY L.O., MAHESWARAN S.K., WEISS D.J., AMES T.R., KANNAN M.S. *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis. *J. Vet. Intern. Med.*, 1992, **6**, 11-22.

- YAMAGUCHI N., KIEBA I.R., KOROSTOFF J., HOWARD P.S., SHENKER B.J., LALLY E.T. Maintenance of oxidative phosphorylation protects cells from *Actinobacillus actinomyces* leukotoxin-induced apoptosis. *Cell. Microbiol.*, 2001, **3**, 811-823.
- YATES W.D. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.*, 1982, **46**, 225-263.
- YOO H.S., RAJAGOPAL B.S., MAHESWARAN S.K., AMES T.R. Purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages. *Microb. Pathog.*, 1995, **18**, 237-252.
- YOUNAN M., FODOR L. Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res. Vet. Sci.*, 1995, **58**, 98.
- ZECCHINON L., FETT T., BAISE E., DESMECHT D. Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*. *Mol. Membr. Biol.*, 2004, **21**, 289-295.
- ZECCHINON L., FETT T., DESMECHT D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet. Res.*, 2005, **36**, 133-156.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. Anatomy of the lymphocyte function-associated antigen-1. *Clin. Applied. Immunol. Rev.*, 2006a, **6**, 149-172.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. Bind another day: The LFA-1/ICAM-1 interaction as therapeutic target. *Clin. Applied. Immunol. Rev.*, 2006b, **6**, 173-189.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. LFA-1 and associated diseases: the dark side of a receptor. *Clin. Applied. Immunol. Rev.*, 2006c, **6**, 201-216.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. EGF-3 domain of bovine CD18 is not sufficient to mediate *Mannheimia haemolytica* leukotoxin species-specificity, soumis.
- ZHAO Y., SATO Y., ISAJI T., FUKUDA T., MATSUMOTO A., MIYOSHI E., GU J., TANIGUCHI N. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS J.*, 2008, **275**, 1939-1948.
- ZUELKE K.A. Transgenic modification of cows milk for value-added processing. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1998, **10**, 671-676.

5. La plateforme d'attachement de la leucotoxine sur le CD18

5.1. Implication du CD18

Dans le contexte de l'interaction de la LKT avec les β_2 -intégrines des ruminants, plusieurs études ont montré que l'effet cytotoxique de la LKT est atténué, voire supprimé, lorsque des leucocytes bovins sont préalablement incubés avec des anticorps dirigés contre les sous-unités CD11a ou CD18 du LFA-1 (Ambagala *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Jeyaseelan *et al.*, 2000). L'identification précise de la sous-unité liant la LKT a toutefois longtemps été controversée, le CD18 (Wang *et al.*, 1998a; Ambagala *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999) et le CD11a (Jeyaseelan *et al.*, 2000) ayant chacun leurs partisans. Aujourd'hui, cependant, les auteurs s'accordent sur le rôle primordial du CD18 et ce grâce à quelques avancées significatives. Ainsi, le professeur Srikumaran et son équipe ont mis en évidence par immunomarquage et séquençage N-terminal que la leucotoxine se fixait sur les différentes β_2 -intégrines contenues dans des lysats de neutrophiles bovins et qu'une préincubation de ces neutrophiles avec un anticorps monoclonal spécifique du CD18 réduisait les effets cytotoxiques (Ambagala *et al.*, 1999). Ils ont ensuite élégamment démontré que le CD18 était nécessaire et suffisant pour entraîner la cytolysse de leucocytes en rendant une lignée murine, réputée résistante à la leucotoxine, sensible à cette dernière après transfection stable de l'ADN complémentaire encodant le CD18 bovin, lequel se retrouvait exprimé en surface, associé au CD11a murin (Deshpande *et al.*, 2002). Ils ont par ailleurs, tout récemment, réitéré l'expérience avec le CD18 ovin (*Ovis aries* et *Ovis canadensis*) et obtenu des résultats similaires (Dassanayake *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007). De plus, ces auteurs observent une forte corrélation entre le degré d'expression en surface du CD18 bovin (PMNs bovins > lymphocytes bovins ~ lignée transfectée) et la probabilité de cytolysse des cellules, ce qui s'explique par le fait que si les lymphocytes et la lignée transfectée n'expriment que le LFA-1 bovin et murin/bovin, respectivement, les PMNs quant à eux arborent toutes les β_2 -intégrines ; on sait en effet que la LKT se lie également au CD18 du Mac-1 bovin ou ovin (Lawrence *et al.*, 2008) et du CR4 ovin (Lawrence et Dassanayake, 2010). De son côté, l'équipe du professeur Maheswaran a montré que si la leucotoxine se liait à la fois au CD18 du LFA-1 et du Mac-1 (Thumbikat *et al.*, 2005) ainsi qu'au LFA-1 porcin (Jeyaseelan *et al.*, 2000), les événements postérieurs à la liaison comme l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire et la phosphorylation de la queue cytoplasmique du CD18 n'étaient observés qu'avec le LFA-1 bovin (Jeyaseelan *et al.*, 2000; Jeyaseelan *et al.*, 2001; Thumbikat *et al.*, 2005). En outre, des expérimentations avec des inhibiteurs du *I domain* du CD11a et des anticorps dirigés contre le *I-like domain* du CD18 donnent à penser que la leucotoxine se lie au CD18 (mais pas au niveau du *I-like domain* bien que celui-ci jouerait un rôle critique dans la signalisation induite par la leucotoxine conduisant à l'activation) et qu'à hautes concentrations en toxine, cette liaison serait suffisante pour provoquer l'oligomérisation toxinique, la formation de pores, un influx de calcium et des dommages cellulaires menant à la cytolysse via toutes les β_2 -intégrines (Thumbikat *et al.*, 2005). La leucotoxine interagirait également avec le *I domain* du CD11a, mais pas avec celui du

CD11b ou du CD11c (Jeyaseelan *et al.*, 2000), pour initier une cascade de signalisation conduisant à l'activation cellulaire (Yoo *et al.*, 1995) et à l'apoptose (Stevens et Czuprynski, 1996), événements qui prendraient toute leur ampleur lorsque la leucotoxine se trouverait en plus faible concentration (Thumbikat *et al.*, 2005). Par ailleurs, une cotransfection de la lignée d'origine humaine K-562, n'exprimant naturellement aucune β_2 -intégrine, par les CD11a et CD18 bovins, conduit (i) à l'expression en surface de l'hétérodimère, (ii) à la liaison de la leucotoxine sur le LFA-1 ainsi que sur le CD11a et le CD18 seuls (par déplétion de lysats cellulaires par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps spécifiques), (iii) à la phosphorylation de la tyrosine de la queue cytoplasmique du CD18, (iv) à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et (v) à la cytolysse (Dileepan *et al.*, 2005b). Enfin, la cotransfection de cette même lignée avec les ADN complémentaires encodant les CD11a bovin et CD18 humain conduit à l'expression en surface de l'hétérodimère mais pas à la fixation de la leucotoxine (Dileepan *et al.*, 2005a).

En conclusion, toutes ces données suggèrent dans leur ensemble que c'est l'interaction entre la LKT et la sous-unité CD18 des β_2 -intégrines des ruminants qui est responsable de la spécificité de la virulence de la LKT, et donc de *M. haemolytica*, envers les leucocytes de ces derniers. Plus précisément, (i) la leucotoxine doit nécessairement se fixer sur la sous-unité CD18 des β_2 -intégrines des ruminants et du porc à un domaine autre que le *I-like domain*, (ii) cette liaison serait, à haute concentration en toxine, suffisante pour induire la formation de pores et la nécrose et (iii) la liaison avec le CD11a des ruminants (via le *I domain*) ou de la souris permettrait, à plus faibles concentrations en toxine, de par une interaction avec le *I-like domain* du CD18, le déclenchement des cascades d'activation cellulaire conduisant à l'apoptose.

Récemment, deux équipes occupées à identifier le site précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18 bovin publièrent des résultats apparemment contradictoires (cf. paragraphes 5.2 et 5.3). Elles ont tablé sur l'ingénierie de lignées cellulaires stables exprimant des LFA-1 chimériques murin/bovin (Gopinath *et al.*, 2005) ou humain/bovin (Dileepan *et al.*, 2005a) mais selon deux principes opposés, soit rendre sensible une lignée cellulaire qui ne l'est pas en intégrant des fragments du CD18 bovin dans un LFA-1 murin (Gopinath *et al.*, 2005), soit rendre résistante une lignée sensible en intégrant des fragments du CD18 humain dans un LFA-1 bovin (Dileepan *et al.*, 2005a).

5.2. Implication du segment N-terminal : le peptide signal

Pour identifier le site de liaison de la LKT au CD18, l'équipe du Professeur Srikumaran a utilisé une lignée cellulaire mastocytaire de souris (P815) exprimant naturellement le LFA-1 murin et donc résistante à la toxine. A partir de ces cellules, ils ont créé une lignée stable exprimant le CD18 bovin, lequel, après hétérodimérisation avec le CD11a endogène, était exprimé en surface, rendant la lignée cellulaire sensible à la LKT. Ils ont ensuite généré un jeu de gènes artificiels encodant des CD18 chimériques constitués de différentes combinaisons des modules constitutifs des CD18 murin et bovin, les ont transfectés en cellules P815 et ont dérivé les clones correspondants, chacun exprimant

une chimère particulière. En testant la cytotoxicité de la LKT envers ces diverses lignées clonales, ils en ont ensuite déduit que le site responsable de la reconnaissance de la toxine de *M. haemolytica* se situait dans les 291 premiers acides aminés du CD18 bovin, c'est-à-dire dans la portion extracellulaire contenant successivement (i) le peptide signal, (ii) le domaine PSI (*plexin-semaphorin-integrin*), (iii) le site d'adhésion dépendant des ions métalliques (MIDAS, *metal ion-dependent adhesion site*) et (iv) une partie du *I-like domain* (Gopinath *et al.*, 2005). Quelques années plus tard, ils ont affiné leur découverte en tentant d'inhiber la cytolyse des BL-3 (lignée cellulaire de lymphome bovin) et de PMN de ruminants par différents peptides constitutifs de cette partie N-terminale. Ce faisant, ils ont déterminé que le segment conférant la sensibilité à la LKT se trouvait dans le peptide signal et que ce dernier n'était pas clivé chez les ruminants. En effet, les CD18 des espèces sensibles possèdent une glutamine localisée en -5 en amont (5') du site de clivage (en position 18 absolue) ce qui empêche ce clivage (figure 6) (von Heijne, 1983; Rutz *et al.*, 2006; Shanthalingam et Srikumaran, 2009). Ils ont confirmé l'importance de ce résidu en le modifiant en glycine (présente chez l'homme et la souris) et obtenu un CD18 bovin muté résistant à la LKT.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Ruminants																							
<i>Bos taurus</i>	M	L	R	Q	R	P	Q	L	L	L	L	A	G	L	L	A	L	Q	S	V	L	S	Q
<i>Bison bison</i>	M	L	R	Q	R	P	Q	L	L	L	L	A	G	L	L	A	L	Q	S	V	L	S	Q
<i>Bubalus bubalis</i>	M	L	R	Q	R	P	Q	L	L	F	L	S	G	L	L	A	L	Q	S	V	L	S	Q
<i>Capra hircus</i>	M	L	P	Q	R	P	Q	L	L	L	L	A	G	L	L	A	L	Q	S	V	L	S	Q
<i>Ovis aries</i>	M	L	P	Q	R	P	Q	L	L	L	L	A	G	L	L	S	L	Q	S	V	L	S	Q
<i>Ovis canadensis</i>	M	L	P	Q	R	P	Q	L	L	L	L	A	G	L	L	S	L	Q	S	V	L	S	Q
<i>Odocoileus hemionus</i>	M	L	R	Q	R	P	Q	L	L	L	L	A	G	L	L	A	L	Q	S	V	R	S	Q
<i>Cervus canadensis</i>	M	L	R	Q	R	P	Q	L	L	L	L	A	G	L	L	A	L	Q	S	V	Q	S	Q
Non ruminants																							
<i>Homo sapiens</i>	M	L	G	L	R	P	P	L	L	A	L	V	G	L	L	S	L	G	C	V	L	S	Q
<i>Pan troglodytes</i>	M	L	G	L	R	P	P	L	L	A	L	V	G	L	L	S	L	G	C	V	L	S	Q
<i>Mus musculus</i>	M	L	G	P	H	S	L	L	L	A	L	A	G	L	F	F	L	G	S	A	V	S	Q
<i>Rattus norvegicus</i>	M	L	G	P	H	T	L	L	L	I	L	A	G	L	L	F	L	G	S	A	L	S	Q
<i>Sus scrofa</i>	M	L	C	R	C	S	P	L	L	L	L	V	G	L	L	T	L	R	S	A	L	S	Q

Figure 6 : Comparaison des peptides signaux des CD18 des ruminants et des non-ruminants. Le peptide signal de la glycoprotéine membranaire CD18 des ruminants contient une glutamine (Q) qui empêche le clivage protéasique (flèche). Les positions relative des résidus par rapport au site de clivage et absolue sont indiquées respectivement à la 1^{ère} et 2^{ème} ligne. *Bos taurus* (bovin, Genbank n° M81233), *Bison bison* (bison, EU553919), *Bubalus bubalis* (buffle, AY842449), *Capra hircus* (chèvre, AY452481), *Ovis aries* (mouton, AY484425), *Ovis canadensis* (mouflon canadien, DQ104444), *Odocoileus hemionus* (cerf hémione, EU623794), *Cervus canadensis* (wapiti, EU553918), *Homo sapiens* (homme, NM_000211), *Pan troglodytes* (chimpanzé, NM001034122), *Mus musculus* (souris, X14951), *Rattus norvegicus* (rat brun, NM001037780), *Sus scrofa* (porc, U13941) (Shanthalingam et Srikumaran, 2009).

5.3. Implication du segment C-terminal : le domaine EGF-3

Par contre, le Professeur Maheswaran et ses collaborateurs sont partis d'une lignée cellulaire érythroleucémique humaine (K562) ne synthétisant aucune β_2 -intégrine. Ils ont rendu ces cellules sensibles à la LKT en y exprimant de manière stable le LFA-1 bovin. Ensuite, ils ont modifié le CD18 bovin, en remplaçant des blocs entiers par leurs homologues humains, pour le rendre résistant à la toxine de *M. haemolytica*. Ils ont découvert que les résidus 500 à 600 de la portion extracellulaire du CD18, correspondant aux domaines EGF (*epidermal growth factor*) -2 à -4, étaient impliqués dans la liaison à la LKT, dans l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire et dans la cytolyse (Dileepan *et al.*, 2005a). Par la suite, ils ont approfondi leurs recherches et montré que, plus particulièrement, le domaine EGF-3 (résidus 541-581) était responsable de l'interaction LKT-LFA-1 (Dileepan *et al.*, 2007b).

5.4. Les arguments qui alimentent la controverse

Chacune de ces approches a bien entendu ses inconvénients puisque le remplacement d'un domaine conférant ou abolissant les effets délétères de la toxine ne signifie pas automatiquement que celle-ci s'y lie. En effet, la modification de tel ou tel domaine peut entraîner des modifications de structure globale (par exemple lors du repliement de la protéine) qui, indirectement, altèrent le site de liaison. Ainsi, si le *I domain* du CD11a se replie avant l'association avec le CD18, il n'en est pas de même pour le β -propeller qui reste non replié dans les 12 heures suivant la synthèse du CD11a seul, suggérant que le *I domain* et le β -propeller se replient indépendamment l'un de l'autre et que le second arbore une interface avec le CD18 (Huang et Springer, 1997). Des résultats similaires sont d'ailleurs observés avec le CD11b (Lu *et al.*, 1998).

Ensuite, notons que les CD18 bovin et humain sont constitués de 769 résidus alors que la version murine comprend deux résidus supplémentaires, un au niveau du peptide signal et l'autre étant le 7^{ème} résidu après le dernier domaine EGF. Du point de vue des identités de séquences, le CD18 bovin présente un pourcentage de 83% par rapport à son orthologue humain et 81% par rapport à son orthologue murin. Au niveau des lignées cellulaires, les deux équipes ont utilisé deux préparations biologiques distinctes : d'un côté des mastocytes de souris (P815) et de l'autre des cellules d'érythroleucémie humaine (K562). *A priori*, ces différences ne devraient pas rendre compte des différents résultats obtenus. Par contre, il est intéressant de noter que le protocole de purification de la leucotoxine diffère pour les deux expérimentations : la protéine ayant été purifiée par chromatographie d'immunoaffinité (Gopinath *et al.*, 2005) ou par extraction après électrophorèse en conditions dénaturantes (Dileepan *et al.*, 2005a), ce qui peut sembler *a priori* problématique pour des études de liaison.

Il a aussi été montré que les modules EGF-2, 3 et 4 du CD18 humain étaient critiques pour l'induction de la leucolyse par la LtxA d'*A. actinomycetemcomitans* (Dileepan *et al.*, 2007a).

DEUXIÈME PARTIE :
CONTRIBUTIONS PERSONNELLES

6. Caractérisation de la sous-unité CD11a de la β_2 -intégrine LFA-1 des ruminants

6.1. Dans l'espèce bovine

Fett T., Zecchinon L., Baise E., Desmecht D.

The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA: molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins.

Gene, 2004, 325, 97-101.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Gene 325 (2004) 97–101

GENE
 AN INTERNATIONAL JOURNAL ON
 GENES AND GENOMES
www.elsevier.com/locate/gene

The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA: molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins

T. Fett, L. Zecchinon, E. Baise, D. Desmecht*

Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, University of Liège, FMV Sart Tilman B43, B-4000 Liège, Belgium

Received 18 June 2003; received in revised form 3 September 2003; accepted 17 September 2003

Received by A. Bernardi

Abstract

The bovine cDNA encoding CD11a, a cell-surface glycoprotein involved in multiple leukocyte functions, was sequenced and compared with the human and murine sequences. Despite some focal differences, it shares all the main characteristics of its known mammalian homologs. Along with the bovine CD18-encoding cDNA, which is available for a long time, the sequence data provided here will allow the successful expression of bovine CD11a, thus giving the first opportunity to express the *Bos taurus* β_2 -integrin CD11a/CD18 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$) *in vitro* as a tool to examine the specificities of inflammation in the bovine species.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Integrins; LFA-1; ICAM; Adhesion; Cattle

1. Introduction

CD11a/CD18 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$) is a member of the integrin family of cell surface receptors. Integrins consist of a 120- to 180-kDa α subunit (CD11a in this case) and a 90- to 110-kDa β subunit (CD18 or β_2) that are noncovalently associated single-pass transmembrane proteins (Springer, 1990). The bulk of each integrin subunit is extracellular, where it typically functions as a receptor for extracellular matrix molecules or as a counterreceptor for surface proteins of apposed cells (Hynes, 1992). The heterodimer CD11a/CD18 is expressed on all leucocytes and mediates high affinity adhesion to a variety of cell types that express one or more of the β_2 -integrins ligands, intercellular adhesion molecules (ICAM-1 to -5) (Bailly et al., 1995; Gahmberg, 1997; Tian et al., 1997). The adhesion process mediated is a critical step of a wide range of immunological activities, including cytolysis of target cells, cross-interaction and cross-stimulation between lymphocytes, phagocytosis of complement-

coated targets, and the regulation of leukocyte traffic between the bloodstream and tissues. In this context, increasing our knowledge about bovine β_2 integrins is of great importance to offer new possibilities for research in the field of the pathogenesis of pneumonia and mastitis, i.e., the two leading causes of production losses to the cattle industry throughout the world.

The *Bos taurus* CD18 (β_2) subunit has been well characterised (Shuster et al., 1992), which is not the case of its partner into the LFA-1 heterodimer, CD11a. The purpose of this paper is to report the cloning and sequencing of a cDNA encoding bovine CD11a, along with a comparative sequence analysis with its human and murine homologs.

2. Materials and methods

2.1. RNA isolation

Total RNA from phorbol myristate acetate (PMA)-stimulated (25 ng/ml for 15 min) BL-3 cell line (ATCC No. CRL-8037) was extracted with TRIzol (Invitrogen) as described by the manufacturer. The BL-3 cell line was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with nonessential aminoacids (aa), 20% fetal bovine

Abbreviations: BL-3, bovine lymphoblast; bo, bovine; hu, human; ICAM, intercellular adhesion molecule; kan, kanamycin; LFA, lymphocyte function-associated antigen; mu, murine; PMA, phorbol myristate acetate; RACE, rapid amplification of cDNA ends.

* Corresponding author. Tel.: +32-4-366-4075; fax: +32-4-366-4565.

E-mail address: daniel.desmecht@ulg.ac.be (D. Desmecht).

serum (Gibco BRL), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator.

2.2. Amplification of cDNA ends

We used SMART RACE technology (Clontech Laboratories) to clone bovine CD11a (BoCD11a) 5' - and 3' - ends and RT-PCR to clone full-length BoCD11a CDS. For first-strand cDNA synthesis, and according to the partial sequence of BoCD11a available (GenBank No. AF440778), gene-specific primers were designed, which were expected to give nonoverlapping ~ 1 kb RACE products: a sense primer for the 3' -RACE PCR: 5' -GGCTGAGTCTTGCTCGTTTGAACC-3' (corresponding to nt 3071–3095) and an antisense primer for the 5' -RACE PCR: 5' -CAGGTCTGGCCGGAACACTTCTTTC-3' (nt 794–770). Reverse transcription and polymerase chain reactions (PCR) were carried out according to the instruction manual of the SMART RACE cDNA Amplification Kit. Two 5' - and two 3' -RACE products were obtained and gel-purified using the Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen). After the four fragments were TA-cloned into pCRII-TOPO (Invitrogen), seeded on kanamycin IPTG plates, and miniprep were obtained from colonies grown in 5 ml LB-Kan broth, the clones were sequenced on the ABI-3100 Genetic Analyzer using the Big Dye terminator chemistry.

2.3. Molecular cloning of full-length cDNA

Total RNA from PMA-stimulated BL-3 cell line was reverse transcribed using Improm II (Promega). The full-length cDNA was then generated by long distance PCR using Elongase amplification technology (Invitrogen) with primers designed from the distal ends of both 5' - and 3' -RACE products: CCCAAGAGCCCTCTGAGACT (sense, within the 5' -UTR) and GCACCTCAATCTCCACCACT (antisense, 3' -UTR). The procedures recommended by the manufacturer were followed, with the following cycling parameters: 2 min 30 s at 94 °C, then 35 cycles including: (i) 30 s at 94 °C, (ii) 30 s at 56 °C, and (iii) 3 min 30 s at 68 °C, followed by a final extension at 68 °C for 10 min. Resulting PCR products were then processed for sequencing as aforementioned for the RACE products. The CD11a cDNA sequence was deduced from sequences obtained from five independent clones. Sequence data have been deposited at GenBank under accession No. AY 267467. Homology analyses were carried out using FASTA and alignment of amino acids sequences was drawn by Genedoc (v. 2.6.002).

3. Results and discussion

3.1. Characterisation of BoCD11a-encoding cDNA and deduced aa sequence

The cDNA sequence for BoCD11a contains ~ 4560 bp with an ORF of ~ 3498 bp that codes for 1165 aa

followed by ~ 900 bp in the 3' -UTR (Fig. 1). The mature BoCD11a contains a 23-aa putative leader peptide, an extracellular domain of 1061 residues (24–1084), a single hydrophobic transmembrane region of 24 residues (1085–1108) and a cytoplasmic tail of 57 residues (Fig. 1). Eight *N*-linked putative glycosylation sites (Asn-X-Thr/Ser) are present in the extracellular domain (Fig. 2). The mature protein contains 22 cysteine residues, among which 2 are located into the cytoplasmic tail (Fig. 2). The extracellular domain also contains an inserted (I) domain of 172 amino acids (residues 153–324) quite similar to those found in all the leukocyte integrin α subunits sequenced to date. These I domains are homologous with repeated domains in von Willebrand factor and cartilage matrix protein (Springer, 1990). Three repeats with a divalent cation binding motif are found within the I domain at amino acid residues 465–473, 527–535 and 587–595 (Fig. 2). All the cysteines and all but one of *N*-glycosylation sites are found outside the I region and divalent cation binding motifs (Fig. 2), consistent with the hypothesis that these regions may undergo conformational changes important in ligand binding (Rothlein and Springer, 1986; Larson et al., 1989).

3.2. Comparison among species

Overall, the general organization of bovine, human (Larson et al., 1989) and murine (Kaufman et al., 1991) CD11a proteins is quite similar (Fig. 2). Comparison of sequence homology between BoCD11a and its human and murine counterparts shows overall 77% and 68% identity, respectively, with the highest identity for the cation binding motifs and the lowest identity for the cytoplasmic domains (Table 1). The high conservation of the putative cation binding motifs is consistent with an involvement of these regions in the functional activity of LFA-1 α subunit, as suggested by the requirement of Mg²⁺ and Ca²⁺ for CD11a/CD18-dependent cellular interactions (Rothlein and Springer, 1986) or binding to purified ICAM-1 (Dustin and Springer, 1989). By contrast, the low conservation of the cytoplasmic tail suggests that it is

Table 1
Between-species percent identities of CD11a constitutive blocks

Block	Bo vs. Hu	Bo vs. Mu	Hu vs. Mu
Overall	77	68	71
Putative signal peptide	56	50	32
Extracellular domain	78	70	73
Transmembrane region	91	83	75
Cytoplasmic tail	56	50	62
I-domain	84	72	74
Putative cation binding motif 1	88	66	77
Putative cation binding motif 2	75	87	75
Putative cation binding motif 3	88	77	66

Bo, Hu and Mu: bovine, human and murine CD11a, respectively.

[illegible]

Fig. 1. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *B. taurus* CD11a cDNA. The putative leader peptide and transmembrane region are underlined. Five independent clones were sequenced in both directions. Sequence data have been deposited at GenBank under accession No. AY 267467.

not required to guarantee adequate functioning of LFA-1. This is in agreement with the observation that truncation of the LFA-1 α subunit cytoplasmic domain has no effect on binding to ICAM-1, whereas binding is markedly

diminished by β subunit cytoplasmic domain truncation (Hibbs et al., 1991).

