

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 threalosi* 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).

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*, *bovine respiratory syncytial virus*), des bactéries (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *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'écornage 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).

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



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

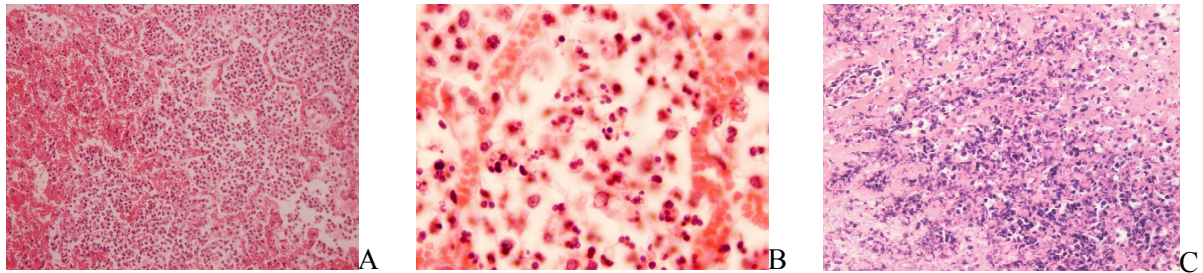


Figure 2 : Lésions histologiques pulmonaires d'une infection à *Mannheimia haemolytica* (hématoxyline-éosine). On constate une infiltration massive dans les alvéoles de leucocytes (A, grossissement 200x), s'avérant être des polymorphonucléaires neutrophiles (B, grossissement 400x) qui vont rapidement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

Sur un plan biologique plus général, il faut constater que *M. haemolytica* n'est pas tenue pour 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. Facteurs de virulence

Plusieurs facteurs de virulence sont décrits pour *M. haemolytica* : 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 immune, 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 (LKT), qui jouent tous deux un rôle capital dans la cytotoxicité (Confer *et al.*, 1990 ; Whiteley *et al.*, 1992 ; Tatum *et al.*, 1998; Jeyaseelan *et al.*, 2002). Si la LKT doit son nom à la spécificité de liaison qu'elle exhibe vis-à-vis des leucocytes de plusieurs espèces de mammifères, il est intéressant de constater qu'elle n'induit la nécrose cellulaire que lorsqu'elle est fixée à ceux des ruminants (Kaehler *et al.*, 1980 ; Shewen et Wilkie, 1982), suggérant que la spécificité d'interaction entre la LKT et les leucocytes des ruminants pourrait être tenue pour responsable de la cytotoxicité spécifique de *M. haemolytica* envers ces derniers.

d'intégrines est ainsi responsable de la fixation des leucocytes à la surface des endothéliums, étape initiale de la diapédèse qui permet leur déplacement vers les lieux de la réaction inflammatoire (Gahmberg, 1997).

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 incubés préalablement avec des anticorps dirigés contre le CD11a ou le CD18 (Ambagala *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1999; Jeyaseelan *et al.*, 2000). A l'aube de ce travail, l'identification précise de la sous-unité liant la LKT restait controversée, même si le CD18 semblait remporter la majorité des suffrages (Ambagala *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999 ; Deshpande *et al.*, 2002).

En conclusion, toutes ces données suggèrent dans leur ensemble que c'est l'interaction entre la LKT et la β_2 -intégrine LFA-1 des ruminants (figure 3) qui est responsable de la spécificité de la virulence de la LKT, et donc de *M. haemolytica*, envers les leucocytes de ces derniers.

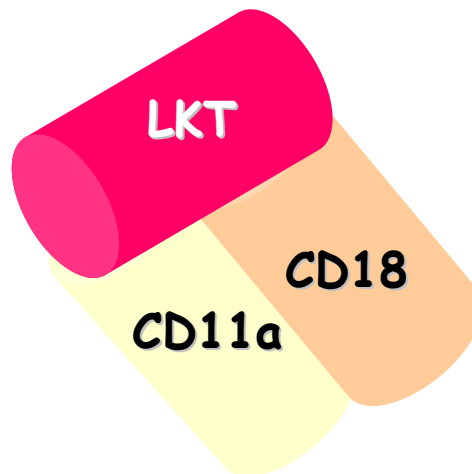


Figure 3 : Interaction moléculaire responsable de la spécificité d'espèce de *Mannheimia haemolytica* envers les ruminants. La liaison spécifique de la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* sur le récepteur dimérique LFA-1 (CD11a/CD18) des ruminants est responsable de la spécificité d'espèce qu'exhibe la bactérie vis-à-vis de ses hôtes.

CaCD11a : -----M-NSCTIVMRF : 10
 #
 BoCD11a : -----M-NSCIIVLRL : 10
 #
 OvCD11a : -----M-NSYTIVMRF : 10
 HuCD11a : -----MKDSCTIVMAM : 11
 #
 MuCD11a : -----MSFRIAGPR : 9
 RaCD11a : MALRICWRQEHSQSGHTPPPPPPHPRIPGAVTCSPPSCRWQACVLSLAVQTGSDLNQLGALGQTPHKAAGVGSLECLSLLVANEVQTDGCNKNQMAEDL : 100
 # # # # #

CaCD11a : -LLSGPFFVFAPANSYNLDVRHVQNEFSFPLAGRHFYRVLQVGNRVVVGAPNEGNRMGNLYQCOPETGDCLPVITL-SSSYTSKYLGMTLATDPTSCNLLAC : 108
 # # # # #
 BoCD11a : -LLSGPFFVFAPANSYNLDVRHVQNEFSFPLAGRHFYRVLQVGNRVVVGAPSEGNRMGNLYQCOPETGDCLPVITL-SSNYTSKYLGMTLATDPTSDNLLAC : 108
 # # # # #
 OvCD11a : -LLSGPFFVFAPANSYNLDVRHVQNEFSFPLAGRHFYRVLQVGNRVVVGAPNEGNRMGNLYQCOPETGDCLPVITL-SSSYTSKYLGMTLATDPTSCNLLAC : 108
 # # # # #
 HuCD11a : ALLSGPFFVFAPANSYNLDVRGARSFSPPRAGRHFYRVLQVGNRVVVGAPSEGNRMGNLYQCOPETGDCLPVITL-SSNYTSKYLGMTLATDPTDGSILAC : 111
 # # # # #
 MuCD11a : LLLGLQLFAKANSYNLDTRPTQSE-LAQAGRHFYQVLOFIEDGVVVGAPGEGDNLTGGLYHCHRTSSEFCQPVSIHGSNHTSKYLGMTLATDAAKGSILAC : 108
 # # # # #
 RaCD11a : AWSCLLPV--NANSYNLDTRHAQSE-LTQAGRHFYQVLOFIEDGVVVGAPGEGDNLTGGLYHCHPSSGSCQPVSIHGSNHTSKYLGMTMVTDAKGSILAC : 196
 # # # # #

CaCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYL I HENLRCPVLOGHPGYQECIKGNVDLVFLFDGSM SLQODEFBKIVDFMKDVMK KLSNS SYQFAAVQFSTDFKTEFTFLDY : 208
 # # # # #
 BoCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYL I HENLRCPVLOGHPGYQECIKGNVDLVFLFDGSM SLQODEFBKIVDFMKDVMK KLSNS SYQFAAVQFSTDFKTEFTFLDY : 208
 # # # # #
 OvCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYL I HENLRCPVLOGHPGYQECIKGNVDLVFLFDGSM SLQODEFBKIVDFMKDVMK KLSNS SYQFAAVQFSTDFKTEFTFLDY : 208
 # # # # #
 HuCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYLFRQNLQCPMLQGRPGFYQECIKGNVDLVFLFDGSM SLQODEFBKIVDFMKDVMK KLSNTSYQFAAVQFSTSYKTEFDFSDY : 211
 # # # # #
 MuCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYLFPQSLGCPMLQNRPAFYQECMKGNVDLVFLFDGSM SLDRKDFBKILEFMKDVMK KLSNTSYQFAAVQFSTDCRTEFTFLDY : 208
 # # # # #
 RaCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYLFSQSLGKPI LQNRPAFYQECMKGNVDLVFLFDGSM SLDKKDFBKIVDFMKDVMK KLSNTSYQFAAVQFSTECKTEFTFLDY : 296
 # # # # #


```

CaCD11a : eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeddddddddeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeddddddddeeee
          : GEFQMVSELOQGETGYPLGRFGAAIAALTDINGDELDVAVGAPLEEQGAVYIFNGQQGLSPRPSORIEGIQMFSGIQWFGRSIHGVKDLGGDGLADVAVG : 599
BoCD11a : EEFQMVSELOQGETGYPLGRFGAAIAALTDINGDELDVAVGAPLEEQGAVYIFNGQQGLSPRPSORIEGIQMFSGIQWFGRSIHGVKDLGGDGLADVAVG : 599
OvCD11a : GEFQMVSELOQGETGYPLGRFGAAIAALTDINGDELDVAVGAPLEEQGAVYIFNGQQGLSPRPSORIEGIQMFSGIQWFGRSIHGVKDLGGDGLADVAVG : 599
HuCD11a : GFEFVSELOQDGPYPLGRFGAATALTLDINGDGLVDVAVGAPLEEQGAVYIFNGRHGGLSPQPSORIEGIQVLSGIQWFGRSIHGVKDLGGDGLADVAVG : 602
MuCD11a : LFEFVSELOQDGPYPLGRFGAATALTLDINGDRLDVAVGAPLEEQGAVYIFNGKPGGLSPQPSORIQGAQVFPGIRWFGRSIHGVKDLGGDRLANVAVG : 600
RaCD11a : LFEFVSELOQDGPYPLGRFGAATALTLDINGDGLVDVAVGAPLEEQGAVYIFNGKPGGFSQSSORIPGIQVSPGVRWFGRSIHGVKDLGGDRLADVAVG : 696
    
```

```

CaCD11a : eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee
          : AEGQVIVLSSR-PVVDIITSVSFSPAIEIPVREVECSYSTSNQKKEGVNITVCFQVKSLISTFOGHLVANLTYTLQLDGHRTSRGLFPGCKHELNGNTAV : 698
          : # # * #
BoCD11a : AEGQVIVLSSR-PVVDIITSVSFSPAIEIPVREVECSYSTSNQKKEGVNITVCFQVKSLISTFOGHLVANLTYTLQLDGHRTSRGLFPGCKEKLICNTAV : 698
          : # # # #
OvCD11a : AEGQVIVLSSR-PVVDIITSMFSPAIEIPVREVECSYSTSNQKKEGVNITVCFQVKSLISTFOGHLVANLTYTLQLDGHRTSRGLFPGCKHELNGNTAV : 698
          : # # # #
HuCD11a : AESQMIVLSSR-PVVDMVTLMFSPAIEIPVREVECSYSTSNKMKKEGVNITVCFQIKSLYPOFOGRLVANLTYTLQLDGHRTSRGLFPGCRHELRRNIAY : 701
          : # # # #
MuCD11a : PECRVIVLSSR-PVVDVVTLSFSPSEIEIPVREVECSYSAREEQKHGVKCLKAERIKPLTPFOGRLLANLTYTLQLDGHRTSRGLFPDGSHELSCNTISI : 699
          : # # # #
RaCD11a : AEGQVIVLRAIIPDCGLLITSTGIV-DEIPVREVECSYSASQEQKKEGVKLVCFQIRPLTISFOGRLLANLTYTLQLDGHRTSRGLFPGCSRELGCNTISV : 795
          : # # # #
    
```

```

CaCD11a : eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee
          : ISVKSCEFMWFHFP-----ICIQDLISPINVSLSYSLWEEEGIPRDPRA----- : 742
          : # # * #
BoCD11a : ITPVKSCEVFWFHFP-----ICIQDLISPINVSLSYSLWEEEGIPRDPRA----- : 742
          : # # # #
OvCD11a : ISVKSCEFMWFHFP-----ICIQDLISPINVSLSYSLWEEEGIPRDPRA----- : 742
          : # # # #
HuCD11a : ITSMSCTDFFSFHFP-----VQVQDLISPINVSLSNFSLLWEEEGIPRDQRA----- : 745
          : # # # #
MuCD11a : ITPDKSCLDFHFHFP-----ICIQDLISPINVSLSNFSLLWEEEGIPRDQK----- : 742
          : # # # #
RaCD11a : ITPDKSCMDFHFHFPVRQPVLEFREGLTALCIQDLISPINVSLSNFSLLWEEEGSPRDQKGLLMGVFVSGGKGPTRKTRLPYSAFCDGNKYANSQVIKKKGSSG : 895
          : # # * #
    
```

```

CaCD11a : -----OGRDIPILKPSPHLETKEIPFEKNCGEDKTC EADLKLAFSDMRSKILHLTPSASLSVR : 801
          =                                     #                                     #
BoCD11a : -----LDRDIPILKPSPHLETKEIPFEKNCGEDKTC EADLKLAFSDMRSKILRLTPSASLSVR : 801
          =                                     #                                     #
OvCD11a : -----OGRDIQIPILKPSPHLETKEIPFEKNCGEDKTC EADLKLAFSDMRSKILHLTPSASLSVR : 801
          =                                     #                                     #
HuCD11a : -----QCKDIPILRPSLHSETWEIPFEKNCGEDKTC EANLRVLSFSPARSRALRLTAFASLSVE : 804
          =                                     #                                     #
MuCD11a : -----GRAMQPILRPSIHTVTK EIPFEKNCGEDKTC EANLTLSPARSGLRLTMSASLAVE : 799
          =                                     #                                     #
RaCD11a : LTSVVIVYDHQFCRFGPLTGAYYAQDLLTQLSTLSSLLRPQOGRDMQPILRPSIHAVTK EIPFEKNCGEDKTC EADLALS-PARSGVLRRLTMSASLAVE : 994
          #                                     =                                     #