Every cysteine residue in the bovine extracellular portion of mature CD11a is present at the same location in

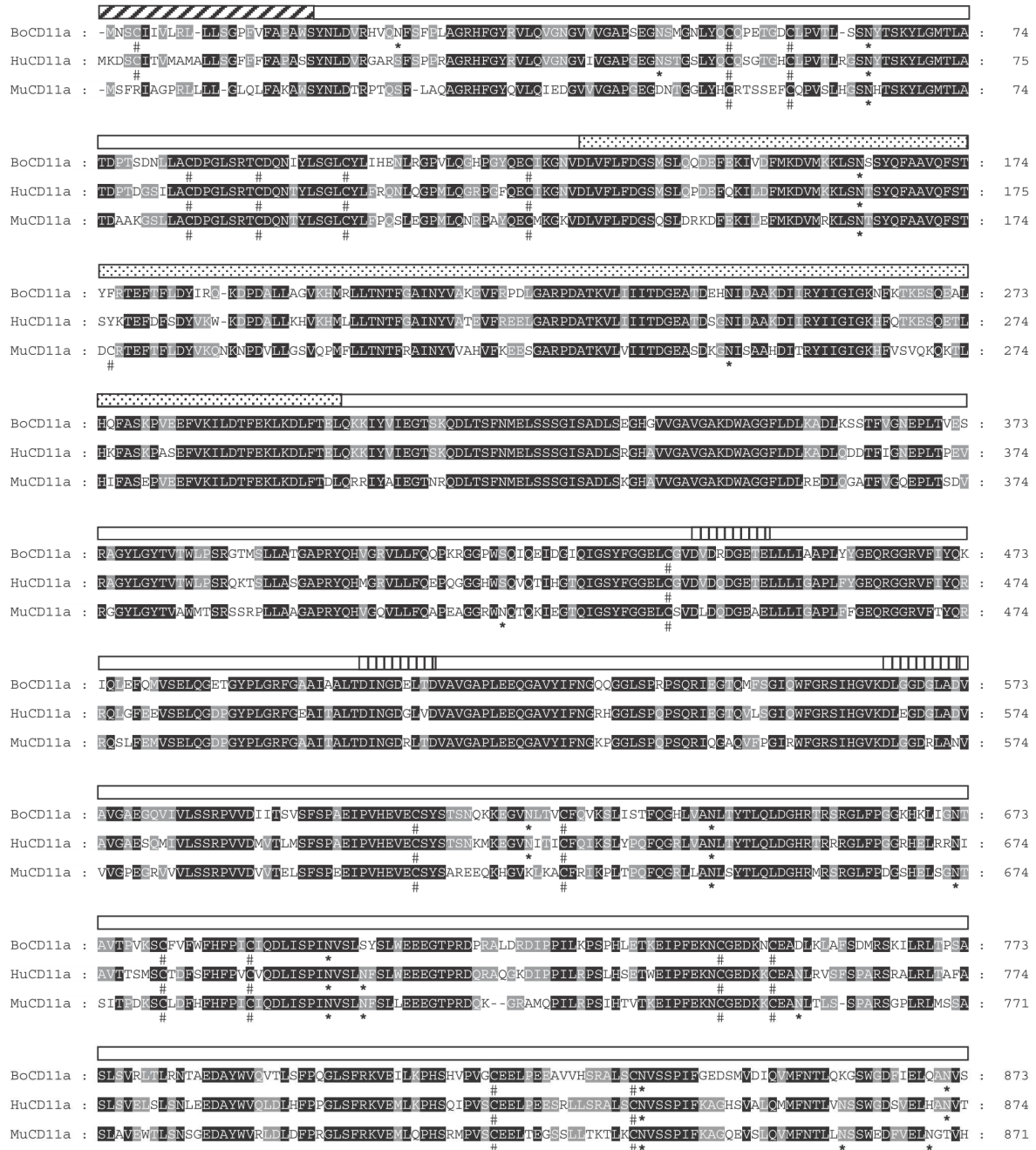


Fig. 2. Comparison of the bovine (Bo-), human (Hu-) and murine α subunits (MuCD11a) amino acid sequences. Cysteine residues (#) and potential N-glycosylation sites (*) are marked. White letters in black and gray boxes indicate conservation among the three or only two species, respectively. The stripe above the sequences represents the deduced different constitutive parts of the protein: signal peptide (diagonal lines), extracellular domain (white), transmembrane region (black), cytoplasmic tail (gray), I-domain (dotted) and divalent cation binding motifs (vertical lines).

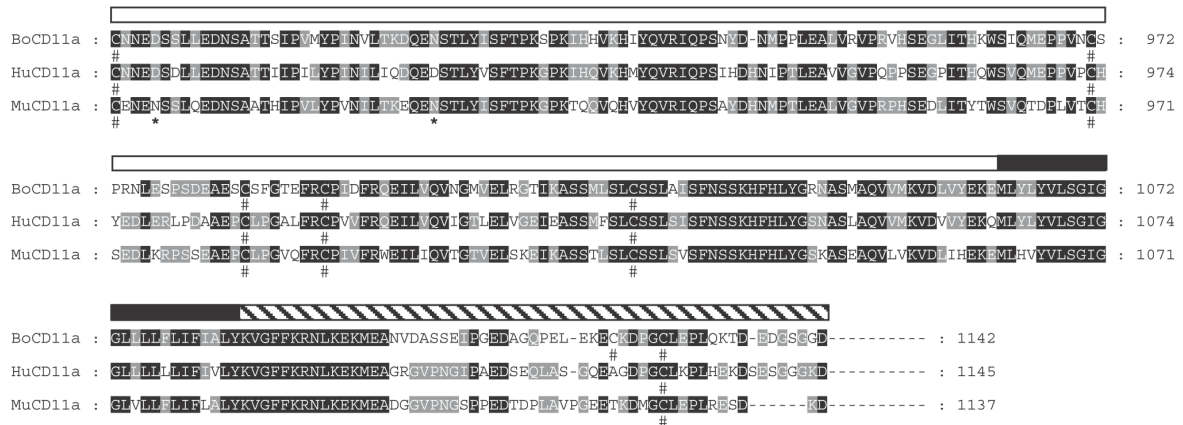


Fig. 2 (continued).

human and murine CD11a, which is consistent with a role in maintaining the global structure of the protein. The mouse version distinguishes by an additional cysteine residue at position 176 within the extracellular portion, whereas the bovine CD11a possesses an additional cysteine at position 1122 into the cytoplasmic tail. Whether this additional cysteine causes enough structural changes to underlie functional modifications remains unknown. Of 14 potential Asn-glycosylation sites in murine CD11a, the ones present at amino acids 247, 421, 673, 753, 857, 876 and 904 are absent from both human and bovine sequences, once more without predictable consequences on a functional point of view.

This study reports for the first time the isolation and sequencing of the bovine LFA-1 α subunit (CD11a) cDNA, and demonstrates that, despite some focal differences, it shares all the main characteristics of its known mammalian homologs. Along with the bovine CD18-encoding cDNA which is available (Shuster et al., 1992), the sequence data provided here allow the successful cloning of BoCD11a, thus giving the first opportunity to express bovine LFA-1 in vitro as a tool to examine the specificities of inflammation in the bovine species.

Acknowledgements

This study is supported by the Belgian federal services for public health and security of the food chain and environment, grant S-6107. The authors are grateful to Prof. M. Georges for giving free access to all the facilities of the

laboratory of molecular genetics and to Prof. J.J. Letesson for the gift of BL-3 cells.

References

- Bailly, P., Tontti, E., Hermand, P., Cartron, J.P., Gahmberg, C.G., 1995. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur. J. Immunol.* 25, 3316–3320.
- Dustin, M., Springer, T., 1989. T cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341, 619–624.
- Gahmberg, C., 1997. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 643–650.
- Hibbs, M., Xu, H., Stacker, S., Springer, T., 1991. Regulation of adhesion to ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science* 251, 1611–1613.
- Hynes, R., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11–25.
- Kaufman, Y., Tseng, E., Springer, T., 1991. Cloning of the murine lymphocyte function-associated molecule-1 α -subunit and its expression in COS cells. *J. Immunol.* 147, 369–374.
- Larson, R., Corbi, A., Berman, L., Springer, T., 1989. Primary structure of the LFA-1 α subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J. Cell Biol.* 108, 703–712.
- Rothlein, R., Springer, T., 1986. The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J. Exp. Med.* 163, 1132–1149.
- Shuster, D., Bosworth, B., Kehrli, M., 1992. Sequence of the bovine CD18-encoding cDNA: comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene* 114, 267–271.
- Springer, T., 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425–434.
- Tian, L., Yoshihara, Y., Mizuno, T., Mori, K., Gahmberg, C.G., 1997. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J. Immunol.* 158, 928–936.

6.2. Dans l'espèce ovine

Fett T., Zecchinon L., Baise E., Desmecht D.

Cloning and characterisation of the primary structure of the sheep
lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit.

Mol Immunol, 2005a, 42, 1503-1508.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Molecular Immunology 42 (2005) 1503–1508

Molecular
Immunologywww.elsevier.com/locate/molimm

Cloning and characterisation of the primary structure of the sheep lymphocyte function-associated antigen-1 α subunit

T. Fett, L. Zecchinon, E. Baise, D. Desmecht*

Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, FMV Sart Tilman B43, B-4000 Liège, Belgium

Received 3 December 2004; accepted 18 January 2005

Available online 25 February 2005

Abstract

The leukocyte integrins play a critical role in a number of cellular adhesive interactions during the immune response. The ovine cDNA encoding CD11a, the predominant α subunit of the β_2 -integrin family, was sequenced and compared with the human, bovine and murine sequences. Despite some focal differences, it shares all the main characteristics of its known mammalian homologues. Along with the ovine CD18-encoding cDNA, which is available for a few months, the sequence data provided here will allow the *Ovis aries* β_2 -integrin CD11a/CD18 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$) expression in vitro as a tool to examine the specificities of inflammation in the ovine species.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Integrin; LFA-1; ICAM; Adhesion; Ovine

1. Introduction

Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) is a member of the β_2 -integrin subfamily of cell surface receptors. Integrins consist of a 120- to 180-kDa α subunit (CD11a in this case) and a 90- to 110-kDa β subunit that are noncovalently associated single-pass transmembrane proteins (Springer, 1990). The bulk of each integrin subunit is extracellular, where it typically functions as a receptor for extracellular matrix molecules or as a counterreceptor for surface proteins of apposed cells (Hynes, 1992). The heterodimer CD11a/CD18 is expressed on all leukocytes and mediates high affinity adhesion to a variety of cell types that express one or more of the β_2 -integrins ligands, intercellular adhesion molecules (ICAM-1 to -5) (Bailly et al., 1995;

Gahmberg, 1997; Tian et al., 1997). The adhesion process mediated is a critical step of a wide range of immunological activities, including cytolysis of target cells, cross-interaction and cross-stimulation between lymphocytes, phagocytosis of complement-coated targets, neutrophils clearance from inflamed tissue, and the regulation of leukocyte traffic between the bloodstream and tissues (Dunne et al., 2003; Hogg et al., 2004; Salas et al., 2004; Yan et al., 2004). As the relevance of the ovine model has been well established in such diverse areas as immunology (Mitazaka and Trnka, 1985), haematology (Zanjani et al., 1997), genomic cloning (Fulka et al., 1998) or asthma (Abraham et al., 2000; Bischof et al., 2003; Collie, 2003), increasing our knowledge about ovine β_2 integrins is of great importance to offer new possibilities for research and to provide additional insights into those fields.

The *Ovis aries* CD18 (β_2) subunit has been well characterised (Zecchinon et al., 2004), which is not the case of its partner into the LFA-1 heterodimer, CD11a. The purpose of this paper is to report the cloning and sequencing of a cDNA encoding ovine CD11a, along with a comparative sequence analysis with its human, bovine and murine homologues.

Abbreviations: Bo, bovine; hu, human; ICAM, intercellular adhesion molecule; IDAS, I-domain allosteric site; kan, kanamycin; LFA, lymphocyte function-associated antigen; MIDAS, metal-ion dependent adhesion site; mu, murine; ov, ovine; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PMA, phorbol myristate acetate; RACE, rapid amplification of cDNA ends; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction

* Corresponding author. Tel.: +32 4 366 4075; fax: +32 4 366 4565.

E-mail address: daniel.desmecht@ulg.ac.be (D. Desmecht).

2. Materials and methods

2.1. RNA isolation

Total RNA from phorbol myristate acetate (PMA)-stimulated (25 ng/ml for 15 min) ovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was extracted with TRIzol (Invitrogen) as described by the manufacturer. The PBMCs were obtained by density gradient centrifugation with Ficoll-Paque Plus (Amersham) and maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco BRL), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.2. Amplification of cDNA ends

We used SMART rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology (Clontech Laboratories Inc.) to obtain ovine CD11a (OvCD11a) 5'- and 3'-ends and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to amplify full-length OvCD11a CDS. For first-strand cDNA synthesis, and according to the sequence of BoCD11a available (GenBank no. AY267467), gene-specific primers were designed which were expected to give non overlapping ~1 kb RACE products: a sense primer for the 3'-RACE PCR: 5'-TGCAATGTRAGCTCTCCCATCTTC-3' (corresponding to nt 2572–2595) and an antisense primer for the 5'-RACE PCR: 5'-CCGGCCTCCTCTCTGCTCCCCATAG-3' (nt 1470–1446). Reverse transcription and polymerase chain reactions (PCR) were carried out according to the instruction manual of the SMART RACE cDNA Amplification Kit. The 5'- and 3'-RACE products were gel-purified using the S.N.A.P.TM Gel Purification Kit (Invitrogen), TA-cloned into pCRII-TOPO (Invitrogen) and seeded on kanamycin IPTG plates. Miniprep were obtained from colonies grown in 5 ml LB-Kan broth and the clones were sequenced on the ABI-3730 Genetic Analyzer using the Big Dye terminator chemistry (Applied Biosystems).

2.3. Molecular cloning of full-length cDNA

Total RNA from PMA-stimulated PBMCs was reverse transcribed using Imprim II (Promega). The full-length cDNA was then generated by long distance PCR using Advantage 2 polymerase (Clontech Laboratories Inc.) with primers designed from the distal ends of both 5'- and 3'-RACE products: 5'-GTCGCCAGTAAATCCCAAGA-3' (sense, within the 5'-UTR) and 5'-GCACCTCAATCTCCACCACT-3' (antisense, 3'UTR). The procedures recommended by the manufacturer were followed, with these cycling parameters: 5 min at 94 °C, then 35 cycles including (i) 30 s at 94 °C, (ii) 30 s at 60.5 °C and (iii) 3 min 30 s at 68 °C, followed by a final extension at 68 °C for 5 min. Resulting PCR products were then processed for sequencing as aforementioned for the RACE products. The CD11a cDNA sequence was deduced from sequences

obtained from nine independent clones. Sequence data have been deposited at GenBank under accession no. AY731091 and AY731092.

2.4. Bioinformatics

Primers design was performed with Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>) and Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000). Nucleotide sequence and similarity analyses were carried out using, respectively, Chromas v.2.21 (<http://www.technelysium.com.au>) and BLAST programs (Altschul et al., 1990). Alignment of amino acids sequences were drawn by GeneDoc v.2.6.002 (Nicholas et al., 1997) following the BLOSUM 62 matrix. SignalP v.2.0.b2 (Nielsen et al., 1997) and NetNGlyc v.1.0 (Jensen et al., 2002) provided peptide signal and N-glycosylation sites prediction, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Characterisation of OvCD11a-encoding cDNA and deduced aa sequence

Two alleles have been identified for the OvCD11a cDNA. The sequence contains ~4200 bp with an ORF of 3498 (Genbank no. AY731092) or 3495 bp (Genbank no. AY731091) depending on the allele that codes for 1165 or 1164 aa followed by ~600 bp in the 3'-UTR (Fig. 1). The mature OvCD11a contains a 23-aa putative leader peptide, an extracellular domain of 1061 or 1062 residues (24–1084/1085), a single hydrophobic transmembrane region of 24 residues (1085/1086–1108/1109) and a cytoplasmic tail of 57 residues (Fig. 1). Seven N-linked putative glycosylation sites (Asn-X-Thr/Ser) are present in the extracellular domain (Fig. 2). The mature protein contains 21 cysteine residues, among which one is located into the cytoplasmic tail (Fig. 2). The extracellular domain also contains an inserted (I) domain of 172 amino acids (residues 153–324) quite similar to those found in all the leukocyte integrin α subunits sequenced to date and located between the β sheets 2 and 3 of a seven bladed β-propeller region (Huang et al., 1997). The I domain is homologous with repeated domains found in von Willebrand factor and cartilage matrix protein (Springer, 1990) and can be expressed as an isolated domain. Its three-dimensional structure consists of a five-stranded parallel β-sheet core surrounded on both faces by α-helices, with a short antiparallel strand occurring on one edge of this sheet (Qu and Leahy, 1995). The I domain contains a metal ion dependent adhesion site (MIDAS) (Lee et al., 1995) (residues 159–163, 228, 261) (Fig. 2) and an I-domain allosteric site (IDAS) that plays a functional role in ICAM-1 binding (Huth et al., 2000; Lupher et al., 2001; Lum et al., 2002). Three repeats with a divalent cation binding motif are found at amino acid residues 465–473, 527–535 and 587–595 (Fig. 2). All the conserved cysteines and all but one N-glycosylation sites are found out-

1505

Fig. 1. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *Ovis aries* CD11a cDNA. The putative leader peptide and transmembrane region are underlined. Nine independent clones were sequenced in both directions. Sequence data have been deposited at GenBank under accession no. AY731091 and AY731092 (shown here). Both sequences differ by a glutamine deletion in position 743 (#) in sequence AY731091.

on binding to ICAM-1, whereas binding is markedly diminished by β subunit cytoplasmic domain truncation (Hibbs et al., 1991). Residue Glu-332 that is located in the linker following the I domain and that is known to be critical for communication to the β_2 I-like domain, rolling, integrin extension and activation by Mn^{2+} of firm adhesion (Salas et al., 2004) is strictly conserved.

Every cysteine residue in the ovine extracellular portion of mature CD11a is present at the same location in bovine, human and murine CD11a, which is consistent with a role in maintaining the global structure of the protein. The mouse

Block	Ov vs. Bo	Ov vs. Hu	Ov vs. Mu
Overall	94	77	68
Putative signal peptide	82	52	41
Extracellular domain	94	78	70
Transmembrane region	95	95	79
Cytoplasmic tail	96	56	50
I-domain	96	86	73
MIDAS	100	100	85
Putative cation binding motif 1	100	88	66
Putative cation binding motif 2	100	75	87
Putative cation binding motif 3	100	88	77

Ov, Bo, Hu and Mu: ovine, bovine, human and murine CD11a, respectively;
MIDAS: metal-ion dependent adhesion site.

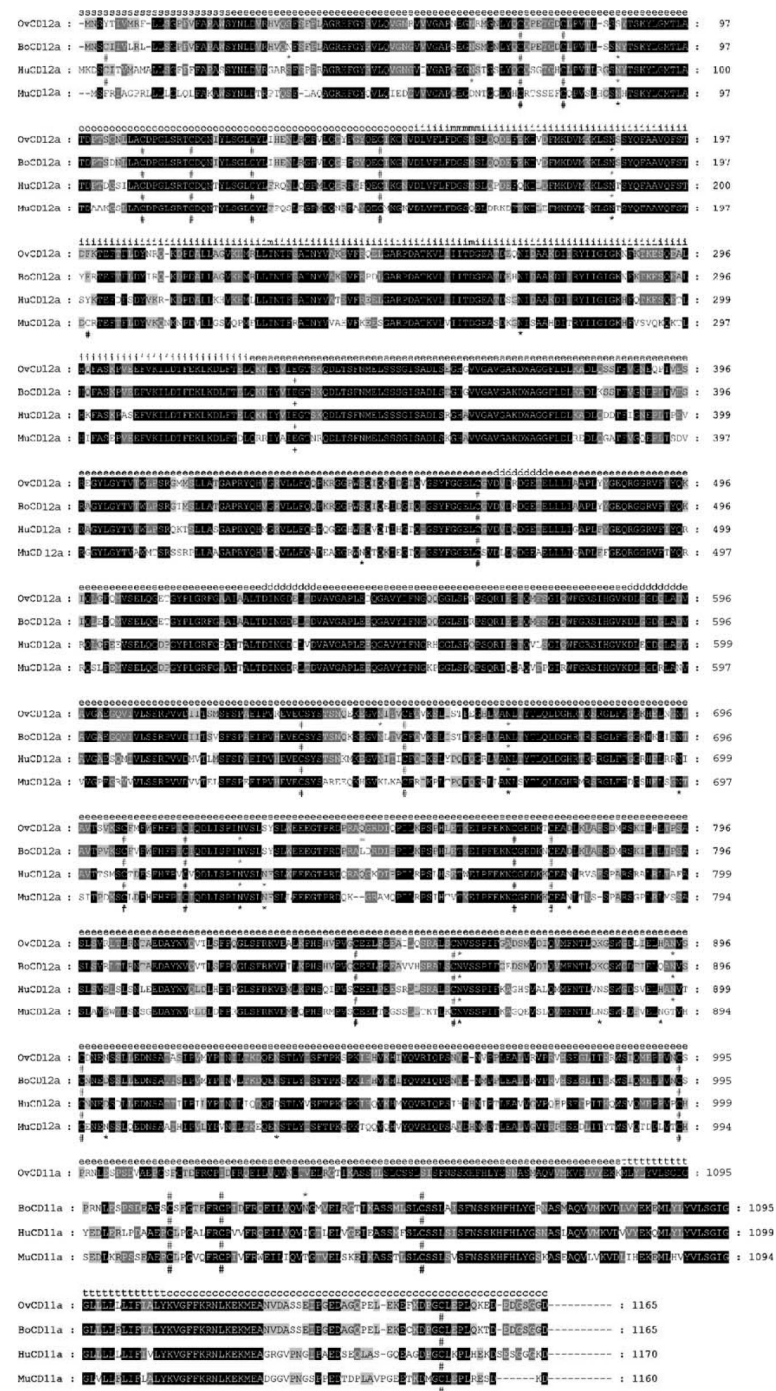


Fig. 2. Comparison of the ovine (Ov-), bovine (Bo-), human (Hu-) and murine (Mu-) α subunits amino acid sequences. The letters in the top row identify the constitutive blocks: putative signal peptide (s), extracellular domain (e), transmembrane region (t), cytoplasmic tail (c), I-domain (i), MIDAS motif (m) and divalent cation binding motifs (d). Black, dark and light gray columns represent identity among 4, 3 and 2 species, respectively. Cysteine residues (#) and potential N-glycosylation sites (*) are marked at the bottom of the sequences. The important Glu-332 residue (+) and the Gln-743 residue, which is absent in the smaller allele (=), are identified.

version distinguishes by an additional cysteine residue at position 199 (mouse numbering) within the extracellular portion. Of seven potential Asn-glycosylation sites in ovine CD11a, the ones present at amino acids 185, 667, 723 and 859 are strictly conserved, one is only absent from murine CD11a (residue 894) and two are only present in ovine CD11a (residues 646 and 1030), once more without predictable consequences on a functional point of view.

This study reports for the first time the isolation and sequencing of the ovine LFA-1 α subunit (CD11a) cDNA, and demonstrates that, despite some focal differences, it shares all the main characteristics of its known mammalian homologues. Along with the ovine CD18-encoding cDNA which is now available (Zecchinon et al., 2004), the sequence data provided here allow the successful cloning of OvCD11a, thus giving the first opportunity to express ovine LFA-1 in vitro as a tool to examine the specificities of inflammation in the ovine species.

Acknowledgements

This study is supported by the Belgian federal services for public health and security of the food chain and environment, grant S-6107. The authors are grateful to Professor M. Georges for giving free access to all the facilities of the laboratory of molecular genetics and to Professor P. Leroy for giving access to the PBMCs.

References

- Abraham, W., Gill, A., Ahmed, A., Sielczak, M.W., Lauredo, I.T., Botnikova, Y., Lin, K.C., Pepinsky, B., Leone, D.R., Lobb, R.R., Adams, S.P., 2000. A small molecule, tight-binding inhibitor of the integrin α (4) β (1) blocks antigen induced responses and inflammation in experimental asthma in sheep. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 603–611.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Bailly, P., Tontti, E., Hermand, P., Cartron, J.P., Gahmberg, C.G., 1995. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur. J. Immunol.* 25, 3316–3320.
- Bischof, R.J., Snibson, K., Shaw, R., Meeusen, E.N., 2003. Induction of allergic inflammation in the lungs of sensitized sheep after local challenge with house dust mite. *Clin. Exp. Allergy* 33, 367–375.
- Collie, D.D., 2003. Comparative, complementary and relevant: the immunological basis of ovine lung allergic responses. *Clin. Exp. Allergy* 33, 282–286.
- Dunne, J.L., Collins, R.G., Beaudet, A.L., Ballantyne, C.M., Ley, K., 2003. Mac-1, but not LFA-1, uses Intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF- α -induced inflammation. *J. Immunol.* 171, 6105–6111.
- Dustin, M., Springer, T., 1989. T cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341, 619–624.
- Fett, T., Zecchinon, L., Baise, E., Desmecht, D., 2004. The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA: molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene* 325, 97–101.
- Fulka, J., First, N., Loi, P., Moor, R., 1998. Cloning by somatic cell nuclear transfer. *Bioessays* 20, 847–851.
- Gahmberg, C., 1997. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 643–650.
- Hibbs, M., Xu, H., Stacker, S., Springer, T., 1991. Regulation of adhesion to ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin β subunit. *Science* 251, 1611–1613.
- Huang, C., Lu, C., Springer, T.A., 1997. Folding of the conserved domain but not of flanking regions in the integrin β subunit requires association with the α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3156–3161.
- Huth, J.R., Olejniczak, E.T., Mendoza, R., Liang, H., Harris, E.A.S., Lupher Jr., M.L., Wilson, A.E., Fesik, S.W., Staunton, D.E., 2000. NMR and mutagenesis evidence for an I domain allosteric site that regulates lymphocyte function-associated antigen 1 ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5231–5236.
- Hogg, N., Smith, A., McDowall, A., Giles, K., Stanley, P., Laschinger, M., Henderson, R., 2004. How T cells use LFA-1 to attach and migrate. *Immunol. Lett.* 92, 51–54.
- Hynes, R., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11–25.
- Jensen, L.J., Gupta, R., Blom, N., Devos, D., Tamames, J., Kesmir, C., Nielsen, H., Staerfeldt, H.H., Rapacki, K., Workman, C., Andersen, C.A., Knudsen, S., Krogh, A., Valencia, A., Brunak, S., 2002. Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features. *J. Mol. Biol.* 319, 1257–1265.
- Kaufman, Y., Tseng, E., Springer, T., 1991. Cloning of the murine lymphocyte function-associated molecule-1 α -subunit and its expression in COS cells. *J. Immunol.* 147, 369–374.
- Larson, R., Corbi, A., Berman, L., Springer, T., 1989. Primary structure of the LFA-1 α subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J. Cell Biol.* 108, 703–712.
- Lee, J., Rieu, P., Arnaout, M.A., Liddington, R., 1995. Crystal structure of the A domain from the α subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 80, 631–638.
- Lum, A.F.H., Green, C.E., Lee, G.R., Staunton, D.E., Simon, S.I., 2002. Dynamic regulation of LFA-1 activation and neutrophils arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow. *J. Biol. Chem.* 277, 20660–20670.
- Lupher Jr., M.L., Harris, E.A.S., Beals, C.R., Sui, L., Liddington, R.C., Staunton, D.E., 2001. Cellular activation of leukocyte function-associated antigen-1 and its affinity are regulated at the I domain allosteric site. *J. Immunol.* 167, 1431–1439.
- Mitazaka, M., Trnka, Z., 1985. Sheep as an experimental model of immunology: immunological techniques in vitro and in vivo. *Immunol. Methods* 3, 403–423.
- Nicholas, B., Karl, B., Nicholas, P., Hugh, B. Jr., 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10, 1–6.
- Qu, A., Leahy, D.J., 1995. Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$) integrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10277–10281.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers (http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html). In: Krawetz, S., Misener, S., (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, pp. 365–386.
- Rothlein, R., pringer, T., 1986. The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J. Exp. Med.* 163, 1132–1149.
- Salas, A., Shimaoka, M., Kogan, A.N., Harwood, C., von Andrian, U.H., Springer, T.A., 2004. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin $\alpha_L\beta_2$ and relation to α I and β I-like domain interaction. *Immunity* 20, 393–406.

1508

T. Fett et al. / Molecular Immunology 42 (2005) 1503–1508

- Springer, T., 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425–434.
- Tian, L., Yoshihara, Y., Mizuno, T., Mori, K., Gahmberg, C.G., 1997. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J. Immunol.* 158, 928–936.
- Vitte, J., Pierres, A., Benoliel, A.-M., Bongrand, P., 2004. Direct quantification of the modulation of interaction between cell- or surface-bound LFA-1 and ICAM-1. *J. Leukoc. Biol.* 76, 594–602.
- Yan, S.R., Sapru, K., Issekutz, A.C., 2004. The CD11/CD18 (β_2) integrins modulate neutrophil caspase activation and survival following TNF- α or endotoxin induced transendothelial migration. *Immunol. Cell Biol.* 82, 435–446.
- Zanjani, E., Almeida-Porada, G., Ascensao, J., MacKintosh, F., Flake, A., 1997. Transplantation of hematopoietic stem cells in utero. *Stem Cells* 15 (Suppl. 1), 79–92.
- Zecchinon, L., Fett, T., Baise, E., Desmecht, D., 2004. Molecular cloning and characterisation of the CD18 partner in ovine (*Ovis aries*) β_2 -integrins. *Gene* 334, 47–52.

6.3. Dans l'espèce caprine

Fett T., Zecchinon L.L., Baise E.A., Desmecht D.J.

Molecular characterisation of the caprine (*Capra hircus*)
lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit-encoding cDNA.
BMC Vet Res, 2005, 1, 4.

Research article

Open Access

Molecular characterisation of the caprine (*Capra hircus*) lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit-encoding cDNA

Thomas Fett, Laurent LM Zecchinon, Etienne A Baise and
Daniel JM Desmecht*

Address: Pathology Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, 4000 Liege, Belgium

Email: Thomas Fett - thomas.fett@ulg.ac.be; Laurent LM Zecchinon - lzecchinon@ulg.ac.be; Etienne A Baise - etienne.baise@ulg.ac.be;
Daniel JM Desmecht* - daniel.desmecht@ulg.ac.be

* Corresponding author

Published: 10 October 2005

Received: 04 July 2005

BMC Veterinary Research 2005, 1:4 doi:10.1186/1746-6148-1-4

Accepted: 10 October 2005

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/1/4>

© 2005 Fett et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, CD11a/CD18, alpha L beta 2) is required for many cellular adhesive interactions during the immune response.

Methods: We used SMART RACE technology to obtain caprine CD11a 5'- and 3'-ends and RT-PCR to amplify the full-length CDS.

Results: The *Capra hircus* CD11a-encoding cDNA was sequenced and compared with its human, murine, rat, bovine and ovine counterparts. Despite some focal differences, it shares all the main characteristics of its known mammalian homologues.

Conclusion: Therefore, along with the caprine CD18-encoding cDNA, which has been available for a few months, the sequence data revealed here will allow the *Capra hircus* LFA-1 expression *in vitro* as a tool to explore the specificities of inflammation in the caprine species.

Background

Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, $\alpha_1\beta_2$, CD11a/CD18) is a member of the β_2 -integrin subfamily of cell surface receptors. Integrins consist of a 120 to 180 kDa α subunit (CD11a in this case) and a 90 to 110 kDa β subunit that are noncovalently associated single-pass transmembrane proteins [1]. The bulk of each integrin subunit is extracellular, where it typically functions as a receptor for extracellular matrix molecules or as a counter-receptor for surface proteins of apposed cells [2]. The heterodimer CD11a/CD18 is expressed on all leukocytes and mediates high affinity adhesion to a variety of cell types that express one or more of the β_2 -integrins ligands, intercellular adhesion molecules (ICAM-1 to -5) [3-5]. The adhesion process mediated is a critical step of a wide range

of immunological activities, including cytolysis of target cells, cross-interaction and cross-stimulation between lymphocytes, phagocytosis of complement-coated targets, neutrophils clearance from inflamed tissue, and the regulation of leukocyte traffic between the bloodstream and tissues [6-9]. As the relevance of the goat model for studying leukocyte traffic, diapedesis and pathologic tissue infiltration is well established in such important areas as mastitis [10-13] or lentivirus-associated diseases [14-16], increasing our knowledge about caprine β_2 integrins is of great importance to offer new possibilities for research and to provide additional insights into those fields. Along with the caprine CD18-encoding cDNA, which is available for a few months [17], the sequence data provided here will allow the *Capra hircus* β_2 -integrin CD11a/CD18

expression *in vitro* as a tool to examine the specificities of inflammation in the caprine species.

Methods

RNA isolation

Total RNA from phorbol myristate acetate (PMA)-stimulated (25 ng/ml for 15 min) caprine (*Boer* breed) peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was extracted with TRIzol (Invitrogen, USA) as described by the manufacturer. The PBMCs were obtained by density gradient centrifugation with Ficoll-Paque Plus (Amersham, USA) and maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco BRL, USA), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Amplification of cDNA ends

We used SMART RACE technology (Clontech Laboratories Inc., USA) to obtain caprine CD11a (CaCD11a) 5'- and 3'-ends and RT-PCR to amplify full-length CaCD11a CDS. For first-strand cDNA synthesis, and according to the sequence of bovine CD11a available [GenBank: [AY267467](#)], gene-specific primers were designed which were expected to give non overlapping ~1 kb RACE products: a sense primer for the 3'-RACE PCR : 5'-TGCAATGTRAGCTCTCCCATCTC-3' (corresponding to nt 2572 to nt 2595) and an antisense primer for the 5'-RACE PCR : 5'-CCGGCCTCTCTCTGCTCCCCATAG-3' (nt 1470 to nt 1446). Reverse transcription and polymerase chain reactions (PCR) were carried out according to the instruction manual of the SMART RACE cDNA Amplification Kit. The 5'- and 3'-RACE products were gel-purified using the S.N.A.P.[™] Gel Purification Kit (Invitrogen, USA), TA-cloned into pCRII-TOPO (Invitrogen, USA) and seeded on kanamycin IPTG plates. Miniprep were obtained from colonies grown in 5 ml LB-kanamycin broth and the clones were sequenced on the ABI-3730 Genetic Analyzer using the Big Dye terminator chemistry (Applied Biosystems, USA).

Molecular cloning of full-length cDNA

Total RNA from PMA-stimulated PBMCs was reverse transcribed using Improm II (Promega, USA). The full-length cDNA was then generated by long distance PCR using Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen, USA) with primers designed from the distal ends of both 5'- and 3'-RACE products : 5'-GTCGCCAGTAAATCCCAAGA-3' (sense, within the 5'-UTR) and 5'-GCACCTCAATCTCCACCACT-3' (antisense, 3'UTR). The procedures recommended by the manufacturer were followed, with these cycling parameters : 5 min at 94°C, then 35 cycles including (i) 30 s at 94°C, (ii) 30 s at 58°C and (iii) 3 min 30 s at 68°C, followed by a final extension at 68°C for 5 min. Resulting PCR products were then processed for sequencing as aforementioned for the RACE

products. The CD11a cDNA sequence was deduced from sequences obtained from nine independent clones. Sequence data have been deposited at GenBank under accession No. [AY773018](#) and [AY773019](#).

Bioinformatics

Primers design was performed with Netprimer [18] and Primer 3 [19]. Nucleotidic sequence and similarity analyses were carried out using respectively Chromas v.2.21 [20] and BLAST programs [21]. Alignment of amino acids sequences were drawn by GeneDoc v.2.6.002 [22] following the BLOSUM62 matrix. SignalP v.2.0.b2 [23] and NetNGlyc v.1.0 [24] provided peptide signal and N-glycosylation sites prediction, respectively.

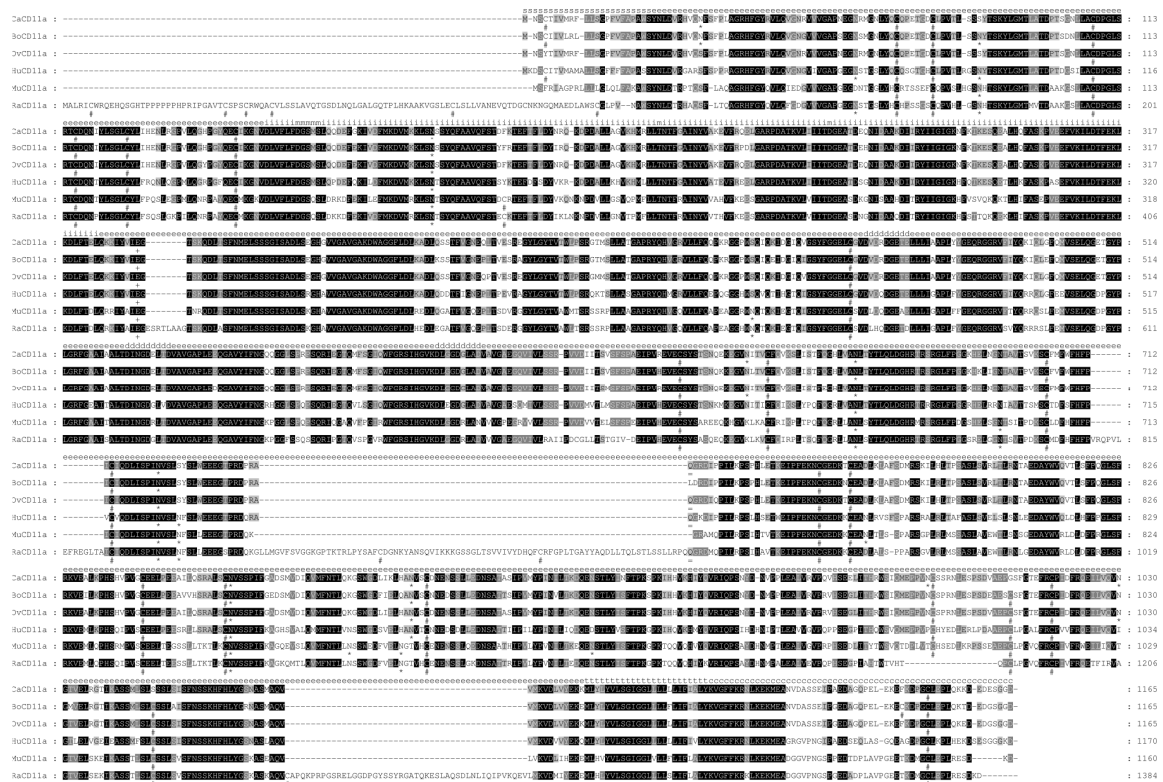
Results & discussion

Characterisation of CaCD11a-encoding cDNA and deduced aa sequence

Two alleles have been identified for the CaCD11a cDNA. The sequence contains ~4200 bp with an ORF of 3498 [Genbank: [AY773019](#)] or 3495 bp [Genbank: [AY773018](#)] depending on the allele that codes for 1165 or 1164 aa followed by ~600 bp in the 3'-UTR (Fig. 1). The mature CaCD11a contains a 23-aa putative leader peptide, an extracellular domain of 1061 or 1062 residues (24-1084/1085), a single hydrophobic transmembrane region of 24 residues (1085/1086-1108/1109) and a cytoplasmic tail of 57 residues (Fig. 1). Nine N-linked putative glycosylation sites (Asn-X-Thr/Ser) are present in the extracellular domain (Fig. 2). The mature protein contains 19 cysteine residues among which one is located into the cytoplasmic tail (Fig. 2). The extracellular domain also contains an inserted (I) domain of 172 amino acids (residues 153-324) quite similar to those found in all the leukocyte integrin α subunits sequenced to date and located between the β sheets 2 and 3 of a seven bladed β -propeller region [25]. The I-domain is homologous with repeated domains found in von Willebrand factor and cartilage matrix protein [1] and can be expressed as an isolated domain. Its three-dimensional structure consists of a five-stranded parallel β -sheet core surrounded on both faces by α -helices, with a short antiparallel strand occurring on one edge of this sheet [26]. The I-domain contains a metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) [27] (residues 159-163, 228, 261) (Fig. 2) and an I-domain allosteric site (IDAS) that plays a functional role in ICAM-1 binding [28-30]. Three repeats with a divalent cation binding motif are found at amino acid residues 465-473, 527-535 and 587-595 (Fig. 2). All the conserved cysteines and all but one N-glycosylation sites are found outside the I region and divalent cation binding motifs (Fig. 2), consistent with the hypothesis that these regions may undergo conformational changes important in ligand binding [31,32].

Figure 1
The nucleotide and deduced amino acid sequences of *Capra hircus* CDI Ia cDNA. The putative leader peptide and transmembrane region are underlined. Nine independent clones were sequenced in both directions. Sequence data have been deposited at GenBank under accession No. [AY773018](#) and [AY773019](#) (shown here), respectively without and with Gln-743 (#).

Every cysteine residue in the caprine extracellular portion of mature CD11a is present at the same location in bovine, ovine, human, murine and rat CD11a, which is consistent with a role in maintaining the global structure of the protein whereas two cysteine residues (positions 1009 and 1048) are absent from caprine CD11a and therefore do not seem to be indispensable. The mouse version distinguishes by an additional cysteine residue at

**Figure 2**

Comparison of the caprine (Ca-), bovine (Bo-), human (Hu-), murine (Mu-) and rat (Ra-) α subunits amino acid sequences. The letters in the top row identify the constitutive blocks: putative signal peptide (s), extracellular domain (e), transmembrane region (t), cytoplasmic tail (c), I-domain (i), MIDAS motif (m) and divalent cation binding motifs (d). Black, dark grey and light grey columns represent identity among 6, 5 and 4 species, respectively. Cysteine residues (#) and potential N-glycosylation sites (*) are marked at the bottom of the sequences. The important Glu-332 residue (+) and the Gln-743 residue (=) are identified.

position 199 (mouse numbering) within the extracellular portion. Of nine potential Asn-glycosylation sites in caprine CD11a, the ones present at amino acids 185, 667, 723 and 859 are strictly conserved, one is only absent from murine and rat CD11a (residue 894), without predictable consequences on a functional point of view.

Interestingly, as in sheep [34] and human [GenBank: [NM_002209](#) and [AY892236](#)], an allelic variant with a triplet insertion resulting in an additional Glu744 in the extracellular domain was consistently identified, which suggests an allelic polymorphism that might be biologically relevant. Studies of genomic sequences will permit to know if this addition represents two alleles or not.

Finally, one has to note that the lowest between-species percent identities are observed with the rat CD11a sequence which has been derived from an annotated genomic sequence. Cloning and characterisation of rat CD11a from rat PBMCs would probably give a higher identity.

Conclusion

This study reports for the first time the isolation and sequencing of the caprine LFA-1 α subunit (CD11a) cDNA, and demonstrates that, despite some focal differences, it shares all the main characteristics of its known mammalian homologues. Along with the caprine CD18-encoding cDNA which is now available [17], the sequence

Table 1: Between-species percent identities of CD11a constitutive blocks. Ca, Bo, Ov, Hu, Mu and Ra: caprine, bovine, ovine, human, murine and rat CD11a, respectively; MIDAS: metal-ion dependent adhesion site.

Block	Ca vs. Bo (%)	Ca vs. Ov (%)	Ca vs. Hu (%)	Ca vs. Mu (%)	Ca vs. Ra (%)
Overall	94	98	77	68	55
Putative signal peptide	86	95	60	41	4
Extracellular domain	94	98	78	69	60
Transmembrane region	95	100	95	79	87
Cytoplasmic tail	92	94	58	50	47
I-domain	95	99	86	72	75
MIDAS	100	100	100	85	85
Putative cation binding motif 1	100	100	88	66	55
Putative cation binding motif 2	100	100	77	88	88
Putative cation binding motif 3	100	100	88	77	88

data provided here will allow the successful expression of caprine LFA-1 *in vitro* as a tool to examine the specificities of inflammation in the caprine species.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TF carried out cloning and sequencing, participated in the sequence alignment and to the draft of the manuscript. LZ participated in the sequence comparison and to the draft of the manuscript. EB participated in the design of the study. DD conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study is supported by the Belgian federal services for public health and security of the food chain and environment, grant S-6107. The authors are grateful to Prof M. Georges for giving free access to all the facilities of the laboratory of molecular genetics and to Prof. J.-F. Beckers for the caprine PBMCs.

References

- Springer T: **Adhesion receptors of the immune system.** *Nature* 1990, **346**:425-434.
- Hynes R: **Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion.** *Cell* 1992, **69**:11-25.
- Bailly P, Tontti E, Hermand P, Cartron JP, Gahmberg CG: **The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins.** *Eur J Immunol* 1995, **25**:3316-3320.
- Gahmberg C: **Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules.** *Curr Opin Cell Biol* 1997, **9**:643-650.
- Tian L, Yoshihara Y, Mizuno T, Mori K, Gahmberg CG: **The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin.** *J Immunol* 1997, **158**:928-936.
- Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K: **Mac-1, but not LFA-1, uses Intercellular Adhesion Molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF- α -induced inflammation.** *J Immunol* 2003, **171**:6105-6111.
- Hogg N, Smith A, McDowall A, Giles K, Stanley P, Laschinger M, Henderson R: **How T cells use LFA-1 to attach and migrate.** *Immunol Lett* 2004, **92**:51-54.
- Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA: **Rolling adhesion through an extended conformation of integrin $\alpha_4\beta_2$ and relation to α I and β I-like domain interaction.** *Immunity* 2004, **20**:393-406.
- Yan SR, Sapru K, Issekutz AC: **The CD11/CD18 (β_2) integrins modulate neutrophil caspase activation and survival following TNF- α or endotoxin induced transendothelial migration.** *Immunol Cell Biol* 2004, **82**:435-446.
- Koul S, Singh J, Dhingra PN, Khatra GS: **Studies on experimental chlamydial mastitis in goat histoenzymology.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1993, **16**:307-316.
- Rana JS, Gupta PP, Ahuja SP: **Biochemical changes of the milk in experimental caprine mastitis induced by *Mycoplasma* serogroup II (2-D).** *Acta Vet Hung* 1993, **41**:139-149.
- Paape MJ, Capuco AV: **Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats.** *J Anim Sci* 1997, **75**:556-565.
- Singh P, Sood N, Gupta PP, Jand SK, Banga HS: **Experimental candid mastitis in goats: clinical, haematological, biochemical and sequential pathological studies.** *Mycopathologia* 1997, **140**:89-97.
- Jolly PE, Gangopadhyay A, Chen S, Reddy PG, Weiss HL, Sapp WJ: **Changes in the leukocyte phenotype profile of goats infected with the caprine arthritis encephalitis virus.** *Vet Immunol Immunopathol* 1997, **56**:97-106.
- Jan CL, Greenland T, Gounel F, Balleydier S, Mornex JF: **Activation of small ruminant aortic endothelial cells after *in vitro* infection by caprine arthritis encephalitis virus.** *Res Vet Sci* 2000, **69**:225-231.
- Milhau N, Bellaton C, Balleydier S, Gaonach M, Le Jan C: ***In vitro* infection of aortic endothelial cells by caprine arthritis encephalitis virus enhances *in vitro* transmigration of peripheral blood leukocytes and modulates their phenotypic expression.** *Vet Res* 2003, **34**:273-284.
- Zecchinon L, Fett T, Baise E, Desmecht D: **Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*.** *Mol Membr Biol* 2004, **21**:289-295.
- Netprimer [http://www.premierbiosoft.com/netprimer]
- Rozen S, Skaletsky HJ: **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* 2000:365-386 [http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html]. Totowa, Humana Press
- Chromas v.2.21 [http://www.technelysium.com.au]
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *J Mol Biol* 1990, **215**:403-410.
- Nicholas B, Karl B, Nicholas P, Hugh B Jr: **GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.** [http://www.psc.edu/biomed/genedoc].

23. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G: **Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.** *Protein Engineering* 1997, **10**:1-6.
24. Jensen LJ, Gupta R, Blom N, Devos D, Tamames J, Kesmir C, Nielsen H, Staerfeldt HH, Rapacki K, Workman C, Andersen CA, Knudsen S, Krogh A, Valencia A, Brunak S: **Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features.** *J Mol Biol* 2002, **319**:1257-1265.
25. Huang C, Lu C, Springer TA: **Folding of the conserved domain but not of flanking regions in the integrin β_2 subunit requires association with the α subunit.** *Proc Natl Acad Sci* 1997, **94**:3156-3161.
26. Qu A, Leahy DJ: **Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, $\alpha_L \beta_2$) integrin.** *Proc Natl Acad Sci* 1995, **92**:10277-10281.
27. Lee J, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R: **Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18).** *Cell* 1995, **80**:631-638.
28. Huth JR, Olejniczak ET, Mendoza R, Liang H, Harris EAS, Lupher ML Jr, Wilson AE, Fesik SW, Staunton DE: **NMR and mutagenesis evidence for an I-domain allosteric site that regulates lymphocyte function-associated antigen I ligand binding.** *Proc Natl Acad Sci* 2000, **97**:5231-5236.
29. Lupher ML Jr, Harris EAS, Beals CR, Sui L, Liddington RC, Staunton DE: **Cellular activation of leukocyte function-associated antigen-I and its affinity are regulated at the I-domain allosteric site.** *J Immunol* 2001, **167**:1431-1439.
30. Lum AFH, Green CE, Lee GR, Staunton DE, Simon SI: **Dynamic regulation of LFA-1 activation and neutrophils arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow.** *J Biol Chem* 2002, **277**:20660-20670.
31. Rothlein R, Springer T: **The requirement for lymphocyte function-associated antigen I in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester.** *J Exp Med* 1986, **163**:1132-1149.
32. Larson R, Corbi A, Berman L, Springer T: **Primary structure of the LFA-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily.** *J Cell Biol* 1989, **108**:703-712.
33. Fett T, Zecchinon L, Baise E, Desmecht D: **The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA: molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins.** *Gene* 2004, **325**:97-101.
34. Fett T, Zecchinon L, Baise E, Desmecht D: **Cloning and characterisation of the primary structure of the sheep lymphocyte function-associated antigen-I α subunit.** *Mol Immunol* 2005, **42**:1503-1508.
35. Kaufman Y, Tseng E, Springer T: **Cloning of the murine lymphocyte function-associated molecule-I α -subunit and its expression in COS cells.** *J Immunol* 1991, **147**:369-374.
36. Dustin M, Springer T: **T cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1.** *Nature* 1989, **341**:619-624.
37. Vitte J, Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P: **Direct quantification of the modulation of interaction between cell- or surface-bound LFA-1 and ICAM-1.** *J Leukoc Biol* 2004, **76**:594-602.
38. Kim M, Carman CV, Springer TA: **Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins.** *Science* 2003, **301**:1720-1725.
39. Hibbs M, Xu H, Stacker S, Springer T: **Regulation of adhesion to ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit.** *Science* 1991, **251**:1611-1613.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



7. Contribution à l'inventaire des sous-unités CD18 « sensibles » et « résistantes »

Fett T., Zecchinon L., Vanden Bergh P., Desmecht D.

Mannheimia haemolytica leukotoxin-induced cytolysis of caprine (*Capra hircus*) leukocytes
is mediated by the CD18 subunit of beta(2)-integrins.

Microb Pathog, 2008, 45, 337-342.



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Mannheimia haemolytica leukotoxin-induced cytolysis of caprine (*Capra hircus*) leukocytes is mediated by the CD18 subunit of β_2 -integrins

T. Fett¹, L. Zecchinon¹, P. Vanden Bergh, D. Desmecht*

Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, FMV Sart Tilman B43, B-4000 Liege, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2008

Received in revised form 23 July 2008

Accepted 6 August 2008

Available online 14 August 2008

Keywords:

Goat

Mannheimia haemolytica

Leukocyte

LFA-1

CD18

ABSTRACT

Mannheimiosis is the major respiratory disease among some ruminants, whereas it is not pathogenic for other mammals, an observation that has been attributed to a specific interaction between *Mannheimia haemolytica* leukotoxin (Lkt) and bovine or ovine CD18 subunit of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) and Mac-1. We therefore hypothesized that Lkt utilizes CD18 as its receptor on caprine leukocytes as well. We have transiently transfected the β_2 -integrins-deficient K-562 cell line with cDNAs encoding caprine CD11a and caprine CD18 to determine the susceptibility of the transfectants to Lkt-induced cytolysis. Flow cytometric analysis of the transfectants revealed surface expression of caprine LFA-1 and lysis by Lkt in a concentration-dependent manner whereas the parent cells were not. Moreover, K562 cells expressing caprine CD18 and human or bovine CD11a were also sensitive to Lkt whereas K-562 cells expressing caprine CD11a and human CD18 were not. Taken together, these results indicate that CD18 on caprine leukocytes serves as a receptor for Lkt.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The bacterium *Mannheimia haemolytica* plays a major role as secondary pathogen in the final progression to severe pleuropneumonias in cattle, sheep and goats. *M. haemolytica* is a Gram-negative, non-motile, coccobacillus and a commensal of upper respiratory tract of these animals. Twelve serotypes have been described and serotypes A1, A2 and A6 have been shown to prevail in cattle and sheep [1]. Its pathogenesis involves many predisposing agents such as viruses (parainfluenza virus 3, bovine herpes virus 1, bovine respiratory syncytial virus), bacteria (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*), environment (excessive temperatures, change of feed, dust...) or stress associated to weaning, dehorning, and shipping [1–7]. These factors seem to alter the upper respiratory tract epithelium allowing *M. haemolytica* to colonize it, escaping clearance, and to move from nasopharynx to lungs, leading to a broncho-alveolar kind of pneumonia which is accompanied by high morbidity and mortality [8–10]. Pulmonary lesions are lobular, anteroventrally distributed

and are characterized by extensive infiltration of neutrophils [11,12] and exudation of fibrin into airways and alveoli. In these latter, multifocal areas of coagulation necrosis are observed, wrought by the cytolysis of many neutrophils and macrophages that pour a variety of toxic compounds *in situ* which in turn aggravate pulmonary damage [2,4].