```

```

CaCD11a : LILRNTAEDAYWVOVTLSFPQGLSFRKVEALKPHSHVPVGCEELPEEAIIQSRALSCNVSSPIFGADSMVDIQVMFNTLQKGSWGDLIKLHANVSCDNEN : 901
          #                                     #*                                     #
BoCD11a : LILRNTAEDAYWVOVTLSFPQGLSFRKVEALKPHSHVPVGCEELPEEAVVHSRALSCNVSSPIFGEDSMVDIQVMFNTLQKGSWGDFIELQANVSCNNED : 901
          #                                     #*                                     #
OvCD11a : LILRNTAEDAYWVOVTLSFPQGLSFRKVEALKPHSHVPVGCEELPEEAIIQSRALSCNVSSPIFGADSMVDIQVMFNTLQKGSWGDLIELHANVSCDNEN : 901
          #                                     #*                                     #
HuCD11a : LSISNLEEDAYWVQLDLHFPPGLSFRKVEMLKPHSQIPVSCEEELPEESRILSRALSCNVSSPIFKAGHSVALQVMFNTLVNSWGDSVELHANVTCNNED : 904
          #                                     #*                                     #
MuCD11a : WILSNSGEDAYWVRLDLDFPRGLSFRKVEMLKPHSRMPVSCEEELTEGSSLITKTLKCNVSSPIFKAGQEVSLQVMFNTLLNSSWEDFVELNGTVHCENEN : 899
          #                                     #*                                     #
RaCD11a : WILRNLGEDAYWVRLDLDFPRGLSFRKVEMLKPHSQIPVSCEEELTEESSLITKTLKCNVSSPIFKAGQMTLQVMFNTLLNSSWEDFVELNGTVHCENEN : 1094
          #                                     #*                                     #

```

```

CaCD11a : SSLLEDNSATASIPVMYPINILLKDQENSTLYINFTPKSPKIHHVKHIYQVRIOPSNYD-NVEPLEALVRVEQVHSELIIHRWSIOMEPPVNCSSRNLE : 1000
          #                                     #*                                     #
BoCD11a : SSLLEDNSATTSIPVMYPINVLLKDQENSTLYISFTPKSPKIHHVKHIYQVRIOPSNYD-NMEPLEALVRVERVHSEGLIIHKWSIOMEPPVNCSPRNLE : 1000
          #                                     #*                                     #
OvCD11a : SSLLEDNSATASIPVMYPINILLKDQENSTLYISFTPKSPKIHHVKHIYQVRIOPSNYD-NVEPLEALVRVERVHSEGLIIHRWSIOMEPPVNCSPRNLE : 1000
          #                                     #*                                     #
HuCD11a : SDLLEDNSATTIIPILYPINILIQDQEDSTLYVSFTPKGPKIHQVKHMYQVRIOPSIHDHNIPTLEAVVGVEQPSEGPIIHQWSVOMEPPVPCHYEDLE : 1004
          #                                     #*                                     #
MuCD11a : SSLLQEDNSAATHIPVLYPVNILLKEQENSTLYISFTPKGPKTQQVHVYQVRIOPSAYDHNMEPLEALVGVERPHSEDLIIYTWSVQTDELVTCHSEDLK : 999
          #                                     #*                                     #
RaCD11a : SSLGKDNSATTRIPVLYPVNILLEDQENSTLYISFTPKGPKTQQVHIYKVRIOPSAYDHNMEPALEALVEVEQHSEGPLAHTWTVHT----- : 1182
          #                                     #*                                     #

```

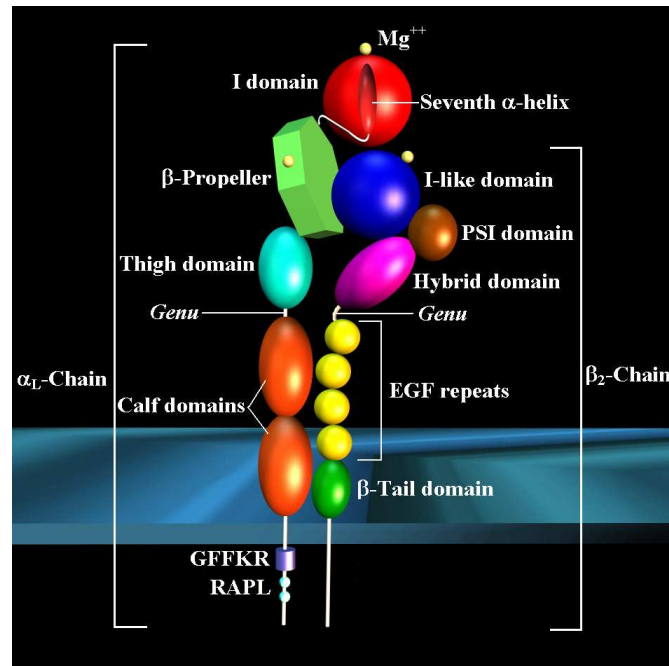



Figure 8 : Représentation schématique des domaines structuraux du récepteur LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$ ou CD11a/CD18). Les sous-unités CD11a et CD18 possèdent chacune un large domaine extracellulaire et de courtes portions transmembranaire et cytoplasmique. Chez le CD11a, le *I domain* (rouge) lie les 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 domaine plexin-sémaphorine-intégrine (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.

5.2.2. Comparaison générale entre espèces

Globalement, l'organisation générale des CD11a humain (Larson *et al.*, 1989), ovin (Fett *et al.*, 2005a), bovin (Fett *et al.*, 2004), caprin (Fett *et al.*, 2005b), porcine (Vanden Bergh *et al.*, 2005), murin (Kaufmann *et al.*, 1991), canin (GenBank NW_876320) et de rat (GenBank NW_047562) est conservée (figure 7). La comparaison de séquences entre le CD11a humain et ses homologues bovin, ovin, caprin, humain, porcine, murin, canin et de rat conduit globalement à 77, 77, 77, 76, 71, 78 et 58% d'identité, respectivement, avec l'identité la plus élevée pour le MIDAS, le *I domain*, les motifs de liaison des cations et la région transmembranaire, et l'identité la plus faible pour le domaine cytoplasmique et le peptide signal (tableau II). La haute conservation du MIDAS, du *I domain* et des motifs potentiels de liaison des cations est en accord avec la participation de ces régions à l'activité fonctionnelle de la sous-unité α du LFA-1, comme suggéré par les besoins en calcium et magnésium pour les interactions cellulaires LFA-1-dépendantes (Rothlein et Springer, 1986) ou la liaison à de l'ICAM-1 purifié (Dustin et Springer, 1989; Vitte *et al.*, 2004). La région transmembranaire, quant à elle, montre un haut degré d'identité qui peut s'expliquer par des contraintes physiques et