Several virulence factors have been described for *M. haemolytica*, the main of which being the leukotoxin (Lkt) and the lipopolysaccharides. Lkt is a 102-kDa protein produced during the logarithmic phase growth of the bacterium *in vitro* [13]. It is a member of the repeats-in-toxin (RTX) family of pore-forming cytotoxins [1], and is cytotoxic only for ruminant leukocytes, a phenomenon that is correlated with its ability to bind and interact with the bovine and ovine β_2 -integrins. Mammalian integrins form several subfamilies sharing common β subunits that associate with different α subunits. β_2 integrins include four different heterodimers: CD11a/CD18 (lymphocyte function-associated antigen-1 or LFA-1, $\alpha_L\beta_2$), the predominant β_2 -integrin, CD11b/CD18 exclusive to granulocytes and monocytes (Mac-1, $\alpha_M\beta_2$), CD11c/CD18 (CR4, $\alpha_X\beta_2$), and CD11d/CD18 (aDb2, $\alpha_D\beta_2$). The CD11a–d/CD18 heterodimers are expressed on all leukocytes and mediate high affinity adhesion to a variety of cell types that express one or more of the β_2 -integrins ligands, intercellular adhesion molecules (ICAM-1 to -5) [14–17]. The adhesion process mediated is a critical step of a wide range of immunological activities, including cross-interaction and cross-stimulation between lymphocytes, phagocytosis of complement-coated targets, platelet aggregation, regulation of leukocyte traffic between the bloodstream and tissues, or cytolysis of target cells.

Abbreviations: Bo, bovine; ca, caprine; hu, human; ov, ovine; ICAM, intercellular adhesion molecule; kan, kanamycin; LFA, lymphocyte function-associated antigen; Lkt, leukotoxin; PAF, paraformaldehyde; PMA, phorbol myristate acetate; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; RTX, repeats-in-toxin; UTR, untranslated region.

* Corresponding author. Tel.: +32 4 366 4075; fax: +32 4 366 4565.

E-mail address: daniel.desmecht@ulg.ac.be (D. Desmecht).

¹ Contribute equally to the work.

Several studies have shown that CD18 mediates Lkt-induced cytolysis of bovine and ovine leukocytes, suggesting that the most widespread cattle respiratory disease, that with the most important impact on beef production worldwide, is due to a tiny ruminant-specific focal variation in the CD18-expressing gene [1,18–26].

Recently, cDNAs for caprine CD11a and CD18 were cloned and sequenced [23,27], but their role in Lkt-induced cytolysis has not been investigated so far. Comparison of the amino acid sequence of caprine CD18 versus bovine and ovine CD18 revealed 96 and 99% identity, respectively. This finding, along with the fact that Lkt is specific for leukocytes of cattle, sheep and goats, prompted us to hypothesize that Lkt utilizes CD18 as its receptor on caprine leukocytes as well. Therefore, the objective of this study was to express caprine as well as heterologous caprine/bovine and caprine/human LFA-1 on the Lkt-non-susceptible K-562 cell line, and to determine the effect of CD18 expression on the susceptibility of these transfected cell lines to Lkt-induced cytolysis.

2. Results

2.1. Validation of Lkt preparation

The purified Lkt was validated by incubating three different cell lines with the toxin in dilution before analysis for cell viability by MTS assay. As expected, Lkt induces concentration-dependent cell death of bovine lymphoblastic BL-3 cells whereas human myeloblastic Raji cells and β_2 -integrins-deficient human lymphoblastic K-562 cells were not affected (Fig. 1A).

In order to confirm that the cytolysis of BL-3 cells was specifically induced by Lkt, the toxin was preincubated with the LPS inhibitor polymyxin B (Sigma, USA) at 10 μ g/ml for 30 min at 4 °C, before incubation with the cells and analysis for cell viability by MTS assay. No significant difference was observed when compared to Lkt alone (data not shown).

The Lkt 1:32 dilution, which induces maximal toxicity (Fig. 1A), was then incubated with BL-3 cells and the Lkt-neutralizing MAb (Fig. 1B). As expected, antibody MM601 inhibits Lkt-induced cytolysis at low but not at high dilution.

Taken together, these results validate the Lkt preparation for further experiments.

2.2. Caprine leukocytes express LFA-1 and are lysed by *M. haemolytica* leukotoxin

To confirm that caprine leukocytes are susceptible to *M. haemolytica* Lkt-induced cell death, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and submitted to different dilutions of leukotoxin before propidium iodide (PI) analysis by flow cytometry. PI analysis was preferred as it directly measures cell death, on the contrary of the MTS assay that rather measures cell viability. Moreover, the PI method was found to be more sensitive. As expected, Lkt lysed caprine PBMCs in a concentration-dependent manner (Fig. 2) as well as bovine lymphoblastic BL3 cells (data not shown) whereas K-562 cell line and human myeloblastic Raji cells were not susceptible (data not shown).

Moreover, 95–100% of caprine PBMCs (with 5–7% mortality) express LFA-1 as revealed by flow cytometric analysis of cell surface expression of CD11a and CD18 subunits, suggesting that the heterodimer CD11a/CD18 could serve as the receptor for Lkt.

2.3. K-562 cells transfected with cDNAs coding for caprine LFA-1 express the receptor on the cell surface

The human lymphoblastic K-562 cell line was selected for transfection with caprine LFA-1, because of its resistance to *M. haemolytica* Lkt-induced cell death and lack of endogenous

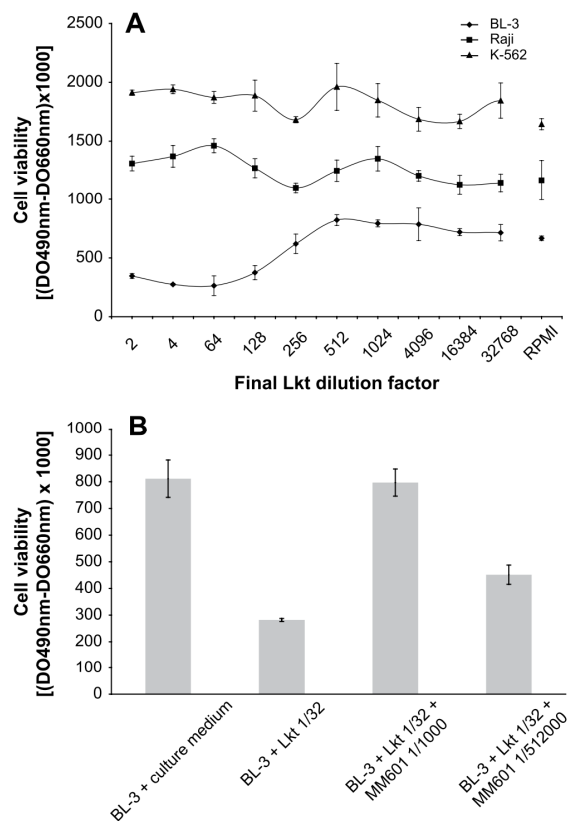


Fig. 1. Quality control of Lkt preparation. A. The bovine lymphoblastic BL-3 cell line (rhombos), the human myeloblastic Raji cells (squares) and the β_2 -integrins-deficient human lymphoblastic K-562 (triangles) cell line were incubated with several dilutions of Lkt from serotype A1 and then analysed for cell viability by MTS assay. Lkt induces concentration-dependent cell death of BL-3 cells whereas Raji and K-562 cells were not affected. The means of one representative experiment (performed in triplicate) are shown. The error bars indicate standard deviations. B. Cell viability of BL-3 cells was measured by MTS assay in the presence of (from left to right) culture medium, Lkt diluted 1:32 alone or with the specific inhibitory monoclonal antibody MM601 diluted 1000 or 512,000 times. Lkt decreases cell viability, when compared to BL-3 incubated with culture medium alone. Antibody MM601 inhibits Lkt-induced cytolysis at 1:1000 but not at the higher dilution (1:512,000). The means of one representative experiment (performed in triplicate) are shown. The error bars indicate standard deviations.

β_2 -integrin expression [28]. Caprine CD11a and CD18 cDNAs were cloned into the mammalian expression vector pcDNA4/TO and resultant vectors were transfected into K-562 cells. Flow cytometric analysis with the anti-CD11a MAb revealed that ~80% of the transfectants (<10% mortality) express recombinant caprine LFA-1 at the cell surface. Similar expression levels were obtained with K-562 transfected with bovine or human LFA-1.

2.4. Expression of caprine LFA-1 by the transfectants renders them susceptible to Lkt-induced cytolysis

The K-562 cell line transiently transfected with caprine LFA-1 was subjected to serial dilutions of leukotoxin from serotype A1 before propidium iodide analysis by flow cytometry. Lkt lysed these transfectants in a concentration-dependent manner as well as K-562 cells transfected with bovine LFA-1 (Fig. 3), whereas parent K-562 cells and K-562 transfected with human LFA-1 were not affected by Lkt (data not shown), indicating that recombinant

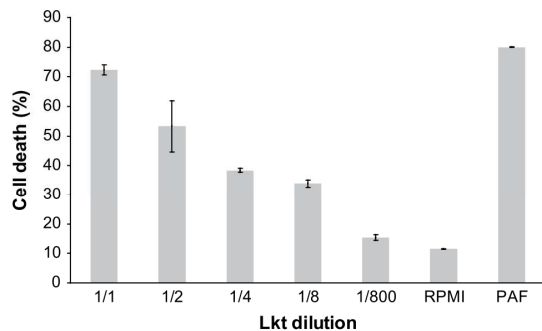


Fig. 2. *M. haemolytica* Lkt induces cytolysis of caprine PBMCs. Leukocytes were incubated with several dilutions of Lkt from serotype A1 (undiluted, diluted 1:2; 1:4; 1:8 and 1:800) and then analysed for cytolysis by measuring percentage of propidium iodide positive cells by flow cytometry. Lkt induces concentration-dependent cell death of caprine PBMCs, as well as paraformaldehyde 10% (PAF, positive control) whereas culture medium (RPMI) do not (negative control). The means of one representative experiment (performed in duplicate) are shown. The error bars indicate standard deviations.

expression of caprine LFA-1 on K-562 cells renders them susceptible to Lkt-induced cytolysis.

2.5. Caprine CD18 mediates Lkt-induced cytolysis of transfectants

In order to demonstrate the direct involvement of caprine CD18 in the mediation of Lkt-induced cytolysis, we generated transfectants expressing heterologous LFA-1 (human CD11a/caprine CD18 and bovine CD11a/caprine CD18). They were subjected to serial dilutions of leukotoxin from serotype A1 before propidium iodide analysis by flow cytometry.

Lkt lysed the K-562 cell line transiently transfected with caprine CD18 in combination either with human CD11a or bovine CD11a in a concentration-dependent manner, as well as K-562 transiently transfected with caprine CD11a and bovine CD18, whereas K-562 transiently transfected with caprine CD11a and human CD18 were not affected by Lkt (Fig. 4). Taken together, these results confirmed

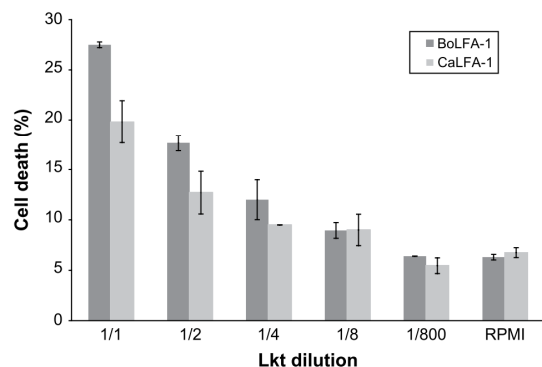


Fig. 3. *M. haemolytica* Lkt induces cytolysis of the transfectants expressing caprine LFA-1. The K-562 cells transfected with caprine CD11a and CD18 (CaLFA-1) or with bovine CD11a and CD18 (BoLFA-1) were incubated with several dilutions of Lkt from serotype A1 (undiluted, diluted 1:2; 1:4; 1:8 and 1:800) and then analysed for cytolysis by measuring percentage of propidium iodide positive cells by flow cytometry. Lkt induces concentration-dependent cell death of transfectants expressing caprine or bovine LFA-1, as well as paraformaldehyde 10% (PAF, positive control, 85–95% cell death, not shown) whereas culture medium (RPMI) do not (negative control). The parent K-562 cell line and transfectants expressing human LFA-1 are not affected by Lkt (not shown). The means of two representative experiments are shown. The error bars indicate standard deviations.

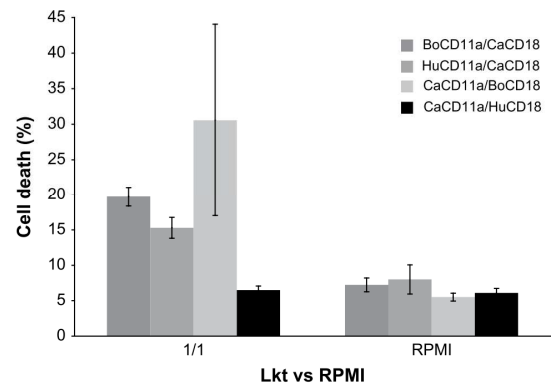


Fig. 4. *M. haemolytica* Lkt induces cytolysis of the heterologous transfectants expressing caprine CD18. The transfectants were incubated with undiluted Lkt from serotype A1 and then analysed for cytolysis by measuring percentage of propidium iodide positive cells by flow cytometry. Lkt induces cell death of transfectants expressing BoCD11a/CaCD18, HuCD11a/CaCD18 or CaCD11a/BoCD18, as well as paraformaldehyde 10% (PAF, positive control, 80–95% cell death, not shown) whereas culture medium (RPMI) do not (negative control). The heterologous transfectants expressing CaCD11a/HuCD18 are not affected by Lkt. The means of three (Bo/Ca and Hu/Ca) or two (Ca/Bo and Ca/Hu) representative experiments are shown. The error bars indicate standard deviations.

the recombinantly expressed caprine CD18 as the mediator of the Lkt-induced cytolysis of the transfectants.

3. Discussion

Since (i) *M. haemolytica* leukotoxin lyses bovine and ovine leukocytes [29–38] following a specific interaction with the CD18 subunit [1,18–26,28,39]; and (ii) caprine (*Capra hircus*) CD18 has 96 and 99% amino acid sequence identity to bovine and ovine CD18, respectively, we reasoned that CD18 is likely to serve as the receptor for Lkt on caprine leukocytes as well. Flow cytometric analysis of the caprine PBMCs strengthened this hypothesis by revealing high surface expression of caprine LFA-1 (>95%) and lysis by Lkt in a concentration-dependent manner (Fig. 2).

In order to unequivocally demonstrate that caprine CD18 mediates Lkt-induced cytolysis, we first transiently transfected the Lkt-non-susceptible K-562 cell line (naturally expressing no β_2 -integrins) with cDNAs for caprine CD11a [27] and CD18 [23]. This renders the resulting transfectants susceptible to Lkt in a dose-dependent manner (Fig. 3). Similar data were obtained with transfectants expressing recombinant bovine LFA-1 (Fig. 3) whereas the K-562 parent cell line and transfectants expressing recombinant human LFA-1 were not affected by Lkt, indicating that recombinant expression of caprine LFA-1 on K-562 cells renders them susceptible to Lkt-induced cytolysis.

Moreover, K562 cells expressing caprine CD18 and human or bovine CD11a were also susceptible to Lkt, as well as transfectants expressing bovine CD18 and caprine CD11a, whereas K-562 cells expressing caprine CD11a and human CD18 were not (Fig. 4).

4. Conclusion

These results clearly demonstrate that CD18 on caprine leukocytes serves as a receptor for *M. haemolytica* Lkt, and that CD18 alone [26] is adequate to mediate the Lkt-induced cytolysis of target cells, as it does on bovine [22,25] and ovine [25,38,40] leukocytes.

5. Materials and methods

5.1. Cell lines and growth conditions

Caprine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by density gradient centrifugation with ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 (Sigma, Belgium) from 10 ml of blood collected on EDTA tubes.

The bovine lymphoblastic BL3 cells (ATCC CRL-8037), the human myeloblastic Raji cells (ATCC CCL-86) and the lymphoblastic β_2 -integrin-deficient K-562 cell line (ATCC CCL-243) were grown following recommendations of the manufacturer.

Caprine PBMCs as well as Raji cells, K-562 native and transiently transfected cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1.3 µg/ml) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Cell culture reagents were purchased from Lonza, Belgium.

5.2. Cloning and expression of caprine, bovine and human CD11a and CD18

Cloning and expression of caprine CD11a [27], caprine CD18 [23] and bovine CD11a [41] were already described.

Bovine CD18 was obtained from BL3 cells. Briefly, total RNA from phorbol myristate acetate (PMA) – stimulated (25 ng/ml for 15 min) BL-3 cell suspension was extracted with TRIzol (Invitrogen, Belgium) as described by the manufacturer and reverse transcribed using Improm II (Promega, Belgium). The full-length cDNA was then generated by long distance PCR using *Elongase* (Invitrogen, Belgium) with primers designed from the available bovine CD18 sequence (GenBank accession no. M81233): 5'-CAGCCTGGTGAAG AGCAGAG-3' (sense, within the 5'-UTR) and 5'-GCAITTTTGGTTA ACGGTGAAG-3' (antisense, 3'-UTR). The procedures recommended by the manufacturer were followed, with the following cycling parameters: 2 min 30 s at 94 °C, then 35 cycles including: (i) 30 s at 94 °C; (ii) 45 s at 58 °C; and (iii) 2 min 30 s at 68 °C, followed by a final extension at 68 °C for 10 min. Resulting PCR product was then sequenced on an ABI-3730 Genetic Analyzer using the Big Dye terminator chemistry (Applied Biosystems, Belgium) and was shown to correspond to the published sequence.

Human CD11a and CD18 were obtained from Raji cells. Briefly, total RNA from phorbol myristate acetate (PMA) – stimulated (25 ng/ml for 15 min) Raji cell line was extracted with TRIzol (Invitrogen, Belgium) as described by the manufacturer and reverse transcribed using Improm II (Promega, Belgium). The full-length cDNA was then generated by long distance PCR using *Elongase* (Invitrogen, Belgium) with primers designed from the human CD11a (GenBank accession no. NM 002209) and CD18 (GenBank accession no. NM 000211) sequences available: 5'-GGCATGATCATTTTCCT CT-3' (CD11a, sense, within the 5'-UTR), 5'-CTCACTTTTGCAGCCCTC TT-3' (CD11a, antisense, 3'-UTR), 5'-CAGGGCAGACTGGTAGCAAA-3' (CD18, sense, within the 5'-UTR) and 5'-CAGGCACCTAACCTACCAA-3' (CD18, antisense, 3'-UTR). The procedures recommended by the manufacturer were followed, with the following cycling parameters: 2 min 30 s at 94 °C, then 35 cycles including: (i) 30 s at 94 °C; (ii) 45 s at 50 °C (HuCD18) or 53 °C (HuCD11a); and (iii) 3 min 30 s at 68 °C, followed by a final extension at 68 °C for 10 min. Resulting PCR products were then sequenced on an ABI-3730 Genetic Analyzer using the Big Dye terminator chemistry (Applied Biosystems, Belgium) and were shown to correspond to the published sequences.

CD11a and CD18 cDNAs were cloned into the mammalian expression vector pcDNA4/TO (Invitrogen, Belgium) and transformed into *Escherichia coli* TOP10 chemically competent cells. Plasmid DNA was extracted from ampicillin resistant clones and purified with NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey-Nagel, Germany).

5.3. Production of *M. haemolytica* Lkt

Production and purification of Lkt from *M. haemolytica* will be described in a specific paper. Briefly, *M. haemolytica* serotype A1 (strain SH1217, ATCC BAA-409) was grown to logarithmic phase in brain heart infusion broth (Oxoid, France) at 37 °C, collected by centrifugation (10,000 × g for 20 min at 4 °C), purified by chromatography, concentrated by ammonium sulphate (Sigma, Belgium), dialysed against phosphate buffer saline (5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 130 mM NaCl, pH 7.4) overnight at 4 °C, filter-sterilized, aliquoted and stored at –20 °C until needed. Lkt was estimated to be pure at ~90–95% by SDS-PAGE and was identified by western blotting using specific monoclonal antibody MM601 (a generous gift from Dr Ambagala, University of Nebraska, USA). All the experiments were performed with the same batch of toxin, although no significant batch-to-batch variations were noticed.

5.4. Transfection of CD11a and CD18 into K-562 cells

Transient transfection of K-562 human lymphoblastic cells was performed with *Cell line Nucleofector Kit V* (amaxa, Germany) optimized for this cell line following manufacturer's instructions. Briefly, 10⁶ of K-562 cells were centrifuged 10 min at 300 × g and 25 °C. The pellet is washed with 1 ml phosphate buffer saline (Lonza, Belgium) and submitted to a second centrifugation in the same conditions. Supernatant is fully discarded before addition of 2.5 µg of each plasmid (pcDNA4-CD11a and pcDNA4-CD18) in 1–5 µl of water and 100 µl of *Nucleofector Solution V*. This mixture is transferred into an amaxa certified cuvette to undergo *Nucleofector II* T-16 program and is then supplemented with 500 µl of RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1.3 µg/ml) for a subsequent incubation at 37 °C for 10 min. The mixture is then seeded into a 6-well culture plate with 1.5 ml of D-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1.3 µg/ml) for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Cells are washed in 7 ml PBS and resuspended in supplemented RPMI at 2 × 10⁶ cells/ml to detect expression of LFA-1 and Lkt-induced cytolysis by using flow cytometry.

5.5. Flow cytometric analysis of the cell surface expression of LFA-1 variants

The transfectants and parent cells were examined for cell surface expression of homologous and heterologous LFA-1 receptors by flow cytometry using anti-human/bovine CD11a (clone HI111, 555382, BD Biosciences) and/or anti-bovine CD18 (BAQ30A, VMRD) that cross-react with caprine CD11a and CD18, respectively. Briefly, 2–3 × 10⁵ cells in 1 ml of FACS buffer [phosphate buffer saline (Lonza) +1% bovine serum albumin (Sigma)] were incubated 20 min on ice and then with 1 µl of anti-CD11a and/or anti-CD18 antibody 20 min on ice. Following two washes in 1 ml FACS buffer (centrifugations of 10 min at 300 × g and 4 °C), the pellet is resuspended in 1 ml FACS buffer +1 µl Alexa 488-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody (A11001, Molecular Probes, USA) and incubated 20 min on ice. The cells were then washed three times with 1 ml FACS buffer (centrifugations of 10 min at 300 × g and 4 °C), resuspended in 500 µl PBS with 2.5 µg/ml propidium iodide (Dako, Denmark), incubated 10 min on ice in the dark and analyzed by a flow cytometer (FACSCanto, BD Biosciences, USA).

5.6. Flow cytometric analysis of Lkt-induced cytotoxicity

The transfectants and parent cells were examined for Lkt-induced cytotoxicity by flow cytometry. Briefly, 10⁵ cells in 50 µl of culture medium [RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine

serum, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1.3 µg/ml)] were incubated with 50 µl Lkt diluted in culture medium, culture medium alone (negative control) or para-formaldehyde 10% (positive control) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 30 min. Cells were then washed with 1 ml PBS and centrifuged 5 min at 200 × g and 4 °C. The pellet is resuspended in 500 µl PBS containing 2.5 µg/ml propidium iodide, incubated 10 min on ice in the dark and analyzed by a flow cytometer (FACSCanto, BD Biosciences, USA). Cell culture reagents were purchased from Lonza, Belgium.

5.7. MTS dye reduction viability assay for detection of Lkt-induced cytotoxicity

The cell viability of human and bovine cell lines in the presence of Lkt was evaluated by the tetrazolium-based colorimetric method MTS dye reduction assay (CellTiter 96[®] AQueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Belgium) following the instructions of the manufacturer. Briefly, 10⁵ cells in 50 µl of culture medium [RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1.3 µg/ml)] were incubated in a 96-well microtiter plate with 50 µl Lkt diluted in culture medium or 50 µl of culture medium alone (negative control) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 30 min. Twenty microliters of the MTS mix were then added per well for a further 3 h in the same conditions before spectrophotometric quantification at 490 nm (reference 660 nm).

In order to show that the cytolysis of ruminants leukocytes was specifically induced by Lkt, 10⁵ cells in 50 µl of culture medium were incubated in a 96-well microtiter plate with 25 µl Lkt diluted 1:16 in culture medium or 25 µl of culture medium alone (negative control) with 25 µl of the Lkt-neutralizing MAb MM601 (a generous gift from Dr Ambagala, University of Nebraska, USA) diluted in culture medium at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 30 min. Twenty microliters of the MTS mix were then added per well for a further 3 h in the same conditions before spectrophotometric quantification at 490 nm (reference 660 nm).

Acknowledgements

P. Vanden Bergh is a recipient of a studentship from the “Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture”, rue d'Egmont 5, B-1000 Bruxelles.

The authors are grateful to Prof. JF Beckers for giving access to the caprine PBMCs.

References

- Zecchinon L, Fett T, Desmecht D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res* 2005;36:133–56.
- Dungworth D. The respiratory system. In: Jubb K, Kennedy P, Palmer N, editors. *Pathology of domestic animals*. San Diego: Academic Press; 1992. p. 589–663.
- Lopez A. Respiratory system, thoracic cavity and pleura. In: McGavin M, Carlton W, Zachary J, editors. *Thomson's special veterinary pathology*. Saint-Louis Missouri: Mosby; 2001. p. 125–96.
- Yates WD. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med* 1982;46:225–63.
- Yates WD, Jericho KW, Doige CE. Effect of bacterial dose on pneumonia induced by aerosol exposure of calves to bovine herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res* 1983;44:238–43.
- Yates WD, Jericho KW, Doige CE. Effect of viral dose on experimental pneumonia caused by aerosol exposure of calves to bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*. *Can J Comp Med* 1983;47:57–63.
- Zecchinon L, Fett T, Vanden Bergh P, Desmecht D. LFA-1 and associated diseases: the dark side of a receptor. *Clin Applied Immunol Rev* 2006;6: 201–16.
- Edwards AJ. Respiratory diseases of feedlot cattle in the central USA. *Bov Prac* 1996;5:7.
- Jensen R, Pierson RE, Braddy PM, Saari DA, Lauerman LH, England JJ, et al. Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1976;169:500–6.
- Vogel JG, Parrott C. Mortality survey in feedyards: the incidence of death from digestive, respiratory and other causes in feedyards on the Great plains. *Comp Cont Educ Prac Vet* 1994;227–34.
- Slocombe RF, Malark J, Ingersoll R, Derksen FJ, Robinson NE. Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am J Vet Res* 1985;46:2253–8.
- Walker RD, Hopkins FM, Schultz TW, McCracken MD, Moore RN. Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res* 1985;46:2429–33.
- Baluyut CS, Simonson RR, Bemrick WJ, Maheswaran SK. Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: identification and partial characterization of a cytotoxin. *Am J Vet Res* 1981;42:1920–6.
- Bailly P, Tontti E, Hermand P, Cartron JP, Gahmberg CG. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immunol* 1995;25:3316–20.
- Gahmberg CG. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:643–50.
- Tian L, Yoshihara Y, Mizuno T, Mori K, Gahmberg CG. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J Immunol* 1997;158:928–36.
- Zecchinon L, Fett T, Vanden Bergh P, Desmecht D. Anatomy of the lymphocyte function-associated antigen-1. *Clin Applied Immunol rev* 2006;6:149–72.
- Wang JF, Kieba IR, Korostoff J, Guo TL, Yamaguchi N, Rozmiarek H, et al. Molecular and biochemical mechanisms of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced cell death. *Microb Pathog* 1998;25:317–31.
- Ambagala TC, Ambagala AP, Srikumaran S. The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to beta(2) integrins on bovine leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 1999;179:161–7.
- Li J, Clinkenbeard KD, Ritchey JW. Bovine CD18 identified as a species specific receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet Microbiol* 1999;67:91–7.
- Jeyaseelan S, Hsuan SL, Kannan MS, Walcheck B, Wang JF, Kehrl ME, et al. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. *Infect Immun* 2000;68:72–9.
- Deshpande MS, Ambagala TC, Ambagala AP, Kehrl Jr ME, Srikumaran S. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis. *Infect Immun* 2002;70: 5058–64.
- Zecchinon L, Fett T, Baise E, Desmecht D. Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*. *Mol Membr Biol* 2004;21:289–95.
- Dileepan T, Thumbikat P, Walcheck B, Kannan MS, Maheswaran SK. Recombinant expression of bovine LFA-1 and characterization of its role as a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Microb Pathog* 2005;38:249–57.
- Lawrence PK, Nelson WR, Liu W, Knowles DP, Foreyt WJ, Srikumaran S. beta(2) integrin Mac-1 is a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine and ovine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2008 Apr 15;122(3–4):285–94. Epub 2008 Jan 3.
- Dassanayake RP, Maheswaran SK, Srikumaran S. Monomeric expression of bovine beta2-integrin subunits reveals their role in *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced biological effects. *Infect Immun* 2007;75:5004–10.
- Fett T, Zecchinon LL, Baise EA, Desmecht DJ. Molecular characterisation of the caprine (*Capra hircus*) lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit-encoding cDNA. *BMC Vet Res* 2005;1:4.
- Dileepan T, Kannan MS, Walcheck B, Thumbikat P, Maheswaran SK. Mapping of the binding site for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin within bovine CD18. *Infect Immun* 2005;73:5233–7.
- Foreyt WJ, Jessup DA. Fatal pneumonia of bighorn sheep following association with domestic sheep. *J Wildl Dis* 1982;18:163–8.
- Sutherland AD. Effects of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin on ovine peripheral blood leukocytes and lymphocytes obtained from gastric lymph. *Vet Microbiol* 1985;10:431–8.
- Berggren KA, Baluyut CS, Simonson RR, Bemrick WJ, Maheswaran SK. Cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on bovine neutrophils. *Am J Vet Res* 1981;42:1383–8.
- Clinkenbeard KD, Mosier DA, Timko AL, Confer AW. Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on cultured bovine lymphoma cells. *Am J Vet Res* 1989;50:271–5.
- Clinkenbeard KD, Mosier DA, Confer AW. Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on isolated bovine neutrophils. *Toxicol* 1989;27:797–804.
- Czuprynski CJ, Noel EJ, Ortiz-Carranza O, Srikumaran S. Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 1991;59:3126–33.
- Miller MW, Hobbs NT, Williams ES. Spontaneous pasteurellosis in captive Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*): clinical, laboratory, and epizootiological observations. *J Wildl Dis* 1991;27:534–42.
- Brogden KA, Lehmkühl HD, Cutlip RC. *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. *Vet Res* 1998;29:233–54.
- Ackermann MR, Brogden KA. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Microbes Infect* 2000;2:1079–88.

- [38] Liu W, Brayton KA, Davis WC, Mansfield K, Lagerquist J, Foreyt W, et al. *Mannheimia (pasteurella) haemolytica* leukotoxin utilizes cd18 as its receptor on bighorn sheep leukocytes. *J Wildl Dis* 2007;43:75–81.
- [39] Gopinath RS, Ambagala TC, Deshpande MS, Donis RO, Srikumaran S. *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin binding domain lies within amino acids 1 to 291 of bovine CD18. *Infect Immun* 2005;73:6179–82.
- [40] Dassanayake RP, Shanthalingam S, Davis WC, Srikumaran S. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of ovine (*Ovis aries*) leukocytes is mediated by CD18, the beta subunit of beta(2)-integrins. *Microb Pathog* 2007;42:167–73.
- [41] Fett T, Zecchinon L, Baise E, Desmecht D. The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA: molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene* 2004;325:97–101.

8. Vers l'identification de la plateforme d'attachement de la leucotoxine dans le CD18

8.1. Inventaire des résidus critiques chez les ruminants

Une comparaison des séquences protéiques des différents CD18 séquencés jusqu'ici nous a permis de recenser les positions systématiquement occupées par un résidu (i) partagé par tous les ruminants et (ii) systématiquement différent chez les non-ruminants. Cette démarche nous a conduits à identifier 16 substitutions qui pourraient expliquer la spécificité de la leucotoxine pour le CD18 des ruminants (figure 22). Ces substitutions ont été classées par ordre décroissant de leur impact présumé sur la structure tridimensionnelle du CD18, conformément aux prédictions fournies par la matrice dite « BLOSUM-62 » (*Blocks Substitution Matrix*) (Henikoff et Henikoff, 1992; Henikoff et Henikoff, 1993). Une des substitutions est localisée dans la région transmembranaire et les 15 autres dans la partie extracellulaire (tableau 5).

Par ailleurs, nous avons également mis en évidence un 17^{ème} site dans la portion cytoplasmique du CD18 (position 736), où le résidu His strictement conservé chez les ruminants est systématiquement remplacé par un résidu Arg (score 0) ou Lys (score -1) chez les non-ruminants dont les séquences sont publiées (tableau 5), ainsi que chez le porc dont le LFA-1 est réputé permettre la liaison de la LKT, mais sans déclenchement associé d'une quelconque cytotoxicité (Jeyaseelan *et al.*, 2000).

Tableau 3 : Sites de mutation du CD18 potentiellement responsables de la mannheimiose

Score	Mutant	Position	Domaine	Acides Aminés	
				Ruminants	Non-ruminants
-2	12	620	EX	V	S
-1	7	295		S	R
-1	11	561		T	K
-1	15	692		M	S
-1 (ou 0)	17	736	CT	H	K (ou R)
0	2	90	EX	S	D
0	5	215		K	N
0	13	629		T	A
1	3	102		E	K
1	4	140		V	L
2	1	80		E	D
2	6	218		E	Q
2	8	462		R	K
3	9	469		V	I
3	10	533		F	Y
3	14	687		V	I
3	16	715	TR	V	I

La position est donnée par rapport à la numérotation du CD18 bovin. Le score assigné à chaque substitution émane de la table BLOSUM-62 et le classement est donné par ordre décroissant d'impact présumé sur la structure du CD18 (la valeur la plus basse traduit l'impact le plus important). CT, EX et TR : queue cytoplasmique, partie extracellulaire et région transmembranaire, respectivement. Les nombres inscrits dans la seconde colonne correspondent aux codes numériques associés aux différents mutants qui ont été testés.

CapCD18	MLPQRFOLL--LAGLLALOSVLSQECTKYKVSTCRDCIESGPGCAWCQKLNFTGCGEPDSTRCDTRAOLLSKGGCPADDIM	79
BovCD18	MLRQRFOLL--LAGLLALOSVLSQECTNYKVSTCRDCIESGPGCAWCQKLNFTGCGEPDSTRCDTRAOLLSKGGCPADDIM	79
OviCD18	MLPQRFOLL--LAGLLALOSVLSQECTKYKVSTCRDCIESGPGCAWCQKLNFTGCGEPDSTRCDTRAOLLSKGGCPADDIM	79
HumCD18	MLGLRPELLLA-LVGLLSLGCVLSQECTKFKVSSCRECIESGPGTCWCQKLNFTGPGDPSIRCDTRPOLLMRGGAADDIM	79
MurCD18	MLGLRPELLLA-LAGLFFLGSAVSQECTKYKVSSCRDCIESGPGCSWCQKLNFTGPGEPDSLRCDTRAOLLLKGGCPADDIM	80
CanCD18	-----LLLTLEGLFLLWAASCQECTKYKVSTCRDCIESGPGCAWCQKLNFTGLGEPDSVRCDTREOLLLKGGCAADDIM	73
CapCD18	EPKSLAETRQSOAGKQKQLSPPEVTLYLRPGQAAAFNVTFQRAKGYPIDLYYLMDSLYSMDLIDLVNKKLGGDLRLALND	159
BovCD18	EPKSLAETRQSOAGSRKQLSPPEVTLYLRPGQAAAFNVTFQRAKGYPIDLYYLMDSLYSMDLIDLVNKKLGGDLRLALND	159
OviCD18	EPKSLAETRQSOAGKQKQLSPPEVTLYLRPGQAAAFNVTFQRAKGYPIDLYYLMDSLYSMDLIDLVNKKLGGDLRLALND	159
HumCD18	DPTSIAETQEDHNGGQKQLSPQKVTLYLRPGQAAAFNVTFQRAKGYPIDLYYLMDSLYSMDLIDLVNKKLGGDLRLALNE	159
MurCD18	DPRSIANPEFDQGRQKQLSPQKVTLYLRPGQAAAFNVTFQRAKGYPIDLYYLMDSLYSMDLIDLVNKKLGGDLRLALNE	160
CanCD18	DPQSLAETIQEDKKGGKQLSPQKVTLYLRPGQAAAFNVTFQRAKGYPIDLYYLMDSLYSMDLIDLVNKKLGGDLRLALNE	153
CapCD18	ITESGRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPEKLRNCPNKEKQCQPPFAFRHVLKLTNNSKQFETEVGKQLISGNLDAPEGGLDA	239
BovCD18	ITESGRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPEKLRNCPNKEKQCQPPFAFRHVLKLTNNSKQFETEVGKQLISGNLDAPEGGLDA	239
OviCD18	ITESGRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPEKLRNCPNKEKQCQPPFAFRHVLKLTNNSKQFETEVGKQLISGNLDAPEGGLDA	239
HumCD18	ITESGRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPEKLRNCPNKEKQCQPPFAFRHVLKLTNNSNOQFETEVGKQLISGNLDAPEGGLDA	239
MurCD18	ITESGRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPEKLRNCPNKEKQCQPPFAFRHVLKLTNNSNOQFETEVGKQLISGNLDAPEGGLDA	240
CanCD18	ITESGRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPEKLRNCPNKEKQCQPPFAFRHVLKLTNNSNKEFETEVGKQLISGNLDAPEGGLDA	233
CapCD18	MMQVAACPEEIGWRNVTRLLVFATDDGFHFAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNLYKSSNEFDYPSVGQLAHKLAESENIQPI	319
BovCD18	MMQVAACPEEIGWRNVTRLLVFATDDGFHFAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNLYKSSNEFDYPSVGQLAHKLAESENIQPI	319
OviCD18	MMQVAACPEEIGWRNVTRLLVFATDDGFHFAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNLYKSSNEFDYPSVGQLAHKLAESENIQPI	319
HumCD18	MMQVAACPEEIGWRNVTRLLVFATDDGFHFAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNLYKRSENEFDYPSVGQLAHKLAESENIQPI	319
MurCD18	IMQVAACPEEIGWRNVTRLLVFATDDGFHFAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNMYKRSENEFDYPSVGQLAHKLAESENIQPI	320
CanCD18	MMQVAACPEEIGWRNVTRLLVFATDDGFHFAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNMYKRSENEFDYPSVGQLAHKLAESENIQPI	313
CapCD18	FAVTKRMVKTYEKLTEIIPKSAVGELSEDSKNVVLELIKSAYNKLSSRVFLDHNTLPDTLKVAYDSFCSNGVSVQDQPRGD	399
BovCD18	FAVTKRMVKTYEKLTEIIPKSAVGELSEDSKNVVLELIKSAYNKLSSRVFLDHNTLPDTLKVAYDSFCSNGVSVQDQPRGD	399
OviCD18	FAVTKRMVKTYEKLTEIIPKSAVGELSEDSKNVVLELIKSAYNKLSSRVFLDHNTLPDTLKVAYDSFCSNGVSVQDQPRGD	399
HumCD18	FAVTSRMVKTYEKLTEIIPKSAVGELSEDSKNVVLELIKSAYNKLSSRVFLDHNTLPDTLKVAYDSFCSNGVTHRNQPRGD	399
MurCD18	FAVTKRMVKTYEKLTEIIPKSAVGELSDSSNNVQLIKNAYNKLSSRVFLDHNTLPDTLKVAYDSFCSNGASIGKSRGD	400
CanCD18	FAVTKRMVTTYEKLTEIIPKSAVGELSDSSNNVQLIKNAYNKLSSRVFLDHNTLPDTLKVAYDSFCSNGVSVQDQPRGD	393
CapCD18	CDGVQINVPITFQVKVTATECIEQESFTIRALGFTDITVTVRVLPQCECQCRDASRDRSVCCGGRGSMCEGVVCRCDAGYICK	479
BovCD18	CDGVQINVPITFQVKVTATECIEQESFTIRALGFTDITVTVRVLPQCECQCRDASRDGSICGGRGSMCEGVVCRCDAGYICK	479
OviCD18	CDGVQINVPITFQVKVTATECIEQESFTIRALGFTDITVTVRVLPQCECQCRDASRDRSVCCGGRGSMCEGVVCRCDAGYICK	479
HumCD18	CDGVQINVPITFQVKVTATECIEQESFTIRALGFTDITVTVRVLPQCECQCRDASRDRLCHGKGFLECGTCRCDTGYICK	479
MurCD18	CDGVQINNPITFQVKVMASECIEQESFTIRALGFTDITVTVRVLPQCECQCRDQSRREQSLCGGKGVMECGICRCESGYICK	480
CanCD18	CDGVQINVPITFQVKVTATECIEQESFTIRALGFTDITVTVRVLPQCECQCRDVGQDHGLCSGKSGLECGICRCAGYICK	473
CapCD18	NCECOTHRSSQOELEGSCKRDNSSIICSLGDLICGQCVCHTSDVPNKKIYGOFCEDNVNCCERYDQVCGGKRGKLCFC	559
BovCD18	NCECOTGRSSQOELEGSCKRDNSSIICSLGDLICGQCVCHTSDVPNKKIYGOFCEDNVNCCERYDQVCGGKRGKLCFC	559
OviCD18	NCECOTHRSSQOELEGSCKRDNSSIICSLGDLICGQCVCHTSDVPNKKIYGOFCEDNVNCCERYDQVCGGKRGKLCFC	559
HumCD18	NCECOTGRSSQOELEGSCKRDNSSIICSLGDLICGQCVCHTSDVPNKKIYGOFCEDNVNCCERYDQVCGGKRGKLCFC	559
MurCD18	NCECOTGRSSQOELEGRNCRDNSSIICSLGDLICGQCVCHTSDVPNKKIYGOFCEDNVNCCERYNSQVCGGSDRGSONC	560
CanCD18	NCECOTHRSSQOELEGSCKRDNSSIICSLGDLICGQCVCHTSDVPNKKIYGOFCEDNVNCCERYDQVCGGKRVGSONC	553
CapCD18	CTCRONEQHEGSACQCLKSTQGLNLDGVECSGRGRRCRCNVCCDGYQPPICIDCPGCPVPCA-GFAPCTECLKFKDKGP	638
BovCD18	CTCRQDEQHEGSACQCLKSTQGLNLDGVECSGRGRRCRCNVCCDGYQPPICIDCPGCPVPCA-GFAPCTECLKFKDKGP	638
OviCD18	CTCRQNDQHEGSACQCLKSTQGLNLDGVECSGRGRRCRCNVCCDGYQPPICIDCPGCPVPCA-GFAPCTECLKFKDKGP	638
HumCD18	GKCRCHPGFEGSACQCERTTEGCLNPRRVECSGRGRRCRCNVCCCHSGYQLPQCECPCCSPCG-KYISCAECLKFKDKGP	638
MurCD18	GKCSCKPGYEGSACQQRSTTGCLNARLVECSGRGHCCNRCTGDEGYQPPMCEDCSGSHCRDNHTSCAECLKFKDKGP	640
CanCD18	GKQCEQNYEGSACQVCKSTQGLSTEGIECNRGRGRRCRCNVCCDGYQPPICIDCLCPSPCG-RYITCAQCLKFKQSP	632
CapCD18	FAKNCSAACGQTKLLSSPVPGGRKCKERDSEGCWMTYTLVQRDGRNRVDVHVDDMLECVKGPNIAAIVGGTVGCVVLVGT	718
BovCD18	FAKNCSAACGQTKLLSSPVPG-RKCKERDSEGCWMTYTLVQRDGRNRVDVHVDDMLECVKGPNIAAIVGGTVGCVVLVGT	717
OviCD18	FAKNCSAACGQTKLLSSPVPGGRKCKERDSEGCWMTYTLVQRDGRNRVDVHVDDMLECVKGPNIAAIVGGTVGCVVLVGT	718
HumCD18	FGKNCSAACPGLQLSNNPVKG-RTCKERDSEGCWVATLEQDGMMDRYLYVDESRECVAGPNIAAIVGGTVAGIVLVGT	717
MurCD18	FEKNCSVQACGMTLQTIPLKK-KPCKERDSEGCWMTYTLVQRDGRNRVDVHVDDMLECVKGPNIAAIVGGTVGCVVLVGT	719
CanCD18	SGRNCSEVCGNVGLLSKPEKGRCKERDLEGCVITYTLRQRAWDSEYTHVDDSRECVGGQIAPIVGGTVGCVVLVGT	712
CapCD18	LLLVIWKALTHLSDLREYHRFEKEKLKSQWNNDNPLFKSATTVMNPKFAES	770
BovCD18	LLLVIWKALTHLSDLREYHRFEKEKLKSQWNNDNPLFKSATTVMNPKFAES	769
OviCD18	LLLAIWKALTHLSDLREYHRFEKEKLKSQWNNDNPLFKSATTVMNPKFAES	770
HumCD18	LLLVIWKALTHLSDLREYHRFEKEKLKSQWNNDNPLFKSATTVMNPKFAES	769
MurCD18	LLLVIWKALTHLTDLREYHRFEKEKLKSQWNNDNPLFKSATTVMNPKFAES	771
CanCD18	LLLAIWKALTHLSDLREYHRFEKEKLKSQWNNDNPLFKSATTVMNPKFAES	764

Figure 22 : Comparaison des séquences protéiques des CD18 caprin (cap), bovin (bov), ovin (ovi), humain (hum), murin (mur) et canin (can). Les barres sur la ligne supérieure identifient les blocs constitutifs : en rouge, le peptide signal ; en blanc, le domaine extracellulaire ; en vert, la région transmembranaire et en orange, la queue cytoplasmique. Les fonds noir (6/6), gris foncé (5/6) et gris clair (4/6) représentent des niveaux décroissants d'identité entre espèces. Les fonds jaune (ruminants) et bleu (non-ruminants) mettent en évidence les différences ruminant/non-ruminant. Les nombres sur la ligne du bas correspondent aux codes numériques associés aux différents mutants qui ont été testés. Réfutation de l'hypothèse dite « du résidu critique unique »

8.1.1. Aperçu général de l'expérience

Afin de déterminer si l'une des 17 substitutions critiques précitées était responsable de la spécificité de la LKT pour le CD18 des ruminants, nous avons créé un jeu de 17 plasmides d'expression encodant chacun un CD18 artificiel dans lequel l'un des résidus « ruminant-like » était remplacé par le résidu « non-ruminant-like » correspondant. Ensuite, nous avons transfecté des cellules K562 par 17 paires différentes de plasmides d'expression, le premier encodant le CD11a bovin et le second l'un des 17 CD18 artificiels. Ce faisant, nous avons obtenu 17 préparations distinctes, chacune exprimant un hétérodimère CD11a/CD18 différent, lesquelles ont ensuite été exposées à la LKT. Pour rappel, les cellules K562 n'expriment aucune β_2 -intégrine endogène et sont, de ce fait, spontanément résistantes à la LKT. Un test de mortalité cellulaire au PI a ensuite été réalisé après exposition à la LKT. La sensibilité à la toxine des mutants 16 et 17 du CD18 a été analysée séparément (Zecchinon, 2007).

8.1.2. Matériel et méthodes

Mutagenèse dirigée

La réaction de mutagenèse dirigée est effectuée par PCR en utilisant le vecteur pcDNA4 (Invitrogen) contenant l'ADNc du CD18 bovin (pcDNA4-BoCD18) comme matrice et, comme amorces, deux oligonucléotides de 30 à 40 bases dessinées suivant les recommandations de la firme Stratagene (*QuikChange Site-Directed Mutagenesis*), à savoir qu'elles (i) contiennent la mutation visée et sont partiellement complémentaires, (ii) contiennent chacune un segment homologue long de 10 à 15 bases, (iii) ont une température de fusion (T_m , *melting temperature*) supérieure ou égale à 78°C, (iv) se terminent par un ou plusieurs C ou G, (v) ont un pourcentage minimal de GC de 40% et (vi) sont purifiées par *fast polynucleotide liquid chromatography* (FPLC) ou *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE).

Les conditions de PCR sont les suivantes : 50 ng de matrice pcDNA4-BoCD18 sont dilués dans un mélange réactionnel composé de 9 μ l de LB liquide (Sigma-Aldrich), 5 μ l de dNTPs 2 mM (Fermentas), 5 μ l de tampon *Thermopol* (New England Biolabs), 0,5 μ l de $MgSO_4$ 100 mM (New England Biolabs), 2,5 μ l de DMSO (diméthylsulfoxyde), 2 μ l de chaque amorce à 10 μ M, 0,5 μ l de polymérase *Vent* (2 u/ μ l, New England Biolabs). Le tout est amené à 50 μ l avec de l'eau sans nucléases.

Les paramètres d'amplification sont les suivants : 3 min à 94°C, 18 cycles incluant (i) 1 min à 94°C, (ii) 1 min à 63°C et (iii) 8 min à 72°C, suivis d'une extension finale de 60 minutes à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite digérés par la *DpnI* (New England Biolabs), qui est une enzyme de restriction coupant les brins d'ADN méthylés comme la matrice de départ (pcDNA4-BoCD18), pendant 1 h à 37°C avant transformation (10 μ l de produit de PCR) de bactéries compétentes TOP 10 (Invitrogen) et étalement sur milieu LB agar additionné d'ampicilline (100 μ g/ml). L'indentification des clones recombinants est effectuée par séquençage comme décrit au point 7.2.2.

Les amorces qui ont été utilisées avec succès sont les suivantes :

BoCD18 mut1 sens	5'-catcatgga Y ccaagagcctcgctgagacccggg-3'
BoCD18 mut1 rev	5'-ggctcttggg R tccatgatgtcatcagctgggcagc-3'
BoCD18 mut2 sens	5'-cccgggac GAY caggcgggcagtcggaagcagctg-3'
BoCD18 mut2 rev	5'-gcccgcctg RTC gtcccggtctcagcgaggctc-3'
BoCD18 mut3 sens	5'-gtccccacag A aagtgcgctctacctgagaccagg-3'
BoCD18 mut3 rev	5'-gagcgrcactt T ctgtggggacagctgctccgactg-3'
BoCD18 mut4 sens	5'-cctactccatg Y tggatgacctcgtaacgtcaag-3'
BoCD18 mut4 rev	5'-ggtcacca R catggagtaggagaggtccatcagg-3'
BoCD18 mut5 sens	5'-caactccaa Y cagttcgagacagaagtcgggaagc-3'
BoCD18 mut5 rev	5'-ctcgaactg R ttggagttgtcagtgagcttaacacg-3'
BoCD18 mut6 sens	5'-ccaaacagttc CaR acagaagtcgggaagcagctg-3'
BoCD18 mut6 rev	5'-cgacttctgt YtG gaactgtttggagttgtcagtgagc-3'
BoCD18 mut7 sens	5'-cctgtacaaaag R agcaacgaattgactaccatcgg-3'
BoCD18 mut7 rev	5'-cgttgct Y ctttgtacagttgtctccaggtggc-3'
BoCD18 mut8 sens	5'-cggcggca A aggctcgatggagtgcggcgtctgcag-3'
BoCD18 mut8 rev	5'-cgagcct T tgccgccgagatgctgccgtccctg-3'
BoCD18 mut9 sens	5'-gagtgcggc A tctgcaggtgtgacccggctacatc-3'
BoCD18 mut9 rev	5'-ctgcaga T gccgcactccatcgagcctctgccgc-3'
BoCD18 mut10 sens	5'-ggccagt A ctgcgagtgcgacaacgtcaactgcgaac-3'
BoCD18 mut10 rev	5'-ctgcag T actggccgtagatcttctgttgggcac-3'
BoCD18 mut11 sens	5'-ctgcggca AR tgcaggtgcgacgagcagtatgagg-3'
BoCD18 mut11 rev	5'-cacctgca YT tgccgcagaagcagagccccctc-3'
BoCD18 mut12 sens	5'-ctgcccc TC gccctgtgcgggcttcgccccctgcac-3'
BoCD18 mut12 rev	5'-cacagggc GA ggggcagcccgggcactcgctgcac-3'
BoCD18 mut13 sens	5'-cccctgc G cagagtcctgaagttcgacaagggcc-3'
BoCD18 mut13 rev	5'-cactctg C gcagggggcgaagcccgacagggcac-3'
BoCD18 mut14 sens	5'-gatacgac ATH cacgtggacgacatgctcagtg-3'
BoCD18 mut14 rev	5'-gtccacgtg DAT gtcgtatctgtccgcccgtcgc-3'
BoCD18 mut15 sens	5'-ggacgaca GR ctcagtggtgaaggccccaac-3'
BoCD18 mut15 rev	5'-cactcgag Y Ctgcgtccacgtgcacgtcgtatc-3'

où les lettres en majuscules et en gras représentent les bases mutées selon le code suivant :

D = A ou G ou T, H = A ou C ou T, R = A ou G et Y = C ou T.