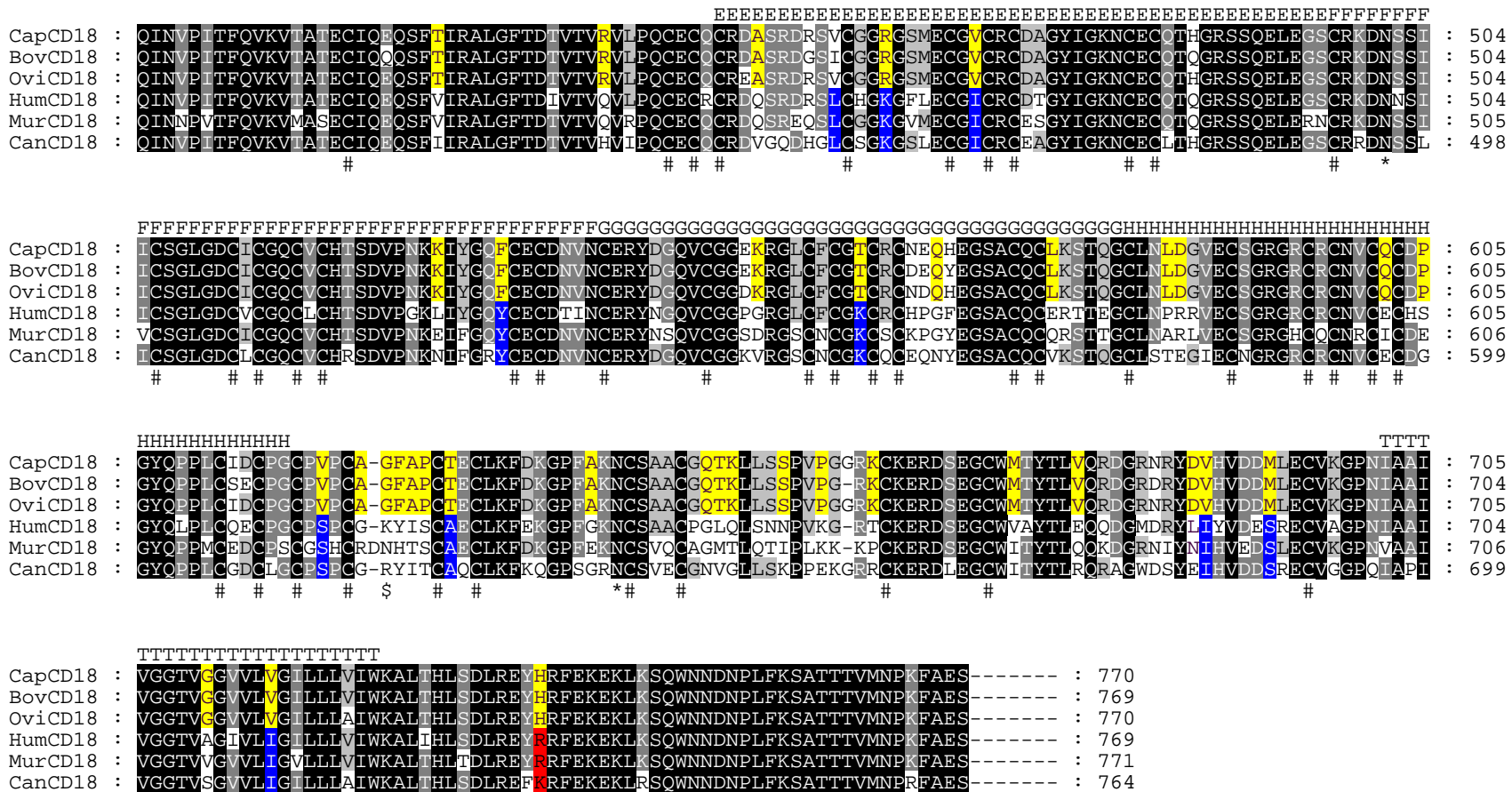


Figure 11 : Comparaison des séquences protéiques des CD18 caprin (cap), bovin (bov), ovine (ovi), humain (hum), murin (mur) et canin (can). Les lettres sur la ligne supérieure identifient les blocs constitutifs : le peptide signal potentiel (S), le domain plexine sémaphorine intégrine (P), le *I-like domain* (I), le *MIDAS-like motif* (M), les *EGF domains* 1-4 (E-H) et la région transmembranaire (T). Les fonds noir, gris foncé, gris clair, jaune et bleu représentent respectivement les identités entre 6, 5, 4 espèces, les ruminants et les non ruminants. Le fond rouge représente la position où le résidu chez les non ruminants est systématiquement un résidu Arg ou Lys. Les résidus Cys conservés (#) ou additionnels (+), de même que les sites potentiels de N-glycosylation conservés (*) ou additionnels (\$) sont spécifiés sur la ligne inférieure.

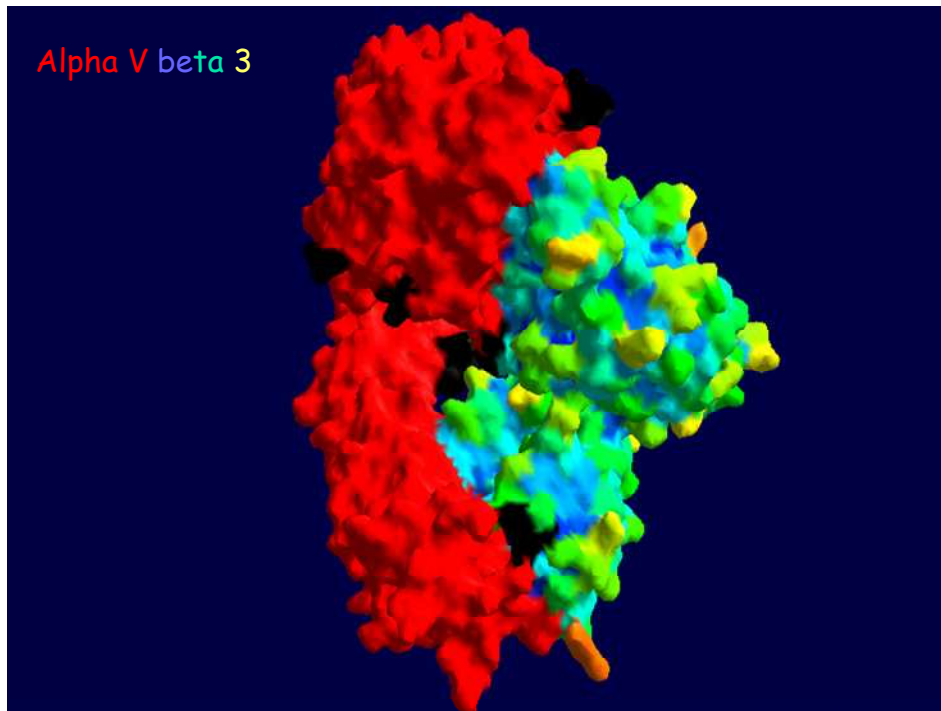


Figure 12 : Schéma de la structure tridimensionnelle de la portion extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ humaine. La sous-unité alpha est représentée en rouge et la sous-unité beta en diverses couleurs traduisant l'exposition des résidus (de bleu à rouge, en passant par le vert et le jaune, du plus enfoui au plus exposé). Le traitement de la figure a été réalisé à l'aide du programme Swiss-Pdb Viewer v.3.7.

5.4. Conclusions

5.4.1. *Le LFA-1 des ruminants*

L'obtention des séquences des CD11a bovin (Fett *et al.*, 2004), ovin (Fett *et al.*, 2005a) et caprin (Fett *et al.*, 2005b), ainsi que celles des CD18 ovin (Zecchinon *et al.*, 2004b) et caprin (Zecchinon *et al.*, 2004a) nous a permis de comparer le LFA-1 des ruminants à ses homologues non ruminants pour aboutir à la conclusion que globalement, tous ces récepteurs présentent la même organisation générale puisque l'on retrouve chez chacun d'eux les mêmes motifs structuraux caractéristiques, à savoir un peptide signal potentiel, une large partie extracellulaire (comprenant pour le CD11a, un *I domain* avec ses sites MIDAS et IDAS ainsi que trois répétitions avec un motif de liaison des cations divalents et pour le CD18, le domaine PSI, le *I-like domain*, le *MIDAS-like motif* et les domaines EGF 1-4) et de courtes régions transmembranaire et cytoplasmique.

Par ailleurs, si les séquences obtenues permettent à présent l'expression des LFA-1 bovin, ovin et caprin *in vitro* comme outils d'étude de l'inflammation chez ces espèces, elles conduisent surtout, par le biais d'une comparaison des CD11a et des CD18 ruminants versus ceux des non ruminants, à mettre en exergue respectivement 58 et 17 sites potentiels de mutation qui peuvent être tenus pour responsables de la mannheimiose.

6.3. Evaluation de l'activité cytotoxique de la leucotoxine

6.3.1. Test de viabilité cellulaire

L'activité cytotoxique de la LKT a pu être évaluée via la réalisation d'un test de viabilité cellulaire sur la lignée lymphoblastique bovine BL-3 (figure 15). Les résultats obtenus confirment les données de la littérature, à savoir la sensibilité des BL-3 (↔) à la LKT de manière dose-dépendante. Le BHI (milieu de culture de *Mannheimia haemolytica* pour la production de LKT) n'influence quant à lui que légèrement la viabilité cellulaire (↔). L'incubation préalable de la leucotoxine avec la polymyxine B, un inhibiteur des LPS, ne modifie pas significativement les valeurs obtenues avec la leucotoxine seule, suggérant que la LKT purifiée a été épurée des LPS (↔).

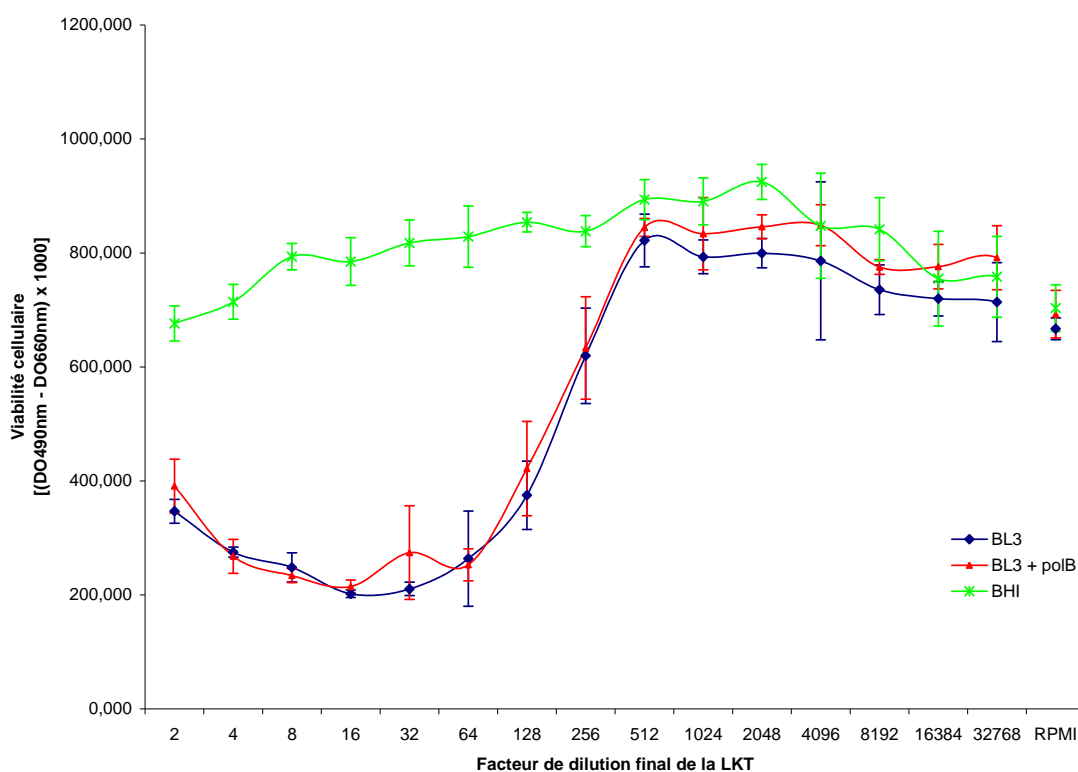


Figure 15 : Evaluation de la toxicité de la LKT mesurée par MTS. Le graphique présente la viabilité de la lignée lymphoblastique bovine BL-3 (mesurée par MTS) en réponse à l'ajout de LKT en dilution. L'effet du milieu de production de la LKT, le BHI, a été évalué, de même que l'impact de la polymyxine B, un inhibiteur des lipopolysaccharides. Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations et correspondent à la moyenne de trois mesures. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

6.3.2. Spécificité cellulaire de la cytotoxicité de la LKT

L'activité cytotoxique de la LKT a pu être évaluée via la réalisation d'un test de viabilité cellulaire sur les lignées lymphoblastique et myéloblastique humaine HL-60 (—) et Raji (—), respectivement, (figure 16). Les résultats obtenus confirment de nouveau les données de la littérature, à savoir l'insensibilité de ces lignées à la LKT. On remarque par contre que les BL-3 (—) ont intrinsèquement un métabolisme moins actif (approximativement 50 %) que les autres lignées cellulaires.

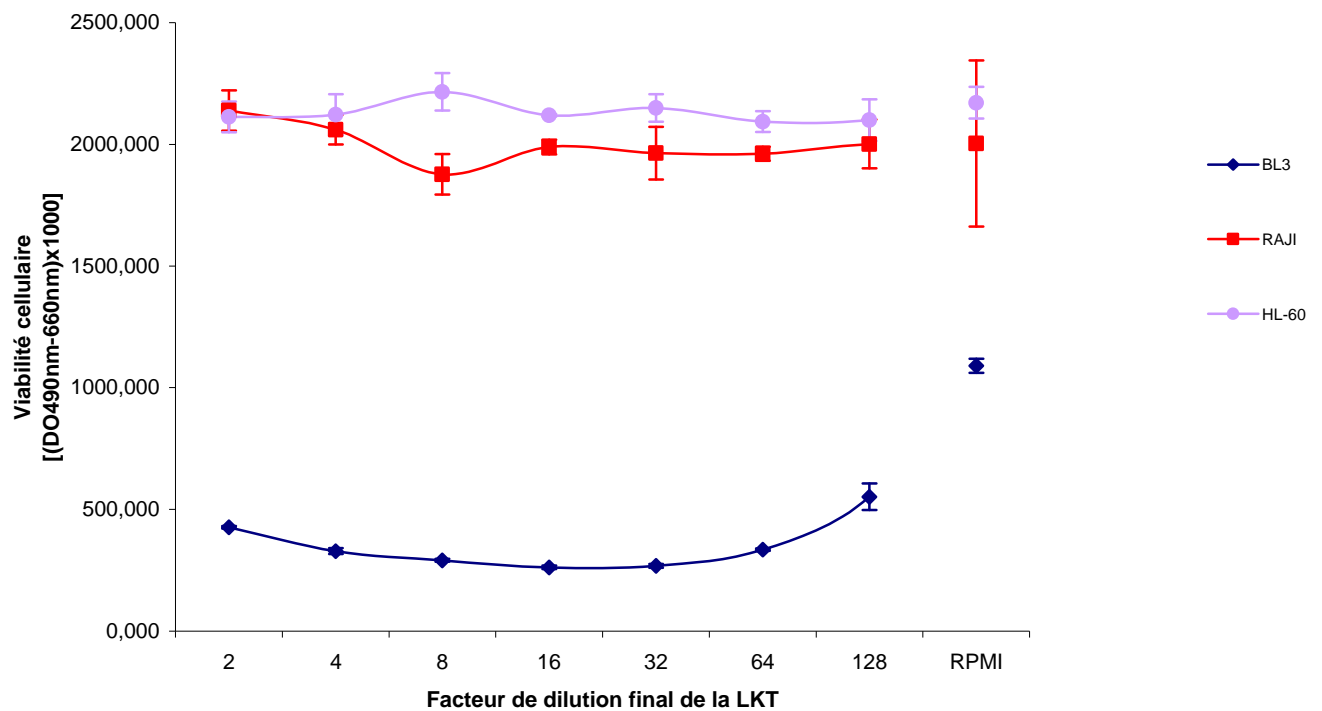


Figure 16 : Evaluation de la toxicité de la LKT mesurée par MTS. Le graphique présente la viabilité (mesurée par MTS) de plusieurs lignées cellulaires (BL-3, RAJI et HL-60) en réponse à l'ajout de LKT en dilution. Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations et correspondent à la moyenne de trois mesures. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