Expression des CD18 en cellules K562, exposition à la LKT et test de mortalité

Après purification, tous les plasmides d'expression ont été transfectés par *nucleofection* (*Cell Line Nucleofector kit V*, Amaxa) dans des cellules K562. Pour l'électroporation, 2,5 µg de chaque plasmide d'expression ont été introduits dans la mixture réactionnelle. L'expression en surface a été détectée par immunomarquage en cytométrie en flux en FL1 (excitation à 488 nm et émission à 530±15 nm). L'anticorps utilisé était une IgG dressée contre le CD11a humain (clone HI111, BD Biosciences) conjuguée au FITC et reconnaissant également le CD11a bovin. Les cellules exprimant les différents LFA-1 mutés ont été exposées à la LKT et ont ensuite été enrôlées dans le test de mortalité précité (comme décrit précédemment avec une durée d'incubation de 30 min).

8.1.3. Résultats

La sensibilité à la LKT éventuellement conférée à des cellules K562 (naturellement LKT-résistantes parce que n'exprimant aucune β_2 -intégrine) par la coexpression du CD11a bovin d'une part, et des différents CD18 mutés d'autre part, a été évaluée en établissant le taux de cellules PI-positives par cytométrie en flux (figure 23). Nous avons constaté que les préparations cellulaires transfectées avec les CD18 mutés se comportent toutes comme celle transfectée par le CD18 bovin originel vis-à-vis de la LKT avec (i) une corrélation positive entre le taux de mortalité induit par l'exposition à la toxine et la concentration de la toxine (ii) une fraction morte maximum (dans les conditions de l'expérience) équivalant à plus de 2,5 fois la mortalité spontanée en absence de LKT. Par contre, aucune sensibilité n'est observée pour la préparation cellulaire transfectée avec le mutant 1, avec un taux de mortalité stable quelle que soit la concentration de LKT. Cependant, si l'on analyse l'expression des différents LFA-1, on note que celle-ci varie systématiquement entre 60% et 80% pour les mutants 2 à 15 et la version originale d'une part, et de 0 à 25% pour le mutant 1, d'autre part.

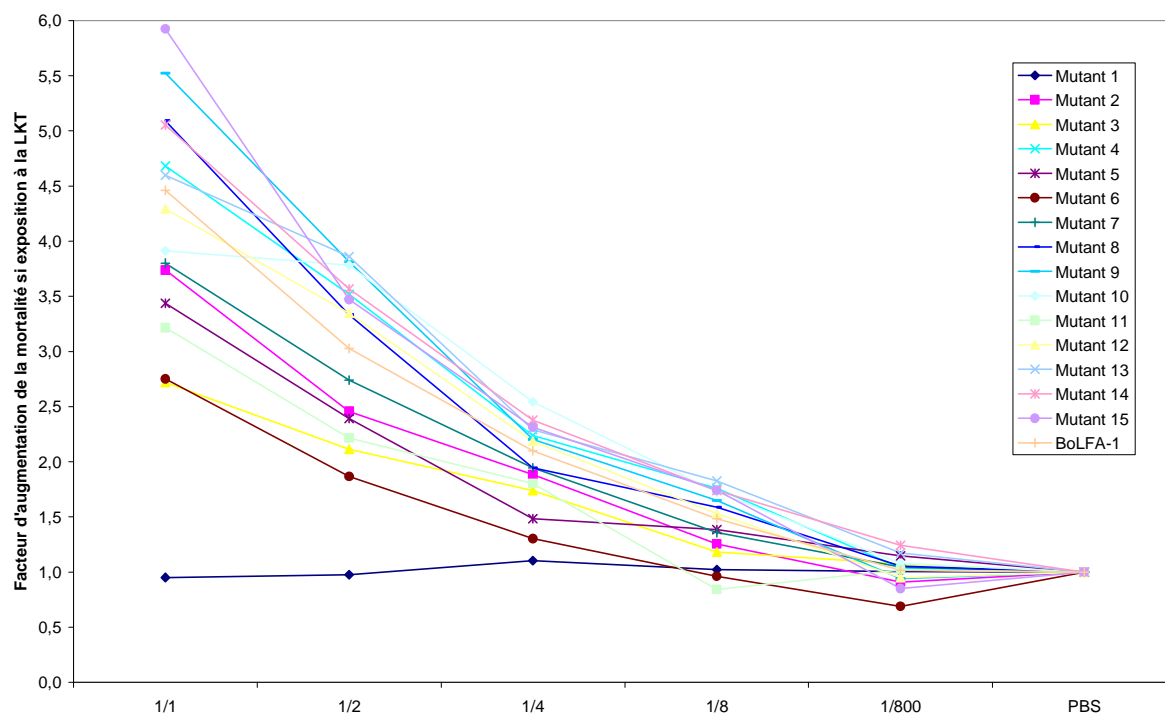


Figure 23 : Mortalité des cellules K562 mutants cotransfectées avec le CD11a bovin et le CD18 muté après exposition à la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica*. Le graphique présente le facteur de mortalité (ordonnée), lequel correspond au ratio entre le taux de cellules iodure-de-propidium-positives après exposition au PBS complémenté ou non en LKT. En abscisse, de gauche à droite : 5 dilutions croissantes de la solution-mère de leucotoxine, le contrôle négatif (PBS). Toutes les cellules expriment le CD11a bovin et le CD18 muté. Le contrôle positif est représenté par le LFA-1 original (BoLFA-1). Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations.

8.1.4. Conclusion

Afin d'évaluer l'impact des 17 mutations typiquement observées dans le CD18 des espèces sensibles (les ruminants), nous avons utilisé deux approches différentes.

La première consistait en une expérience de compétition entre la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* et différents peptides dérivés de la séquence du CD18 bovin au voisinage des sites précités. La présence des peptides, seuls ou en mélange équimolaire, n'a jamais donné lieu à une inhibition, fût-elle partielle, de l'activité leucotoxique dirigée contre les cellules bovines BL-3. Cette étude a été relatée dans le cadre de la thèse doctorat de Laurent Zecchinon (Zecchinon, 2007).

Dans la seconde expérience, nous avons réalisé des transfections transitoires de la lignée humaine K562. Celle-ci est connue pour n'exprimer naturellement aucune β_2 -intégrine et pour sa sensibilité à la leucotoxine après expression des sous-unités CD18 et CD11a bovines (Dileepan *et al.*, 2005b). Lorsque le CD18 bovin originel a été remplacé par les CD18 mutants 16 et 17 (substitutions respectivement dans les domaines transmembranaire et cytoplasmique), aucune perte de sensibilité à la LKT n'est apparue (cf. thèse de doctorat de Laurent Zecchinon (Zecchinon, 2007)). Ici, lorsque le CD18 bovin originel a été remplacé par les CD18 mutants 2 à 15 (substitutions dans le domaine extracellulaire), aucune résistance particulière à la LKT n'a été mise en évidence. Quant à la mutation au site 1, elle aurait un impact sur l'expression du récepteur puisque, en dépit de multiples essais, nous

n'avons jamais pu obtenir un taux d'expression membranaire supérieur à 25%. Nous avons conclu qu'aucune des substitutions typiques des CD18 des ruminants n'est suffisante pour expliquer la spécificité de la LKT pour ce même CD18.

Il est à noter que l'intégralité de cette étude avait été réalisée avant que les équipes dirigées par MM. Srikumaran et Maheswaran ne montrent, respectivement, que le peptide signal (Gopinath *et al.*, 2005; Shanthalingam et Srikumaran, 2009) ou le domaine EGF-3 (Dileepan *et al.*, 2005a; Dileepan *et al.*, 2007b) du CD18 jouent un rôle dans la sensibilité à la LKT.

8.2. Réfutation du rôle-clé du peptide signal en cellules P815

8.2.1. Aperçu général de l'expérience

Dans les expériences précédentes, nous avons démontré l'importance du domaine EGF-3 et la non implication du peptide signal du CD18 bovin dans la cytotoxicité induite par la LKT. Ce faisant, nous avons confirmé et consolidé les résultats obtenus par l'équipe du Professeur Maheswaran (Dileepan *et al.*, 2007b). Toutes ces expériences ont été réalisées en cellules K562, c'est-à-dire dans une lignée cellulaire humaine n'exprimant aucune β_2 -intégrine. Or, l'équipe de nos contradicteurs examine le même phénotype dans une lignée immortelle de mastocytes murins (P815), lesquels expriment le LFA-1 endogène (Shanthalingam et Srikumaran, 2009). Dès lors, pour réfuter l'hypothèse avancée par l'équipe de Srikumaran selon laquelle les cellules K562 génèreraient des résultats artefactuels, nous avons entrepris de confirmer nos résultats dans cette lignée P815.

Dans l'expérience qui suit, trois chimères des CD18 bovin et humain et trois chimères des CD18 bovin et murin sont transfectées en cellules P815 et la LKT-sensibilité du LFA-1 résultant est mesurée comme précédemment.

8.2.2. Matériel et méthodes

Construction des plasmides d'expression encodant les CD18 chimériques

Les plasmides capables d'impulser l'expression des CD18 bovin/humain et bovin/murin chimériques pour le peptide signal et/ou le domaine EGF-3 ont été élaborés précédemment (cf. paragraphe 8.3.2.).

Expression des CD18 en cellules P815, exposition à la LKT et test de mortalité

Les plasmides d'expression ont été transfectés par *nucleofection* (Cell Line Nucleofector kit T, Amaxa) en cellules P815, à raison de 2,5 μ g dans 100 μ l de milieu de *nucleofection* contenant 1 million de cellules. L'expression en surface a été détectée par immunomarquage en cytométrie en flux en FL1 (excitation à 488 nm et émission à 530 \pm 15 nm). L'anticorps primaire utilisé était une IgG de souris dressée contre le CD18 bovin (clone BAQ30A, VMRD) et le secondaire était une IgG conjuguée à l'Alexa 488 dressée contre celles de souris (clone A11001, Molecular Probes). Les

cellules exprimant les différents LFA-1 chimériques ont été exposées à la LKT et ont ensuite été enrôlées dans le test de mortalité précité (comme décrit précédemment avec une durée d'incubation de 1 h).

8.2.3. Résultats

La sensibilité à la LKT éventuellement conférée aux cellules P815 (naturellement LKT-résistantes puisque exprimant les β_2 -intégrines endogènes, donc de souris) par l'expression du CD18 bovin ou de l'un des CD18 chimérique pour le peptide signal et/ou le domaine EGF-3 a été évaluée en mesurant le taux de mortalité consécutif à une exposition standardisée à la LKT. Nous avons constaté que toutes les préparations cellulaires transfectées avec un CD18 bovin dont le module EGF-3 était remplacé par celui de l'homme (Figure 31) restaient incapables de rendre les cellules LKT-sensibles. Par contre, les préparations cellulaires transfectées avec un CD18 bovin dont le peptide signal, et le peptide signal seulement, était remplacé par celui de l'homme montraient une sensibilité à la LKT.

Comme contrôle négatif, nous avons utilisé la lignée cellulaire P815 non transfectée. Les taux d'expression des CD18 exogènes ont varié entre 42% et 60%.

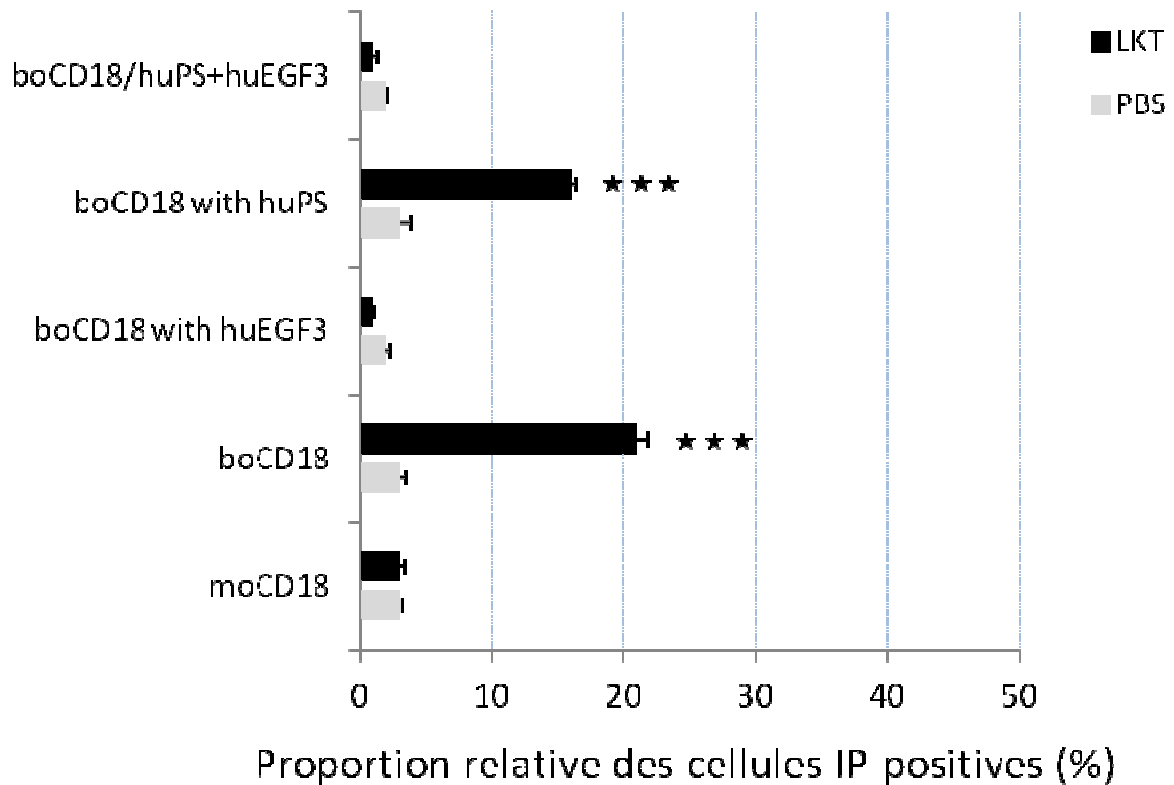


Figure 31 : Mortalité des cellules P815 transfectées avec divers CD18 chimériques bovin/humain après exposition à la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica*. Le graphique présente les taux de mortalité (proportion de cellules iodure-de-propidium-positives) mesurés au sein des diverses sous-populations de cellules K562 LFA-1-positives (marquage du CD11a bovin membranaire). Toutes les cellules expriment, de bas en haut, le CD18 murin endogène (MoCD18), une mixture du CD18 murin et du CD18 bovin (BoCD18), une mixture du CD18 murin et du CD18 bovin chimérique pour le domaine EGF-3 humain (HuEGF3), une mixture du CD18 murin et du CD18 bovin chimérique pour le peptide signal humain (HuPS) et une mixture du CD18 murin et du CD18 bovin chimérique pour le module EGF3 et le peptide signal humains (HuPS+EGF3). Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations et correspondent à la moyenne de trois mesures. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Les valeurs qui sont significativement différentes de la valeur du contrôle négatif (P815) sont indiquées par trois astérisques ($p < 0,001$).

8.2.4. Conclusion

Nous avons voulu évaluer l'impact du remplacement de deux domaines, le peptide signal et le module EGF-3, par les domaines orthologues « résistants » dans le CD18 bovin en présence de leucotoxine de *M. haemolytica*. Cette expérience a été réalisée *in vitro* dans les cellules murines exprimant naturellement les β_2 -intégrines murines endogènes, les P815. Le CD18 contenant le module EGF3 humain n'a pas conféré de sensibilité à la LKT. A l'inverse, greffer le peptide signal humain sur un CD18 bovin n'en a pas aboli la faculté de conférer une sensibilité à la LKT. Ces résultats confirment les expériences identiques précédemment réalisées en cellules K562. Par contre, ils contredisent les travaux du Professeur Srikumaran et de ses collaborateurs réalisés dans les mêmes conditions (Shanthalingam et Srikumaran, 2009).

8.3. Inhibition compétitive alléguée entre peptide signal membranaire et soluble

8.3.1. Aperçu général de l'expérience

Dans leurs travaux démontrant le rôle crucial du peptide signal non clivé des ruminants pour conférer une sensibilité à la LKT, Srikumaran et collaborateurs ont notamment montré que deux peptides synthétiques analogues aux séquences du peptide signal du CD18 bovin et incorporés à la solution de LKT en supprimaient totalement la cytotoxicité ultérieure pour les cellules bovines (Shanthalingam et Srikumaran, 2009). Ce résultat suggère effectivement l'intervention d'une inhibition compétitive entre les peptides solubles incorporés et le peptide signal du CD18 pour la liaison à la LKT. Comme nos travaux antérieurs ne confirmaient pas cette interprétation, nous avons testé la reproductibilité de cette expérience dans nos conditions. Nous avons donc généré deux peptides synthétiques, l'un correspondant à la séquence du peptide signal des ruminants et l'autre, constitué des mêmes acides aminés, mais disposés de manière aléatoire. Ensuite, nous les avons incorporés à la solution contenant la LKT et avons exposé des cellules lymphoïdes bovines à la mixture résultante.

8.3.2. Matériel et méthodes

Peptides

Le premier peptide, P1, est analogue à la séquence 1-20 du peptide signal du CD18 bovin. Le peptide PSC1 (*peptide scrambled*) contient la même séquence que le peptide P1 mais dans un ordre aléatoire (<http://www.mimotopes.com/peptideLibraryScreening.asp?id=97>). Ils sont fournis lyophilisés (Proteogenix) et sont resuspendus dans du DMSO à une concentration de 10 mg/ml pour les expériences.

Les séquences des peptides utilisés sont les suivantes :

P1 : MLRQRPQLLLLAGLLALQSV

PSC1 : LVLQLMRRLQLALAPQLGLS

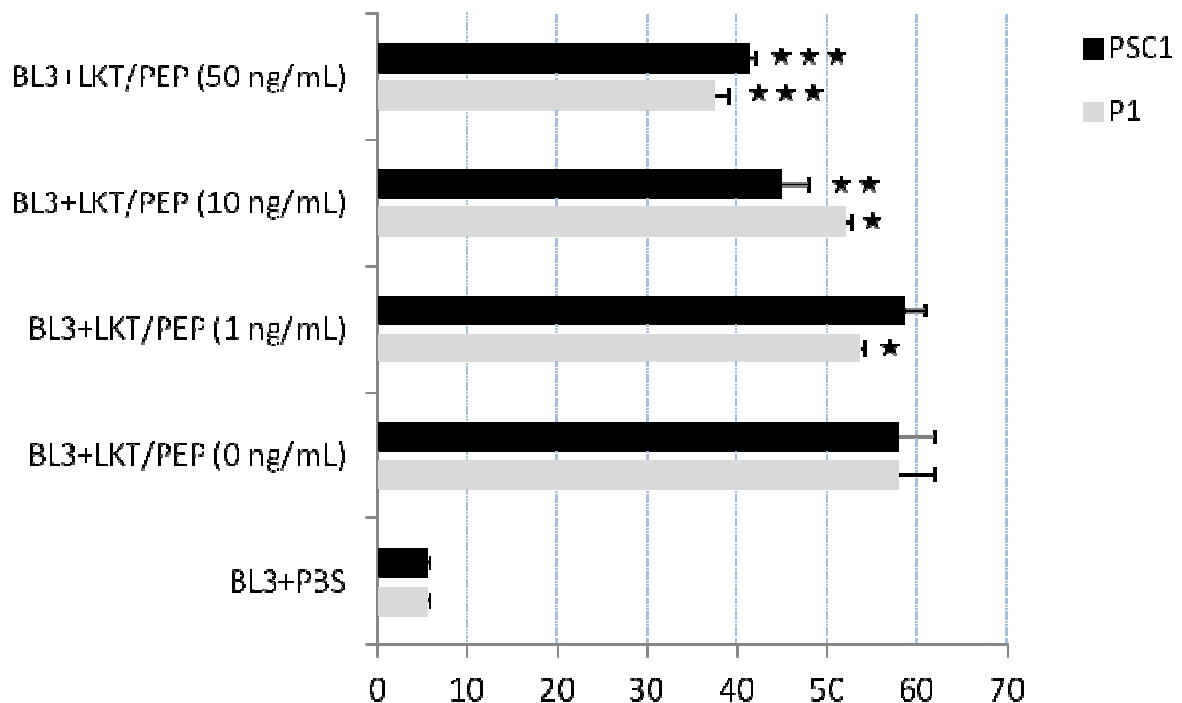
Test de cytotoxicité

Cent mille cellules BL-3, incubées dans 50 µl de RPMI, sont mises en présence de PBS enrichi ou non en LKT purifiée et enrichi ou non en peptide P1 ou PSC1 à différentes concentrations finales (50, 10 et 1 ng/µl), et ce pendant 1 h à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le tout est ensuite lavé par 1 ml de PBS à 4°C et centrifugé pendant 5 min à 300 g. Le culot est resuspendu dans 500 µl de PBS contenant 2,5 µg/ml d'iodure de propidium (Invitrogen) puis incubé

pendant au minimum 10 min sur glace et dans l'obscurité avant analyse par cytométrie en flux (FACSCanto, BD Biosciences) en FL1 (excitation à 488 nm et émission à 530±15 nm) avec sélection des 10000 premiers événements.

8.3.3. Résultats

Nous avons observé une inhibition de la cytotoxicité de la LKT en présence du peptide P1 aux trois concentrations testées. On constate également une corrélation positive entre cette inhibition et la concentration en peptide P1. En ce qui concerne le peptide PSC1 (même contenu en acides aminés que P1 mais ceux-ci ayant été disposés de manière aléatoire), il atténue aussi l'activité cytotoxique de la LKT lorsque sa concentration augmente (figure 32). Comme contrôle positif, nous avons utilisé les BL-3 incubées avec une mixture de LKT en PBS et de DMSO (10 mg/ml).



Proportion relative des cellules IP-positives (%)

Figure 32 : Mortalité des cellules BL-3 après exposition à la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* préincubée avec le peptide P1 (en gris) ou le peptide PSC1 (en noir). Le graphique présente les taux de mortalité (proportion de cellules iodure-de-propidium-positives) mesurés au sein des diverses sous-populations de cellules K562 LFA-1-positives (marquage du CD11a bovin membranaire). En ordonnée, de haut en bas : 4 concentrations décroissantes en peptides et le contrôle positif (absence de peptides). Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations et correspondent à la moyenne de trois mesures. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Les valeurs qui sont significativement différentes de la valeur du contrôle positif (absence de peptides) sont indiquées par une ($p < 0,01$), deux ($p < 0,05$) et trois astérisques ($p < 0,001$).

8.3.4. Conclusion

Cette expérience confirme les résultats publiés antérieurement par Srikumaran et collaborateurs en ce qui concerne l'activité anti-LKT du peptide P1 en solution (Shanthalingam et Srikumaran, 2009).

TROISIÈME PARTIE :
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

9. Discussion générale

Les ruminants en général, les bovins élevés en conditions intensives en particulier, sont enclins aux pneumonies bactériennes. La littérature scientifique vétérinaire incrimine *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, *Streptococcus spp.* et *Staphylococcus spp.* (Dungworth, 1992; Lopez, 2001). De la revue de littérature qui débute la thèse, il ressort que *M. haemolytica* est indubitablement le microbe le plus fréquemment isolé et celui dont la virulence pour le système respiratoire des bovins est la plus manifeste. En parcourant la littérature vétérinaire, il apparaît aussi que la plupart des auteurs considèrent que *M. haemolytica* n'est étroitement associée à une maladie que chez les ruminants. En outre, au moment de débiter cette thèse, on savait (i) que la maladie expérimentale induite par *M. haemolytica* est moins grave chez des animaux déplétés de leurs PMN, (ii) que le facteur de virulence principal de *M. haemolytica* est sa leucotoxine (LKT), (iii) que cette LKT cause la nécrose des leucocytes des ruminants *in vitro* mais pas celle des leucocytes des autres espèces et (iv) que des anticorps monoclonaux dressés contre la β_2 -intégrine LFA-1 protègent les leucocytes des ruminants contre la nécrose induite par la LKT. Le modèle en vogue quand nous avons débuté les recherches présentées ici (2002) stipulait que la LKT de *M. haemolytica* est un ligand spécifiquement dressé contre la β_2 -intégrine LFA-1 exprimée à la surface des leucocytes des ruminants et que la liaison déclenche une cascade d'événements menant, selon la concentration, à l'apoptose ou à la nécrose des leucocytes concernés, ce qui, *in vivo*, libère un cocktail de molécules qui sont responsables de l'exacerbation des lésions pulmonaires chez les ruminants.

L'objectif de la thèse était de mieux comprendre la nature de l'interaction entre la LKT et la β_2 -intégrine LFA-1 et, si possible, d'identifier la plateforme de liaison de la LKT sur l'une des deux sous-unités constitutives du LFA-1 (les glycoprotéines CD11a et CD18). Dès le début, l'angle d'attaque choisi fut de confronter les β_2 -intégrines LFA-1 de différentes espèces puisque, selon la littérature disponible, seuls les LFA-1 des ruminants semblaient pouvoir fonctionner comme récepteurs de la LKT.

Nous avons d'abord voulu identifier celle des deux sous-unités constitutives de la β_2 -intégrine LFA-1 qui fonctionne comme récepteur effectif. Dans ce but, nous souhaitions (i) exprimer des hétérodimères bispécifiques (CD11a « ruminant » / CD18 « nonruminant » et inversement) à la surface de cellules dépourvues de β_2 -intégrines (K562) et (ii) mesurer si nous conférions ou non une sensibilité à la LKT en exprimant tel ou tel hétérodimère CD11a/CD18 bispécifique. Comme les séquences des gènes encodant les CD11a des ruminants n'étaient pas disponibles et que nous devions en disposer pour générer notre propre jeu de plasmides d'expression capables d'encoder les CD11a des ruminants, nous nous sommes lancés dans le séquençage des séquences codantes des bovins, ovins et caprins par RACE-PCR, ce qui a donné lieu aux trois premières publications précitées (Fett *et al.*, 2004; Fett *et al.*, 2005a; Fett *et al.*, 2005b). Nous avons effectué un travail similaire pour les CD18

ovin (Zecchinon *et al.*, 2004b) et caprin (Zecchinon *et al.*, 2004a), la séquence bovine ayant déjà été rendue publique à la faveur des recherches antérieures menées pour identifier la mutation causale du syndrome BLAD (Shuster *et al.*, 1992a; Shuster *et al.*, 1992b). Au moment même où nous disposions du jeu de plasmides d'expression encodant les CD11a et CD18 bovin, ovin, caprin et humain nécessaire pour identifier la sous-unité fonctionnant comme récepteur de la LKT, nous avons eu la désagréable surprise de découvrir la nouvelle publication d'une des deux équipes concurrentes, qui excluait l'intervention du CD11a. Dans les semaines qui ont suivi, notre jeu de plasmides d'expression nous a permis de confirmer ces résultats.