6.4. Inhibition de l'activité cytotoxique par un anticorps anti-leucotoxine

Nous avons également désiré nous assurer de la responsabilité de la leucotoxine en ce qui concerne les effets observés au paragraphe précédent. Nous avons ainsi incubé les cellules BL-3 en présence (i) d'une dilution de leucotoxine d'un facteur 16 correspondant à la moitié de la plus haute dilution de leucotoxine capable d'induire la cytotoxicité maximale (figure 16) et (ii) de dilutions en série de l'anticorps monoclonal MM601, réputé inhibiteur de l'activité de la leucotoxine (Gentry et Srikumaran, 1991; Deshpande *et al.*, 2002).

Nous pouvons constater à la figure 17 que l'anticorps MM601 dilué jusqu'à 16000 fois inhibe totalement l'activité cytotoxique puisque nous observons une viabilité cellulaire du même ordre de grandeur que lorsque les BL-3 sont mises en présence du milieu de culture uniquement (ici le DMEM, deuxième point en partant de la droite). A de plus fortes dilutions de l'anticorps, l'activité cytotoxique n'est plus inhibée.

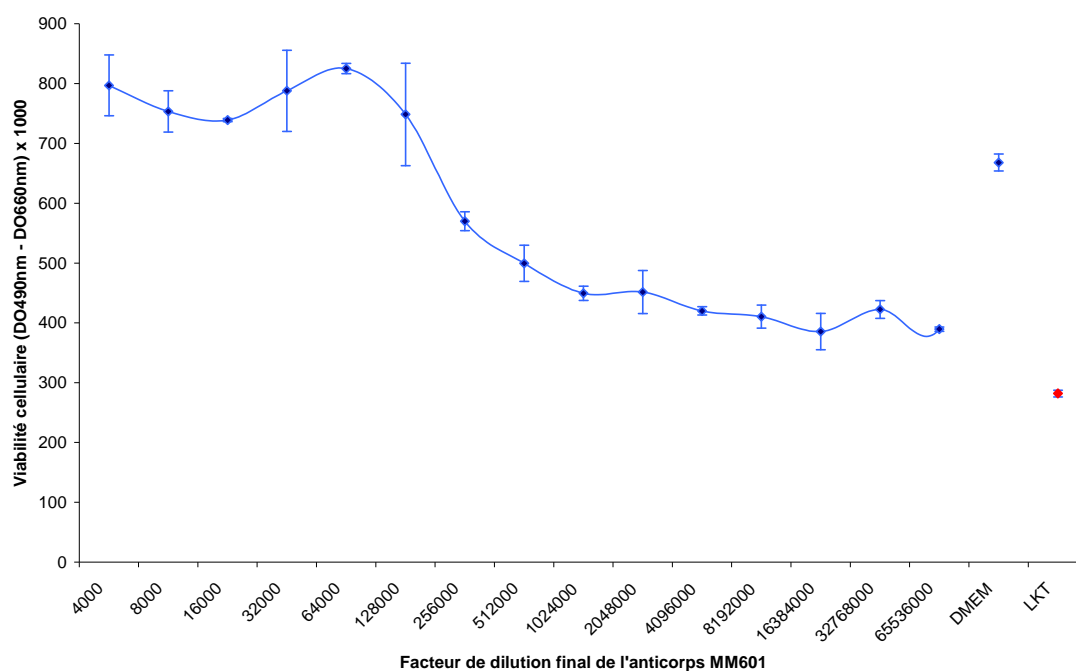


Figure 17 : Inhibition spécifique de la toxicité induite par la LKT sur les BL-3. Le graphique présente la viabilité de la lignée lymphoblastique d'origine bovine BL-3 (mesurée par MTS) en réponse à l'ajout de LKT diluée 16 fois et de dilutions croissantes de l'anticorps monoclonal inhibiteur de la LKT (MM601). Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations et correspondent à la moyenne de trois mesures. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Le point rouge à l'extrême droit représente la toxicité induite par une dilution 16 fois de la LKT sans l'anticorps MM601.

significatif de l'ajout équimolaire de ces peptides suivant une gamme allant d'un excès molaire de 1000 à 0.0001 par rapport à un dosage de protéines classique (μ BCA) de la leucotoxine (croix bleues) puisque les valeurs obtenues sont équivalentes à celle mesurée lorsque la leucotoxine est seule en présence des BL-3 (contrôle positif, carré bleu). La viabilité des BL-3 en absence de leucotoxine est, comme attendu, plus élevée (contrôle négatif, triangle bleu). Les 13 peptides furent également évalués individuellement mais les résultats générés étaient similaires à ceux présentés à la figure 20 (données non présentées).