A l'instar des deux équipes concurrentes, nous avons alors voulu contribuer à l'identification du module interne aux CD18 des ruminants spécifiquement ciblé par la LKT. Le choix méthodologique qui s'imposait logiquement était de générer un jeu de CD18 bovins chimériques dont les modules constitutifs seraient progressivement substitués par leur version « non-ruminant » (donc LKT-résistante). Comme nous savions que les deux équipes concurrentes disposaient de quelques mois d'avance, nous avons plutôt choisi de sauter l'étape « substitution modulaire » pour adresser directement l'hypothèse « du résidu causal unique » ; un choix plus risqué en terme de probabilité de succès, mais probablement le seul capable de nous permettre de recoller aux concurrents. Pour ce faire et dans la foulée de notre angle d'attaque initial, nous avons inventorié, au sein de la portion extracellulaire du CD18, les résidus simultanément (i) conservés chez les ruminants et (ii) systématiquement différents chez les non-ruminants. Ce faisant, nous avons élaboré une liste de 17 résidus typiquement « ruminants ». Ensuite, nous avons généré un jeu de 17 plasmides d'expression encodant chacun un CD18 bovin artificiel dans lequel l'un des 17 résidus « ruminant » était substitué par son le résidu « non-ruminant » correspondant. Ensuite, nous avons cotransfecté un plasmide encodant le CD11a bovin et l'un des plasmides du jeu de 17 précités en cellules LKT-résistantes K562, nous avons vérifié la réalité de l'expression membranaire des 17 hétérodimères CD11a/CD18 correspondants et nous avons montré que tous conféraient une sensibilité à la LKT. Nous avons donc réfuté formellement l'hypothèse « du résidu causal unique ».

Pendant ce temps, les équipes concurrentes menaient leurs propres études à terme en adoptant, comme attendu, une démarche méthodologique consistant à tester un jeu de CD18 bispécifiques constitués de différentes combinaisons des modules constitutifs des CD18 bovin (LKT-sensible) et humain/murin (LKT-résistant). De manière surprenante, les deux groupes ont abouti à des conclusions diamétralement opposées quant au domaine fonctionnant comme support de la sensibilité à la LKT : la portion N-terminale du CD18 bovin et son peptide signal pour l'un, la portion C-terminale du CD18 bovin et son module EGF-3 pour l'autre. Après avoir montré qu'un CD18 artificiel constitué de la moitié N-terminale du CD18 de la souris conjuguée à la moitié C-terminale du CD18 des bovins résistait à l'activité pronécrosante de la LKT (Gopinath *et al.*, 2005), la première équipe a démontré que l'environnement peptidique très inhabituel du site de clivage du peptide signal du CD18 des ruminants, une glutamine en position -5 par rapport au site de clivage, empêche ledit clivage et qu'une substitution de cette glutamine en un résidu plus orthodoxe (une glycine, comme dans le CD18 des

primates et des rongeurs) permet l'excision du peptide signal et rend simultanément le CD18 bovin totalement résistant à la LKT (Shanthalingam et Srikumaran, 2009). Inversement, un jeu de CD18 chimériques résultant de différentes combinaisons des blocs constitutifs des CD18 humain et bovin permettait à la seconde équipe d'associer la sensibilité d'un CD18 quelconque à l'effet pronécrosant de la LKT au segment étalé entre les résidus 500 et 600 de la portion extracellulaire (Dileepan *et al.*, 2005a). Par la suite, la zone incriminée était restreinte au module EGF-3 (Dileepan *et al.*, 2007b).

Nous avons donc été confrontés à deux modèles explicatifs radicalement contradictoires. Reprenant alors tous les travaux disponibles sur le sujet pour tenter de trouver une nouvelle piste, nous avons perçu que tous les acteurs avaient inconsciemment accepté de raisonner dans un contexte excessivement manichéen où les CD18 « résistants » de la souris et de l'homme étaient confrontés aux CD18 « sensibles » des bovins, des chèvres et des moutons. Sauf qu'un détail resté au second plan suggérait une réalité plus complexe : la LKT se lie au CD18 porcin, mais ce *binding* ne déclenche pas de cascade menant à l'apoptose ou à la nécrose (Sun *et al.*, 1999). Fidèle à notre angle d'attaque initial, nous avons alors décidé d'élargir l'éventail des CD18 à décrire et à tester.

Globalement, nos résultats confirment et complètent le modèle physiopathologique élaboré par le groupe du Professeur Maheswaran quant au rôle du module EGF-3. Nous y adjoignons la démonstration de l'effet adjuvant de la présence d'un peptide signal non clivé. Inversement, nos résultats fondés sur une approche inter-espèces sont loin de confirmer tous ceux générés par le groupe du Professeur Srikumaran. En effet, le modèle élaboré par ces derniers stipule que le peptide signal non clivé des ruminants est nécessaire et suffisant pour expliquer qu'un CD18 quelconque confère une sensibilité à la LKT. De notre côté, nous mettons en évidence le rôle crucial de la nature du module EGF-3 et le rôle secondaire d'adjuvant joué par un peptide signal non clivé. Dans sa dernière publication, le groupe du Professeur Srikumaran jette le discrédit sur les travaux de ses concurrents en affirmant, notamment, que le choix de la cellule K562 ne serait pas judicieux et générerait des résultats artefactuels. Quoique, à notre connaissance, cette remarque ne soit fondée sur aucune donnée objective, nous avons reproduit nos expériences initiales dans la lignée cellulaire utilisée par ce groupe (P815, lignée mastocytaire murine continue). Ce faisant, nous avons démontré que nos résultats étaient bien les mêmes, quelle que soit la lignée cellulaire utilisée (figure 31). Par contre, le second argument utilisé par l'équipe du Professeur Srikumaran est expérimentalement mieux étayé : il s'agit de la démonstration que l'incorporation préalable d'un peptide correspondant au peptide signal bovin dans la solution de LKT en diminue la cytotoxicité vis-à-vis des leucocytes bovins (Shanthalingam et Srikumaran, 2009). Ce résultat suggère la présence d'une inhibition compétitive pour la LKT entre le peptide signal en solution et le peptide signal connecté au CD18. Nous avons tenté la même expérience dans nos conditions, en comparant l'effet de l'incorporation du peptide signal bovin à l'effet de l'incorporation d'un peptide synthétique constitué des mêmes acides aminés mais se succédant aléatoirement. Ce faisant, nous avons confirmé l'existence d'une inhibition de l'effet pronécrosant de la LKT par l'incorporation préalable du peptide signal bovin libre dans la solution de LKT. Cependant, nous avons également montré que le peptide aléatoire constitué des mêmes acides

aminés était aussi capable d'inhiber significativement l'activité de la LKT. A ce point de vue, nous regrettons que le groupe du Professeur Srikumaran n'ait pas jugé bon de révéler la séquence de son propre peptide « contrôle » ce qui ne nous a pas permis de dupliquer son expérience dans nos conditions. Quoiqu'il en soit, nos résultats suggèrent qu'une exposition de la LKT à un peptide quelconque constitué d'une proportion élevée de résidus hydrophobes en diminue l'activité pronécrosante. Comme la LKT est elle-même une molécule très hydrophobe (el Rassi *et al.*, 1998), la probabilité d'une interaction avec un peptide signal, par nature hydrophobe lui aussi, paraît, au moins, plausible.

Comment dès lors, si pas réconcilier, au moins proposer une explication plausible à la contradiction apparente entre nos résultats et ceux de l'équipe du Professeur Srikumaran ? De notre point de vue, une différence méthodologique subtile pourrait jouer un rôle sous-estimé. Les CD18 ectopiques ont toujours été testés après *nucleofection* transitoire par notre groupe, alors qu'ils ont toujours été testés après transfection et sélection de clones stables par le groupe du Professeur Srikumaran. L'expérience montre que la transfection transitoire permet souvent d'atteindre des niveaux d'expression très supérieurs à ceux mesurés après dérivation de clones stables. Donc, la sensibilité de la détection d'un effet cytopathogène est probablement très supérieure dans nos conditions, ce qui pourrait expliquer pourquoi, dans une expérience au design identique, nous soyons capables de détecter un effet cytopathogène là où le groupe du Professeur Srikumaran ne détecte plus rien. D'où cette contradiction apparente entre atténuation observée dans notre laboratoire et abolition mesurée par l'équipe du Professeur Srikumaran de l'effet cytopathogène lors de la conjugaison d'un peptide signal dûment clivable.

Dans la même veine, les hétérodimères CD11a/CD18 artificiels utilisés par nos deux groupes sont systématiquement différents en ce qui concerne la nature du partenaire CD11a : murin pour le groupe du professeur Srikumaran et bovin dans notre cas. Or, des travaux récents (Kieba *et al.*, 2007) montrent que la nature du partenaire CD11a affecte significativement l'interaction, également tenue pour être spécifique, entre la leucotoxine d'*Actinobacillus actinomycetemcomitans* et son récepteur, le CD18 humain. Ces auteurs montrent que, s'agissant de l'intensité de la cytolysse induite par cette autre toxine RTX, les CD11a humain et bovin sont interchangeables tandis que leur remplacement par le CD11a murin inhibe fortement la cytolysse. Il semble donc plausible que l'hétérodimère CD11a/CD18 murin/bovin puisse être beaucoup moins favorable à l'exercice de la cytotoxicité de la LKT que "notre" hétérodimère CD11a/CD18 bovin/bovin. Nos propres expériences fournissent d'ailleurs une première donnée objective à l'appui de cette hypothèse. En effet, le taux de cellules PI-positives après exposition à une solution standard de LKT a toujours été largement supérieur en cellules K562 exprimant un LFA1 naturel bovin/bovin qu'en cellules P815 exprimant un hétérodimère artificiel, murin/bovin. Ce rôle atténuateur potentiel sous-tendu par la nature du CD11a pourrait donc expliquer aussi pourquoi il suffit au groupe de Srikumaran d'exciser le peptide signal pour ne plus mesurer de cytotoxicité. Si ces spéculations devaient être confirmées, le modèle le plus proche de la réalité

consisterait à poser que l'activité cytotoxique maximum de la LKT requiert la présence simultanée du CD11a bovin, d'un module EGF3 de ruminant et d'un peptide signal non clivé.

10. Perspectives

10.1. A moyen terme : chimiothérapie et sélection

D'après nos expériences, l'instauration d'une peptidothérapie utilisant le peptide signal de l'alpaga devrait être promise à un bel avenir dans le cadre du traitement des pneumonies bactériennes bovines. Nos expériences préliminaires montrent néanmoins qu'un peptide signal en solution est tellement hydrophobe qu'il se colle directement aux tapis cellulaires. On peut donc anticiper qu'injecter un tel peptide par voie intraveineuse résulterait en un « tapissage » de l'endothélium vasculaire qui ne laisserait qu'une infime proportion de peptides arriver dans le liquide baignant les alvéoles pulmonaires, là où la LKT est concentrée. Cette perspective ne nous paraît donc pas réaliste sur le terrain.

Différents anticorps ciblant le LFA-1 ou son ligand, l'ICAM-1, ont été élaborés pour prévenir ou diminuer l'impact du diabète insulino-dépendant, de l'arthrite rhumatoïde, de l'asthme, du psoriasis ou du rejet d'organe (Zecchinon, 2007). Dans la même veine, il serait intéressant d'examiner la faisabilité, l'efficacité et la tolérabilité d'une allo vaccination dirigée contre le module EGF-3 bovin.

Une sélection génétique dirigée qui prioriserait la détention d'un module EGF-3 résistant à la LKT pourrait être très efficace. Sa faisabilité dépend évidemment de l'existence d'une variation allélique intéressante à cet endroit, ce qui suppose la mise en œuvre préalable d'un inventaire de la variation génétique spontanée du module EGF-3 dans l'espèce bovine.

10.2. A long terme : transgénèse

Si l'étude du polymorphisme allélique du domaine EGF-3 du CD18 ne donne aucun résultat utilisable en pratique, c'est-à-dire si la conservation de cette séquence en acides aminés est élevée, nous pourrions envisager de modifier le génome par ingénierie génétique. L'intégration ciblée du transgène se ferait par recombinaison homologue. Ce type d'événement est rare, il se déroule en moyenne une fois pour dix mille cellules, sauf s'il est stimulé par une cassure des deux brins d'ADN (Vasquez *et al.*, 2001; Durai *et al.*, 2005; Kandavelou *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2010). Cette coupure peut être réalisée de deux manières, en utilisant soit les méganucléases soit les nucléases à doigt de zinc (*zinc-finger nucleases*, ZFN).

Les méganucléases sont des endonucléases qui reconnaissent de longues séquences d'ADN composées de 12 à 45 pb ; elles sont subdivisées en cinq familles dont la mieux caractérisée est constituée des protéines LAGLIDAG (Paques et Duchateau, 2007; Grizot *et al.*, 2010). Parmi celles-ci, on retrouve les deux enzymes I-SceI (provenant de *Saccharomyces cerevisiae*) et I-CreI (provenant de *Clamydomonas reinhardtii*) qui sont les plus étudiées de la famille (Kramer *et al.*, 2010). Le principal inconvénient d'utiliser ces nucléases naturelles est que la cible doit contenir un site spécifique de ces enzymes (Kramer *et al.*, 2010). Pour contourner ce problème, des méganucléases ont été modifiées en substituant ou en fusionnant certains domaines de la protéine, ce qui leur permet de

reconnaître d'autres sites de clivage (Epinat *et al.*, 2003). Cependant, cette modification de structure est un processus compliqué (Kramer *et al.*, 2010).

D'autres enzymes peuvent être utilisées pour réaliser le clivage double brin de l'ADN : les nucléases à doigt de zinc. Elles sont composées de trois ou quatre domaines en doigt de zinc reliés au domaine modifié de l'endonuclease *FokI* (provenant de *Flavobacterium okeanoikoites*) (Cathomen et Joung, 2008) (figure 33). Chaque doigt de zinc est constitué d'approximativement 30 résidus qui se replient en structure $\beta\beta\alpha$, est stabilisé par un ion de zinc et reconnaît un codon particulier (Wolfe *et al.*, 2000). En employant différentes combinaisons d'acides aminés, ces ZFN peuvent être conçues pour se lier à l'ADN à l'emplacement exact où le gène doit être modifié, pour le découper (Cathomen *et al.*, 2008). La dimérisation de deux ZFN est nécessaire pour stimuler l'activité de clivage du domaine *FokI* et est espacée de cinq à six pb (Cathomen et Joung, 2008).

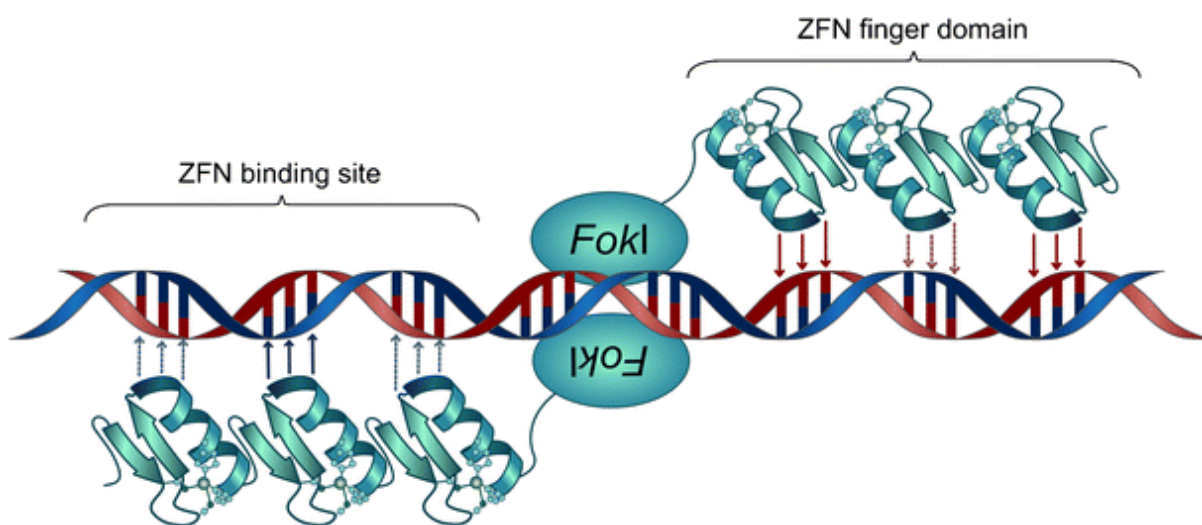


Figure 33 : Reconnaissance et clivage de l'ADN par les nucléases à doigt de zinc (ZFN) (Kramer *et al.*, 2010). Les formes actives des ZFN sont composées d'une structure homodimérique : un domaine à doigt de zinc consiste en 3 protéines à doigt de zinc associé à un domaine de clivage *FokI* qui se lie à l'ADN à une combinaison de 5-6 nucléotides. Chaque doigt de zinc est composé de 30 acides aminés se repliant en une structure $\beta\beta\alpha$, est stabilisé par un ion Zn et reconnaît un codon.

Cette dernière technologie pourrait être utilisée pour corriger le génome d'une lignée lymphoblastique bovine (BL3) sensible à la LKT car elle exprime le LFA-1 endogène. Ainsi, la cotransfection (i) d'un plasmide encodant l'EGF-3 d'alpaga et (ii) d'un vecteur d'expression ou d'un ARNm codant pour différentes ZFN à tester est nécessaire. Cette technique a été mise en œuvre afin de rendre une lignée cellulaire ovarienne d'hamster de Chine (CHO, *Chinese hamster ovary*) *knock-out* pour différents gènes (Santiago *et al.*, 2008; Cost *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010). La résistance des BL3 à la LKT sera vérifiée par cytométrie en flux.

En cas de résultat positif, on pourrait réaliser cette substitution génomique dans des cellules souches hématopoïétiques bovines. En effet, des cellules souches hématopoïétiques humaines ont été modifiées par la technologie aux ZFN afin de les rendre résistantes au VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine-1) par délétion de 32 pb du gène du CCR5 (*chemokine receptor 5*), corécepteur de ce virus (Holt *et al.*, 2010). Après vérification de leur résistance à la LKT, ces cellules

souches hématopoïétiques bovines seront injectées à des veaux qui auront été préalablement déplétés des leurs par chimiothérapie. Les altérations pulmonaires et hématologiques de ces animaux seront examinées après injection de LKT ou inhalation de *M. haemolytica*, ce qui permettra de valider la transgénèse *in vivo*.

Deux méthodes utilisant la technique de recombinaison homologue grâce aux ZFN s'offrent à nous pour générer des veaux transgéniques : l'utilisation de cellules souches embryonnaires et le clonage par transfert nucléaire.

La production d'animaux transgéniques par l'intermédiaire de cellules souches embryonnaires (CSE) génère des embryons composés de deux lignées cellulaires distinctes dont une possède le gène corrigé. Les CSE sont des cellules pluripotentes dérivées de la masse interne cellulaire du blastocyste capables de produire tous les tissus. Cette méthode de transfert de gène implique l'injection de cellules souches embryonnaires dans le blastocyste (Melo *et al.*, 2007). Cette technologie alliant CSE et ZFN a été utilisée pour générer des souris transgéniques (Connelly *et al.*, 2010). Cette technique possède l'avantage de permettre l'analyse et la sélection des CSE modifiées avant la production d'embryons transgéniques. De plus, le site d'intégration du transgène dans le génome peut être contrôlé (Melo *et al.*, 2007). Cependant, un des inconvénients de cette méthode est qu'elle génère des animaux chimériques. Ceux-ci doivent être croisés pour donner naissance à des descendants dont tous les tissus possèdent le transgène, ce qui peut durer longtemps dans le cas des bovidés. D'autre part, l'isolation et la création de CSE provenant de certaines espèces comme le porc ou la bête bovine sont des techniques seulement naissantes (Melo *et al.*, 2007).

Le premier transfert nucléaire utilisant des cellules somatiques provenant de glandes mammaires réalisé avec succès a conduit à la naissance de la célèbre brebis Dolly (Wilmut *et al.*, 1997). Les chercheurs concernés ont énucléé des ovocytes et remplacé leur noyau par celui d'un donneur, pouvant provenir de n'importe quelle cellule. En 1998, cinq clones bovins transgéniques résistants à l'antibiotique G418 ont été produits grâce à cette technique (Cibelli *et al.*, 1998). Cette technique possède plusieurs avantages, à savoir (i) un meilleur rendement de transgénèse chez les ruminants, (ii) le fait que les animaux ne sont pas mosaïques pour le transgène et (iii) la possibilité d'étudier l'intégrité du transgène dans les cellules utilisées pour le transfert de gène (Soler *et al.*, 2006; Zecchinon, 2007). L'utilisation de fibroblastes comme donneur nucléaire a permis d'augmenter la production de clones (Kasinathan *et al.*, 2001) et peut être combiné avec la technologie ZFN pour donner naissance à des animaux transgéniques, comme le porc (Hauschild *et al.*, 2011).

QUATRIÈME PARTIE :
BIBLIOGRAPHIE

- Al-Ghamdi G.M., Ames T.R., Baker J.C., Walker R., Chase C.C., Frank G.H., Maheswaran S.K. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J Vet Diagn Invest*, 2000, 12, 576-578.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990, 215, 403-410.
- Ambagala T.C., Ambagala A.P., Srikumaran S. The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to beta(2) integrins on bovine leukocytes. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 179, 161-167.
- Angelos J.A., Hess J.F., George L.W. An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Vet Microbiol*, 2003, 92, 363-377.
- Angen O., Muters R., Caugant D.A., Olsen J.E., Bisgaard M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49 Pt 1, 67-86.
- Angulo F.J., Nargund V.N., Chiller T.C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2004, 51, 374-379.
- Bailly P., Tontti E., Hermand P., Cartron J.P., Gahmberg C.G. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immunol*, 1995, 25, 3316-3320.
- Baluyut C.S., Simonson R.R., Bemrick W.J., Maheswaran S.K. Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: identification and partial characterization of a cytotoxin. *Am J Vet Res*, 1981, 42, 1920-1926.
- Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 2004, 340, 783-795.
- Berggren K.A., Baluyut C.S., Simonson R.R., Bemrick W.J., Maheswaran S.K. Cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on bovine neutrophils. *Am J Vet Res*, 1981, 42, 1383-1388.
- Berman A.E., Kozlova N.I., Morozovich G.E. Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc)*, 2003, 68, 1284-1299.
- Berthoud H., Frey J., Kuhnert P. Characterization of Aqx and its operon: the hemolytic RTX determinant of *Actinobacillus equuli*. *Vet Microbiol*, 2002, 87, 159-174.
- Bingham D.P., Moore R., Richards A.B. Comparison of DNA:DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella haemolytica* and related species. *Am J Vet Res*, 1990, 51, 1161-1166.
- Blackall P.J., Bojesen A.M., Christensen H., Bisgaard M. Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57, 666-674.
- Breider M.A., Walker R.D., Hopkins F.M., Schultz T.W., Bowersock T.L. Pulmonary lesions induced by *Pasteurella haemolytica* in neutrophil sufficient and neutrophil deficient calves. *Can J Vet Res*, 1988, 52, 205-209.
- Bureau F., Detilleux J., Dorts T., Uystepuyst C., Coghe J., Leroy P.L., Lekeux P. Spirometric performance in Belgian Blue calves: I. Effects on economic losses due to the bovine respiratory disease complex. *J Anim Sci*, 2001, 79, 1301-1304.
- Burrows L.L., Lo R.Y. Molecular characterization of an RTX toxin determinant from *Actinobacillus suis*. *Infect Immun*, 1992, 60, 2166-2173.
- Caprioli A., Busani L., Martel J.L., Helmuth R. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *Int J Antimicrob Agents*, 2000, 14, 295-301.
- Cathomen T., Joung J.K. Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol Ther*, 2008, 16, 1200-1207.
- Cathomen T., Segal D.J., Brondani V., Muller-Lerch F. Generation and functional analysis of zinc finger nucleases. *Methods Mol Biol*, 2008, 434, 277-290.
- Chang Y.F., Ma D.P., Young R., Struck D.K. Cloning, sequencing and expression of a *Pasteurella haemolytica* A1 gene encoding a PurK-like protein. *DNA Seq*, 1993, 3, 357-367.
- Chang Y.F., Young R., Struck D.K. Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *DNA*, 1989, 8, 635-647.
- Chen C.Y., Wu K.M., Chang Y.C., Chang C.H., Tsai H.C., Liao T.L., Liu Y.M., Chen H.J., Shen A.B., Li J.C., Su T.L., Shao C.P., Lee C.T., Hor L.I., Tsai S.F. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res*, 2003, 13, 2577-2587.
- Choo K.H., Ranganathan S. Flanking signal and mature peptide residues influence signal peptide cleavage. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9 Suppl 12, S15.
- Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A., Robl J.M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280, 1256-1258.

- Clarke J.M., Morton R.J., Clarke C.R., Fulton R.W., Saliki J.T. Development of an ex vivo model to study adherence of *Mannheimia haemolytica* serovar 1 to mucosal tissues of the respiratory tract of cattle. *Am J Vet Res*, 2001, 62, 805-811.
- Connelly J.P., Barker J.C., Pruett-Miller S., Porteus M.H. Gene correction by homologous recombination with zinc finger nucleases in primary cells from a mouse model of a generic recessive genetic disease. *Mol Ther*, 2010, 18, 1103-1110.
- Coote J.G. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 1992, 8, 137-161.
- Cost G.J., Freyvert Y., Vafiadis A., Santiago Y., Miller J.C., Rebar E., Collingwood T.N., Snowden A., Gregory P.D. BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105, 330-340.
- Cox E., Mast J., MacHugh N., Schwenger B., Goddeeris B.M. Expression of beta 2 integrins on blood leukocytes of cows with or without bovine leukocyte adhesion deficiency. *Vet Immunol Immunopathol*, 1997, 58, 249-263.
- Cudd L.A., Ownby C.L., Clarke C.R., Sun Y., Clinkenbeard K.D. Effects of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on apoptosis and oncosis of bovine neutrophils. *Am J Vet Res*, 2001, 62, 136-141.
- Dassanayake R.P., Shanthalingam S., Davis W.C., Srikumaran S. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of ovine (*Ovis aries*) leukocytes is mediated by CD18, the beta subunit of beta(2)-integrins. *Microb Pathog*, 2007, 42, 167-173.
- Davies R.L., Baillie S. Cytotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene lktA. *Vet Microbiol*, 2003, 92, 263-279.
- Davies R.L., Donachie W. Intra-specific diversity and host specificity within *Pasteurella haemolytica* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. *Microbiology*, 1996, 142 (Pt 7), 1895-1907.
- Davies R.L., Lee I. Sequence diversity and molecular evolution of the heat-modifiable outer membrane protein gene (ompA) of *Mannheimia*(*Pasteurella*) *haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *J Bacteriol*, 2004, 186, 5741-5752.
- Deshpande M.S., Ambagala T.C., Ambagala A.P., Kehrli M.E., Jr., Srikumaran S. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis. *Infect Immun*, 2002, 70, 5058-5064.
- Dileepan T., Kachlany S.C., Balashova N.V., Patel J., Maheswaran S.K. Human CD18 is the functional receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun*, 2007a, 75, 4851-4856.
- Dileepan T., Kannan M.S., Walcheck B., Maheswaran S.K. Integrin-EGF-3 domain of bovine CD18 is critical for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin species-specific susceptibility. *FEMS Microbiol Lett*, 2007b, 274, 67-72.
- Dileepan T., Kannan M.S., Walcheck B., Thumbikat P., Maheswaran S.K. Mapping of the binding site for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin within bovine CD18. *Infect Immun*, 2005a, 73, 5233-5237.
- Dileepan T., Thumbikat P., Walcheck B., Kannan M.S., Maheswaran S.K. Recombinant expression of bovine LFA-1 and characterization of its role as a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Microb Pathog*, 2005b, 38, 249-257.
- Donachie W. Bacteriology of bovine respiratory disease. *U.K. VET*, 1998, 3, 44-46.
- Dungworth D.: The respiratory system. In: Jubb, K., Kennedy, P. and Palmer, N. (Editors), *Pathology of domestic animals*. Academic Press, San Diego (1992), pp. 589-663.
- Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M.H., Chandrasegaran S. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33, 5978-5990.
- Edwards A.J. Respiratory diseases of feedlot cattle in the central USA. *Bov Prac*, 1996, 5-7.
- el Rassi Z., Clinkenbeard P.A., Clinkenbeard K.D. High-performance liquid chromatography of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin using anion-exchange perfusion columns. *J Chromatogr A*, 1998, 808, 167-176.
- Epinat J.C., Arnould S., Chames P., Rochaix P., Desfontaines D., Puzin C., Patin A., Zanghellini A., Paques F., Lacroix E. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31, 2952-2962.
- Fedorova N.D., Highlander S.K. Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. *Infect Immun*, 1997, 65, 2593-2598.
- Ferber D. Antibiotic resistance. Superbugs on the hoof? *Science*, 2000, 288, 792-794.
- Ferech M., Coenen S., Malhotra-Kumar S., Dvorakova K., Hendrickx E., Suetens C., Goossens H. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58, 401-407.
- Fett T., Zecchinon L., Baise E., Desmecht D. The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA: molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene*, 2004, 325, 97-101.