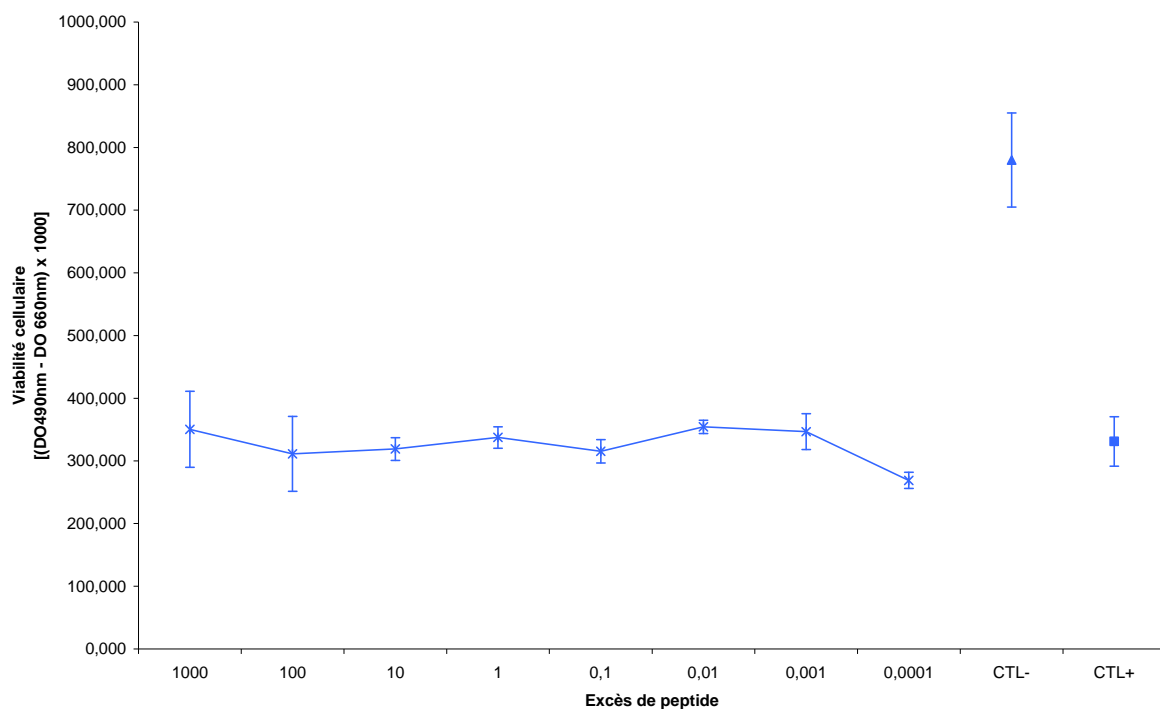


Figure 20 : Tentative d'inhibition de la toxicité induite par la LKT sur les BL-3 via une compétition avec un mélange de peptides dérivés de la séquence du CD18 bovin. Le graphique présente la viabilité de la lignée lymphoblastique d'origine bovine BL-3 (mesurée par MTS) en réponse à l'ajout de LKT diluée 32 fois et de dilutions croissantes d'un mélange équimolaire des 13 peptides décrits au point 7.1.2, allant d'un excès molaire par rapport à la dilution de leucotoxine couvrant une gamme de 1000 à 0.0001 (croix bleues). Le triangle et le carré bleu représentent respectivement les contrôles négatif et positif, c'est-à-dire les BL-3 incubées en présence de milieu de culture et de leucotoxine, toujours respectivement. Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations et correspondent à la moyenne de trois mesures. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

7.3. Etude de lignées lymphoblastiques exprimant de manière transitoire des récepteurs LFA-1 mutés

7.3.1. *Au niveau du domaine transmembranaire du CD18*

L'évaluation du mutant 16 (V₇₁₅I, portion transmembranaire) et des deux variants du mutant 17 (H₇₃₆K et H₇₃₆R, région cytoplasmique) du CD18 bovin a nécessité la modification transitoire de la lignée lymphoblastique humaine K-562, n'exprimant naturellement aucune β_2 -intégrine, de manière à lui conférer l'aptitude à exprimer en surface différentes combinaisons des sous-unités CD11a et CD18. La figure 21 présente ainsi l'expression, mesurée par immunomarquage, des hétérodimères constitués (i) du CD11a et du CD18 bovins (contrôle positif de cytotoxicité), (ii) du CD11a bovin et du CD18 humain (contrôle négatif de cytotoxicité) et (iii) du CD11a bovin et du mutant 16 (portion transmembranaire) du CD18. On constate que 70 à 80 % des cellules expriment les LFA-1 susmentionnés (boîtes saumon), alors que l'on observe une mortalité naturelle et/ou induite par la transfection, mesurée par marquage à l'iodure de propidium, de moins de 10 % (boîtes pourpres).

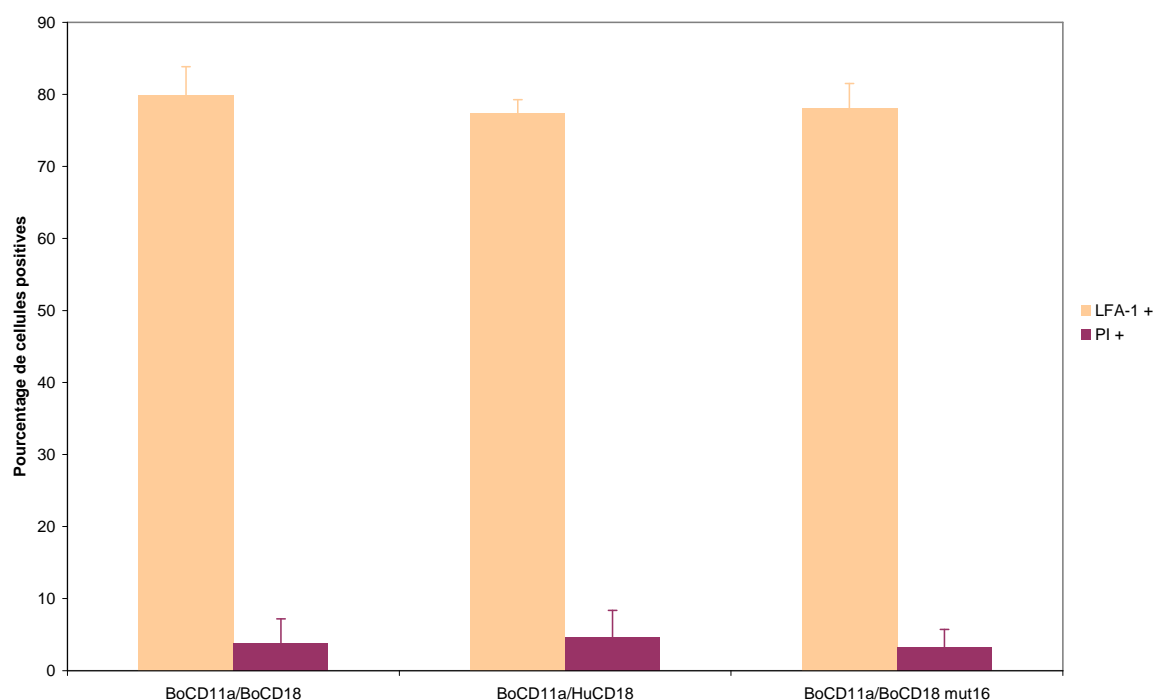


Figure 21 : Expression du LFA-1 bovin, de la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou du mutant 16 du LFA-1 bovin après transfection transitoire de cellules K-562. Le graphique présente le pourcentage de cellules K-562, mesuré par immunomarquage, exprimant le LFA-1 bovin, la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou le mutant 16 du LFA-1 bovin (boîtes saumon) ainsi que le pourcentage de ces mêmes cellules en nécrose (boîtes pourpres). Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations et correspondent à la moyenne de deux mesures indépendantes. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

La sensibilité de ces lignées à l'action de la LKT a été étudiée via la réalisation d'un test de mortalité cellulaire (marquage à l'iodure de propidium). Nous constatons à la figure 22 que la lignée K-562 transfectée avec le LFA-1 bovin (■) présente une sensibilité dose-dépendante avec un maximum de cellules en nécrose avoisinant 15-20 % pour la plus faible dilution de leucotoxine. A contrario, aucune sensibilité n'est observée pour la lignée K-562 transfectée avec le LFA-1 chimérique constitué du CD11a bovin et du CD18 humain (▲). La lignée K-562 transfectée avec le mutant 16 du LFA-1 bovin (×) montre quant à elle également une mortalité dose-dépendante de l'ajout de leucotoxine avec un maximum légèrement supérieur à 20 % de cellules en nécrose pour la plus faible dilution de LKT. Pour chaque lignée, nous avons évalué la mortalité en présence de 10 % de paraformaldéhyde (PAF, à l'extrême droite) ou de RPMI 1640 supplémenté (deuxième abscisse en partant de la droite) et nous avons obtenu les résultats attendus pour ces contrôles, à savoir une forte mortalité en présence de PAF et une faible mortalité en présence de milieu de culture.