- Fett T., Zecchinon L., Baise E., Desmecht D.** Cloning and characterisation of the primary structure of the sheep lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit. *Mol Immunol*, 2005a, 42, 1503-1508.
- Fett T., Zecchinon L., Vanden Bergh P., Desmecht D.** *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of caprine (*Capra hircus*) leukocytes is mediated by the CD18 subunit of beta(2)-integrins. *Microb Pathog*, 2008, 45, 337-342.
- Fett T., Zecchinon L.L., Baise E.A., Desmecht D.J.** Molecular characterisation of the caprine (*Capra hircus*) lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit-encoding cDNA. *BMC Vet Res*, 2005b, 1, 4.
- Frank G.H., Smith P.C.** Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am J Vet Res*, 1983, 44, 981-985.
- Frey J., Meier R., Gygi D., Nicolet J.** Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun*, 1991, 59, 3026-3032.
- Gahmberg C.G., Tolvanen M., Kotovuori P.** Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem*, 1997, 245, 215-232.
- Gardner B.A., Northcutt S.L., Dolezal H.G., Gill D.R., Ray F.K., Morgan J.B., Shearhart C.W.** Factors influencing profitability of feedlot steers. *Animal Science Research Report, Oklahoma Ag Experiment Station, Oklahoma State University, Stillwater, OK*, 1996, 164-172.
- Glaser P., Danchin A., Ladant D., Barzu O., Ullmann A.** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med*, 1988, 13 Suppl, 239-252.
- Goebel W., Hedgpeth J.** Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1982, 151, 1290-1298.
- Goossens H., Ferech M., Vander Stichele R., Elseviers M.** Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, 2005, 365, 579-587.
- Gopinath R.S., Ambagala T.C., Deshpande M.S., Donis R.O., Srikumaran S.** *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* Leukotoxin Binding Domain Lies within Amino Acids 1 to 291 of Bovine CD18. *Infect Immun*, 2005, 73, 6179-6182.
- Griffin D.** Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet Clin N Am Food Anim Pract*, 1997, 367-377.
- Griffin D., L. B., L. P.** Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Calf News Magazine, Ltd, Colorado Springs, CO*, 2000, 138 (8), 19-21.
- Griffin D., Perino L., Wittum T.** Feedlot respiratory disease: cost, value of preventives and intervention. *Proc Am Assoc Bov Pract*, 1995, 157-160.
- Grizot S., Epinat J.C., Thomas S., Duclert A., Rolland S., Paques F., Duchateau P.** Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38, 2006-2018.
- Hauschild J., Petersen B., Santiago Y., Queisser A.L., Carnwath J.W., Lucas-Hahn A., Zhang L., Meng X., Gregory P.D., Schwinzer R., Cost G.J., Niemann H.** Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108, 12013-12017.
- Henikoff S., Henikoff J.G.** Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89, 10915-10919.
- Henikoff S., Henikoff J.G.** Performance evaluation of amino acid substitution matrices. *Proteins*, 1993, 17, 49-61.
- Highlander S.K.** Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. *Front Biosci*, 2001, 6, 1128-1150.
- Highlander S.K., Engler M.J., Weinstock G.M.** Secretion and expression of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *J Bacteriol*, 1990, 172, 2343-2350.
- Highlander S.K., Fedorova N.D., Dusek D.M., Panciera R., Alvarez L.E., Rinehart C.** Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect Immun*, 2000, 68, 3916-3922.
- Highlander S.K., Wickersham E.A., Garza O., Weinstock G.M.** Expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin is inhibited by a locus that encodes an ATP-binding cassette homolog. *Infect Immun*, 1993, 61, 3942-3951.
- Holt N., Wang J., Kim K., Friedman G., Wang X., Taupin V., Crooks G.M., Kohn D.B., Gregory P.D., Holmes M.C., Cannon P.M.** Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol*, 2010, 28, 839-847.
- Hormansdorfer S., Bauer J.** [Resistance pattern of bovine *Pasteurella*]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 1996, 109, 168-171.
- Huang C., Springer T.A.** Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94, 3162-3167.
- Hynes R.O.** Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 1987, 48, 549-554.
- Hynes R.O.** Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992, 69, 11-25.
- Hynes R.O.** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, 110, 673-687.

- Iovane G., Galdiero M., Vitiello M., De Martino L. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins on bovine neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1998, 20, 29-36.
- Jansen R., Briaire J., Kamp E.M., Gielkens A.L., Smits M.A. Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin III (ApxIII) gene. *Infect Immun*, 1993, 61, 947-954.
- Jensen R., Pierson R.E., Braddy P.M., Saari D.A., Lauerman L.H., England J.J., Keyvanfar H., Collier J.R., Horton D.P., McChesney A.E., Benítez A., Christie R.M. Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 1976, 169, 500-506.
- Jeyaseelan S., Hsuan S.L., Kannan M.S., Walcheck B., Wang J.F., Kehrli M.E., Lally E.T., Sieck G.C., Maheswaran S.K. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. *Infect Immun*, 2000, 68, 72-79.
- Jeyaseelan S., Kannan M.S., Briggs R.E., Thumbikat P., Maheswaran S.K. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects. *Infect Immun*, 2001, 69, 6131-6139.
- Jeyaseelan S., Sreevatsan S., Maheswaran S.K. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim Health Res Rev*, 2002, 3, 69-82.
- Jones F.A. A study of *Bacillus bovisepitiscus*. *J Exp Med*, 1921, 34, 561-577.
- Kaehler K.L., Markham R.J., Muscoplat C.C., Johnson D.W. Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. *Infect Immun*, 1980, 30, 615-616.
- Kamp E.M., Stockhofe-Zurwieden N., van Leengoed L.A., Smits M.A. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect Immun*, 1997, 65, 4350-4354.
- Kandavelou K., Ramalingam S., London V., Mani M., Wu J., Alexeev V., Civin C.I., Chandrasegaran S. Targeted manipulation of mammalian genomes using designed zinc finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388, 56-61.
- Kasinathan P., Knott J.G., Wang Z., Jerry D.J., Robl J.M. Production of calves from G1 fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 2001, 19, 1176-1178.
- Kehl-Fie T.E., St Geme J.W., 3rd Identification and characterization of an RTX toxin in the emerging pathogen *Kingella kingae*. *J Bacteriol*, 2007, 189, 430-436.
- Kehrenberg C., Schulze-Tanzi G., Martel J.L., Dancla E.C., Schwarz S. Antimicrobial resistance in *pasteurella* and *mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet Res*, 2001, 32, 323-339.
- Kelly A.P., Janzen, E.D. A review of morbidity and mortality rates and disease occurrence in North American feedlot cattle. *Can Vet J*, 1986, 496-500.
- Kieba I.R., Fong K.P., Tang H.Y., Hoffman K.E., Speicher D.W., Klickstein L.B., Lally E.T. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin requires beta-sheets 1 and 2 of the human CD11a beta-propeller for cytotoxicity. *Cell Microbiol*, 2007, 9, 2689-2699.
- Kishimoto T.K., O'Connor K., Lee A., Roberts T.M., Springer T.A. Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell*, 1987, 48, 681-690.
- Kisiela D.I., Czuprynski C.J. Identification of *Mannheimia haemolytica* adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. *Infect Immun*, 2009, 77, 446-455.
- Kitt T. Über eine experimentelle, der Rinderseuche ähnliche Infektionskrankheit. *Sitzungsber Ges Morphol Physiol Muenchen*, 1885, 140-168.
- Kolodrubetz D., Phillips L., Jacobs C., Burgum A., Kraig E. Anaerobic regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin transcription is ArcA/FnrA-independent and requires a novel promoter element. *Res Microbiol*, 2003, 154, 645-653.
- Koronakis V., Cross M., Senior B., Koronakis E., Hughes C. The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1987, 169, 1509-1515.
- Kramer O., Klausling S., Noll T. Methods in mammalian cell line engineering: from random mutagenesis to sequence-specific approaches. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88, 425-436.
- Krivan H.C., Roberts D.D., Ginsburg V. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85, 6157-6161.
- Kuhnert P., Heyberger-Meyer B., Nicolet J., Frey J. Characterization of PaxA and its operon: a cohemolytic RTX toxin determinant from pathogenic *Pasteurella aerogenes*. *Infect Immun*, 2000, 68, 6-12.
- Kuhnert P., Schlatter Y., Frey J. Characterization of the type I secretion system of the RTX toxin ApxII in "*Actinobacillus porcitonisillarum*". *Vet Microbiol*, 2005, 107, 225-232.
- Lafleur R.L., Malazdrewich C., Jeyaseelan S., Bleifield E., Abrahamsen M.S., Maheswaran S.K. Lipopolysaccharide enhances cytotoxicity and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella* (*Mannheimia*) *haemolytica* leukotoxin. *Microb Pathog*, 2001, 30, 347-357.

- Lally E.T., Golub E.E., Kieba I.R., Taichman N.S., Rosenbloom J., Rosenbloom J.C., Gibson C.W., Demuth D.R. Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. Delineation of unique features and comparison to homologous toxins. *J Biol Chem*, 1989, 264, 15451-15456.
- Lawrence P.K., Dassanayake R.P. Ovis aries CR4 is involved in Mannheimia haemolytica leukotoxin-induced cytotoxicity. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010, 135, 266-274.
- Lawrence P.K., Nelson W.R., Liu W., Knowles D.P., Foreyt W.J., Srikumaran S. beta(2) integrin Mac-1 is a receptor for Mannheimia haemolytica leukotoxin on bovine and ovine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 122, 285-294.
- Lee C.W., Shewen P.E. Evidence of bovine immunoglobulin G1 (IgG1) protease activity in partially purified culture supernate of Pasteurella haemolytica A1. *Can J Vet Res*, 1996, 60, 127-132.
- Lee J.K., Schook L.B., Rutherford M.S. Molecular cloning and characterization of the porcine CD18 leukocyte adhesion molecule. *Xenotransplantation*, 1996, 3, 222-230.
- Lekeux P., Amory H., Desmecht D., Gustin P., Linden A., Rollin F. Oxygen transport chain in double-muscled blue Belgian cattle. *Br Vet J*, 1994, 150, 463-471.
- Li J., Clinkenbeard K.D., Ritchey J.W. Bovine CD18 identified as a species specific receptor for Pasteurella haemolytica leukotoxin. *Vet Microbiol*, 1999, 67, 91-97.
- Lin W., Fullner K.J., Clayton R., Sexton J.A., Rogers M.B., Calia K.E., Calderwood S.B., Fraser C., Mekalanos J.J. Identification of a vibrio cholerae RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96, 1071-1076.
- Linhartova I., Bumba L., Masin J., Basler M., Osicka R., Kamanova J., Prochazkova K., Adkins I., Hejnova-Holubova J., Sadilkova L., Morova J., Sebo P. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34, 1076-1112.
- Liu P.Q., Chan E.M., Cost G.J., Zhang L., Wang J., Miller J.C., Guschin D.Y., Reik A., Holmes M.C., Mott J.E., Collingwood T.N., Gregory P.D. Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106, 97-105.
- Liu W., Brayton K.A., Davis W.C., Mansfield K., Lagerquist J., Foreyt W., Srikumaran S. Mannheimia (pasteurella) haemolytica leukotoxin utilizes CD18 as its receptor on bighorn sheep leukocytes. *J Wildl Dis*, 2007, 43, 75-81.
- Lo R.Y. Molecular characterization of cytotoxins produced by Haemophilus, Actinobacillus, Pasteurella. *Can J Vet Res*, 1990, 54 Suppl, S33-35.
- Lo R.Y., Strathdee C.A., Shewen P.E. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of Pasteurella haemolytica A1. *Infect Immun*, 1987, 55, 1987-1996.
- Lopez A.: Respiratory system, thoracic cavity and pleura. In: McGavin, M., Carlton, W. and Zachary, J. (Editors), *Thomson's Special Veterinary Pathology*. Mosby, Saint-Louis Missouri (2001), pp. 125-196.
- Lu C., Oxvig C., Springer T.A. The structure of the beta-propeller domain and C-terminal region of the integrin alphaM subunit. Dependence on beta subunit association and prediction of domains. *J Biol Chem*, 1998, 273, 15138-15147.
- Malazdrewich C., Ames T.R., Abrahamsen M.S., Maheswaran S.K. Pulmonary expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 in the acute phase of bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet Pathol*, 2001, 38, 297-310.
- Marciel A.M., Highlander S.K. Use of operon fusions in Mannheimia haemolytica to identify environmental and cis-acting regulators of leukotoxin transcription. *Infection and Immunity*, 2001, 69, 6231-6239.
- Martel J.L., Chaslus-Dancla E., Coudert M., Poumarat F., Lafont J.P. Survey of antimicrobial resistance in bacterial isolates from diseased cattle in France. *Microb Drug Resist*, 1995, 1, 273-283.
- Martin S.W., Meek A.H., Davis J.A., Curtis R.A. Factors associated with morbidity and mortality in feedlot cattle calves. The Bruce County Beef Project, year two. *Can J Comp Med*, 1981, 103-112.
- McClenahan D., Hellenbrand K., Atapattu D., Aulik N., Carlton D., Kapur A., Czuprynski C. Effects of lipopolysaccharide and Mannheimia haemolytica leukotoxin on bovine lung microvascular endothelial cells and alveolar epithelial cells. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15, 338-347.
- Melo E.O., Canavessi A.M., Franco M.M., Rumpf R. Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet*, 2007, 48, 47-61.
- Mena-Rojas E., Vazquez Cruz C., Vaca Pacheco S., Garcia Gonzalez O., Perez-Marquez V.M., Perez-Mendez A., Ibarra-Caballero J., De La Garza M., Zenteno E., Negrete-Abascal E. Antigenic secreted proteins from Haemophilus paragallinarum. A 110-kDa putative RTX protein. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 232, 83-87.
- Miyazaki K., Takenouchi M. Creating random mutagenesis libraries using megaprimer PCR of whole plasmid. *Biotechniques*, 2002, 33, 1033-1034, 1036-1038.
- Molbak K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2004, 51, 364-369.
- Morck D.W., Watts T.C., Acres S.D., Costerton J.W. Electron microscopic examination of cells of Pasteurella haemolytica-A1 in experimentally infected cattle. *Can J Vet Res*, 1988, 52, 343-348.

- Morton R.J., Simons K.R., Confer A.W.** Major outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serovars 1-15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars. *Vet Microbiol*, 1996, 51, 319-330.
- Mugli-Cockett N.E., Cundiff L.V., Gregory K.E.** Genetic analysis of bovine respiratory disease in beef calves during the first year of life. *J Anim Sci*, 1992, 70, 2013-2019.
- Narayanan S.K., Nagaraja T.G., Chengappa M.M., Stewart G.C.** Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol*, 2002, 84, 337-356.
- NCBI taxonomy browser:** *Mannheimia haemolytica* serotype 1 (sans date).
- Newson I.E., Cross, F.** Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep. *J Am Vet Med Assoc*, 1932, 80, 711-719.
- Nicholas B., Karl B., Nicholas P., Hugh B.J.:** GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments (1997).
- O'Brien J.K., Duffus W.P.** *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: relative susceptibility of bovine leucocytes. *Vet Microbiol*, 1987, 13, 321-334.
- Ogunnariwo J.A., Woo T.K., Lo R.Y., Gonzalez G.C., Schryvers A.B.** Characterization of the *Pasteurella haemolytica* transferrin receptor genes and the recombinant receptor proteins. *Microb Pathog*, 1997, 23, 273-284.
- Pandher K., Murphy G.L., Confer A.W.** Identification of immunogenic, surface-exposed outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Vet Microbiol*, 1999, 65, 215-226.
- Paques F., Duchateau P.** Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2007, 7, 49-66.
- Perino L.J.** Overview of the bovine respiratory disease complex. *Comp Cont Educ Prac Vet*, 1992, 53-56.
- Purdy C.W., Raleigh R.H., Collins J.K., Watts J.L., Straus D.C.** Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves. *Curr Microbiol*, 1997, 34, 244-249.
- Quirie M., Donachie W., Gilmour N.J.** Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet Rec*, 1986, 119, 93-94.
- Revillard J.-P.**, Immunologie, 3ème édition ed. De Boeck & Larcier, Paris, Bruxelles (1998).
- Roth J.A.:** Immunosuppression and immunomodulation in bovine respiratory disease. In: R.W., L. (Editor), *Bovine respiratory Disease, A symposium*. Texas A&M University Press, College Station, Texas A&M University (1986), pp. 143-192.
- Rozen S., Skaletsky H.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 2000, 132, 365-386.
- Rutz C., Renner A., Alken M., Schulz K., Beyermann M., Wiesner B., Rosenthal W., Schulein R.** The corticotropin-releasing factor receptor type 2a contains an N-terminal pseudo signal peptide. *J Biol Chem*, 2006, 281, 24910-24921.
- Santiago Y., Chan E., Liu P.Q., Orlando S., Zhang L., Urnov F.D., Holmes M.C., Guschin D., Waite A., Miller J.C., Rebar E.J., Gregory P.D., Klug A., Collingwood T.N.** Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 5809-5814.
- Schaller A., Kuhn R., Kuhnert P., Nicolet J., Anderson T.J., MacInnes J.I., Segers R.P., Frey J.** Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 1999, 145 (Pt 8), 2105-2116.
- Schaller A., Kuhnert P., de la Puente-Redondo V.A., Nicolet J., Frey J.** Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. *Vet Microbiol*, 2000, 74, 365-376.
- Schmidt H., Beutin L., Karch H.** Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun*, 1995, 63, 1055-1061.
- Shanthalingam S., Srikumaran S.** Intact signal peptide of CD18, the beta-subunit of beta2-integrins, renders ruminants susceptible to *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106, 15448-15453.
- Shewen P.E., Wilkie B.N.** Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect Immun*, 1982, 35, 91-94.
- Shuster D.E., Bosworth B.T., Kehrli M.E., Jr.** Sequence of the bovine CD18-encoding cDNA: comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene*, 1992a, 114, 267-271.
- Shuster D.E., Kehrli M.E., Jr., Ackermann M.R., Gilbert R.O.** Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992b, 89, 9225-9229.
- Silflow R.M., Foreyt W.J.** Susceptibility of phagocytes from elk, deer, bighorn sheep, and domestic sheep to *Pasteurella haemolytica* cytotoxins. *J Wildl Dis*, 1994, 30, 529-535.
- Slocombe R.F., Malark J., Ingersoll R., Derksen F.J., Robinson N.E.** Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am J Vet Res*, 1985, 46, 2253-2258.

- Smith G.R.** The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions of sheep. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1961, 81, 431-440.
- Sneath P.H., Stevens M.** *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1990, 40, 148-153.
- Soler E., Thepot D., Rival-Gervier S., Jolivet G., Houdebine L.M.** Preparation of recombinant proteins in milk to improve human and animal health. *Reprod Nutr Dev*, 2006, 46, 579-588.
- Speer N.C., Young C., Roeber D.** The importance of preventing bovine respiratory disease: a beef industry review. *Bov Pract*, 2001, 35, 189-196.
- Stevens P.K., Czuprynski C.J.** *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis in vitro. *Infect Immun*, 1996, 64, 2687-2694.
- Strathdee C.A., Lo R.Y.** Regulation of expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *J Bacteriol*, 1989, 171, 5955-5962.
- Sun Y., Clinkenbeard K.D., Cudd L.A., Clarke C.R., Clinkenbeard P.A.** Correlation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin binding with susceptibility to intoxication of lymphoid cells from various species. *Infect Immun*, 1999, 67, 6264-6269.
- Sun Y., Clinkenbeard K.D., Ownby C.L., Cudd L., Clarke C.R., Highlander S.K.** Ultrastructural characterization of apoptosis in bovine lymphocytes exposed to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am J Vet Res*, 2000, 61, 51-56.
- Tatum F.M., Briggs R.E., Sreevatsan S.S., Zehr E.S., Ling Hsuan S., Whiteley L.O., Ames T.R., Maheswaran S.K.** Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence. *Microb Pathog*, 1998, 24, 37-46.
- Thumbikat P., Briggs R.E., Kannan M.S., Maheswaran S.K.** Biological effects of two genetically defined leukotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*. *Microb Pathog*, 2003, 34, 217-226.
- Thumbikat P., Dileepan T., Kannan M.S., Maheswaran S.K.** Characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin interaction with bovine alveolar macrophage $\beta 2$ integrins. *Vet Res*, 2005, 36, 771-786.
- Tian L., Yoshihara Y., Mizuno T., Mori K., Gahmberg C.G.** The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J Immunol*, 1997, 158, 928-936.
- Uhlich G.A., McNamara P.J., Iandolo J.J., Mosier D.A.** Cloning and characterization of the gene encoding *Pasteurella haemolytica* FnrP, a regulator of the *Escherichia coli* silent hemolysin sheA. *J Bacteriol*, 1999, 181, 3845-3848.
- Uhlich G.A., McNamara P.J., Iandolo J.J., Mosier D.A.** FnrP interactions with the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin promoter. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 186, 73-77.
- van de Sande-Bruinsma N., Grundmann H., Verloo D., Tiemersma E., Monen J., Goossens H., Ferech M.** Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14, 1722-1730.
- Vasquez K.M., Marburger K., Intody Z., Wilson J.H.** Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98, 8403-8410.
- Vogel J.G., Parrott C.** Mortality survey in feedyards: the incidence of death from digestive, respiratory and other causes in feedyards on the Great plains. *Comp Cont Educ Prac Vet*, 1994, 227-234.
- von Heijne G.** Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem*, 1983, 133, 17-21.
- Walker R.D., Hopkins F.M., Schultz T.W., McCracken M.D., Moore R.N.** Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res*, 1985, 46, 2429-2433.
- Wang J.F., Kieba I.R., Korostoff J., Guo T.L., Yamaguchi N., Rozmiarek H., Billings P.C., Shenker B.J., Lally E.T.** Molecular and biochemical mechanisms of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced cell death. *Microb Pathog*, 1998a, 25, 317-331.
- Wang Z., Clarke C., Clinkenbeard K.** *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils. *Infect Immun*, 1998b, 66, 1885-1890.
- Watts J.L., Yancey R.J., Jr., Salmon S.A., Case C.A.** A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. *J Clin Microbiol*, 1994, 32, 725-731.
- Waurzyniak B.J., Clinkenbeard K.D., Confer A.W., Srikumaran S.** Enhancement of *Pasteurella haemolytica* leukotoxic activity by bovine serum albumin. *Am J Vet Res*, 1994, 55, 1267-1274.
- Weiss D.J., Bauer M.C., Whiteley L.O., Maheswaran S.K., Ames T.R.** Changes in blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. *Am J Vet Res*, 1991, 52, 337-344.
- Weitzman J.B., Wells C.E., Wright A.H., Clark P.A., Law S.K.** The gene organisation of the human $\beta 2$ integrin subunit (CD18). *FEBS Lett*, 1991, 294, 97-103.
- Welch R.A.** Identification of two different hemolysin determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. *Infect Immun*, 1987, 55, 2183-2190.

- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385, 810-813.
- Wilson R.W., O'Brien W.E., Beaudet A.L.** Nucleotide sequence of the cDNA from the mouse leukocyte adhesion protein CD18. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17, 5397.
- Wolfe S.A., Nekludova L., Pabo C.O.** DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29, 183-212.
- Yates W.D.** A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med*, 1982, 46, 225-263.
- Yin Y., Zhang F., Ling V., Arrowsmith C.H.** Structural analysis and comparison of the C-terminal transport signal domains of hemolysin A and leukotoxin A. *FEBS Lett*, 1995, 366, 1-5.
- Yoo H.S., Rajagopal B.S., Maheswaran S.K., Ames T.R.** Purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages. *Microb Pathog*, 1995, 18, 237-252.
- Younan M., Fodor L.** Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res. Vet. Sci.*, 1995, 58, 98.
- Zecchinon L.** Dissection moléculaire de l'interaction leucotoxine- β 2-intégrine LFA-1 (CD11a/CD18), responsable de la spécificité d'espèce de *Mannheimia haemolytica* envers les ruminants (PhD Thesis). Université de Liège: Liège, 2007, 224 p.
- Zecchinon L., Fett T., Baise E., Desmecht D.** Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*. *Mol Membr Biol*, 2004a, 21, 289-295.
- Zecchinon L., Fett T., Baise E., Desmecht D.** Molecular cloning and characterisation of the CD18 partner in ovine (*Ovis aries*) beta2-integrins. *Gene*, 2004b, 334, 47-52.
- Zecchinon L., Fett T., Desmecht D.** How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res*, 2005, 36, 133-156.
- Zecchinon L., Fett T., Vanden Bergh P., Desmecht D.** Anatomy of the lymphocyte function-associated antigen-1. *Clin Applied Immunol Rev*, 2006a, 6, 149-172.
- Zecchinon L., Fett T., Vanden Bergh P., Desmecht D.** Key roles of LFA-1 in leukocyte migration and immune response. *Clin Applied Immunol Rev*, 2006b, 6, 191-200.