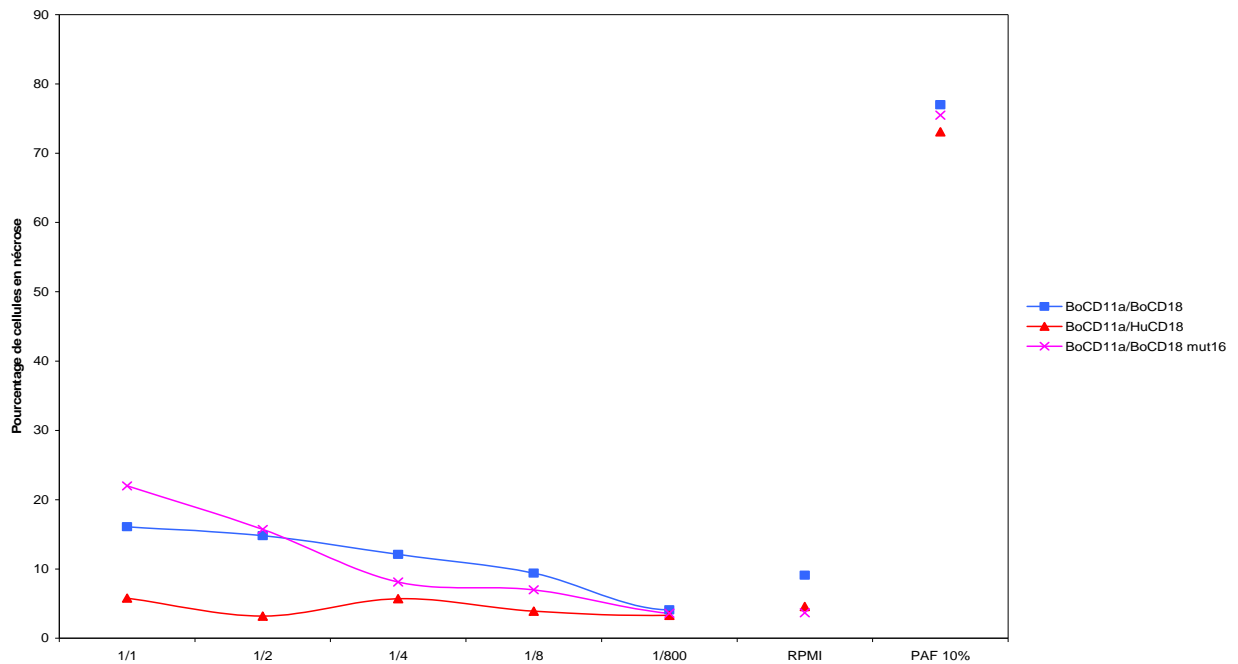


Figure 22 : Sensibilité à la leucotoxine de lignées K-562 exprimant de manière transitoire le LFA-1 bovin, la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou le mutant 16 du LFA-1 bovin. Le graphique présente la mortalité, mesurée par marquage à l'iodure de propidium, de lignées de K-562 exprimant le LFA-1 bovin, la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou le mutant 16 du LFA-1 bovin en réponse à l'ajout de dilutions croissantes de leucotoxine, de milieu de culture RPMI 1640 supplémenté ou de paraformaldéhyde (PAF) 10 %. Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations.

7.3.2. Au niveau du domaine cytoplasmique du CD18

La figure 23 présente l'expression, mesurée par immunomarquage, des hétérodimères constitués (i) du CD11a et du CD18 bovins (contrôle positif de cytotoxicité), (ii) du CD11a bovin et du CD18 humain (contrôle négatif de cytotoxicité) et (iii) du CD11a bovin et des deux variants du mutant 17 (portion cytoplasmique). On constate que 70 à 80 % des cellules expriment les LFA-1 susmentionnés (boîtes saumon), alors que l'on observe une mortalité naturelle et/ou induite par la transfection, mesurée par marquage à l'iodure de propidium, de moins de 10 % (boîtes pourpres).

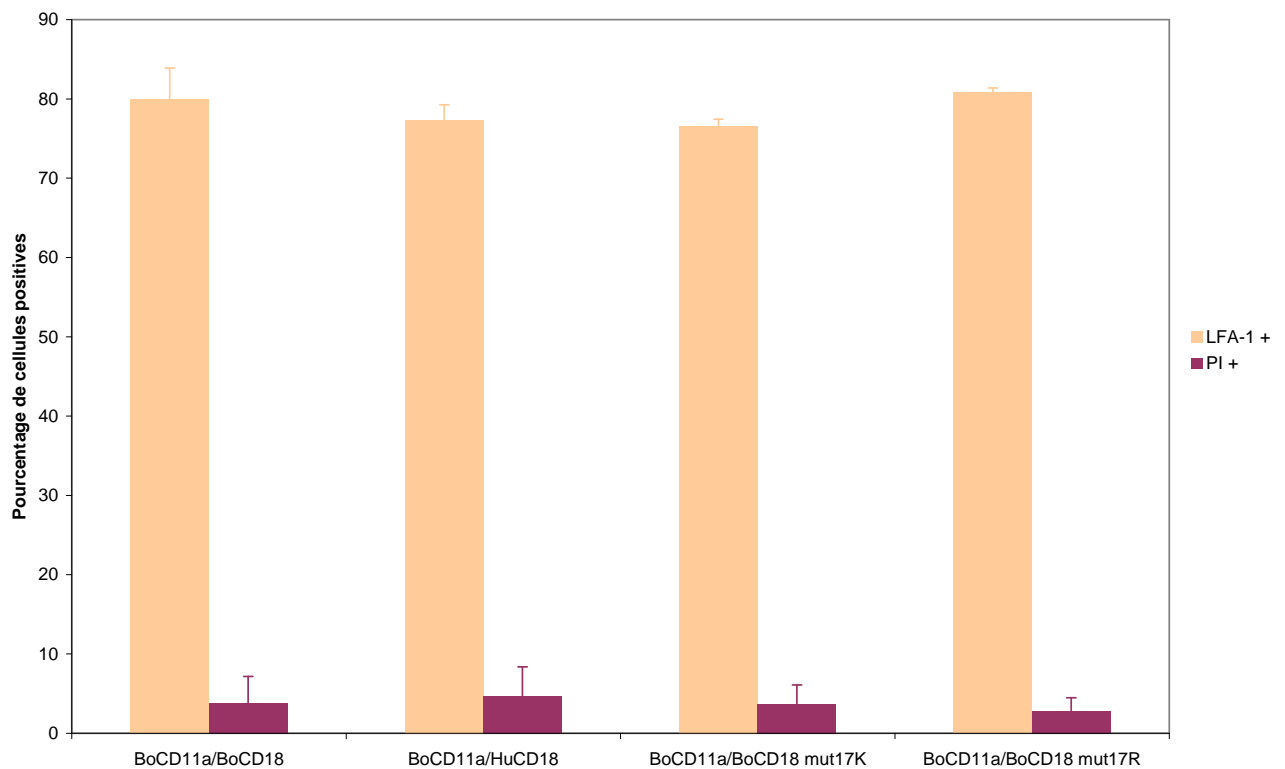


Figure 23 : Expression du LFA-1 bovin, de la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou des variants du mutant 17 du LFA-1 bovin après transfection transitoire de cellules K-562. Le graphique présente le pourcentage de cellules K-562, mesuré par immunomarquage, exprimant le LFA-1 bovin, la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou les variants du mutant 17 du LFA-1 bovin (boîtes saumon) ainsi que le pourcentage de ces mêmes cellules en nécrose (boîtes pourpres). Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations et correspondent à la moyenne de deux mesures indépendantes. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

La sensibilité de ces lignées à l'action de la LKT a également été étudiée via la réalisation d'un test de mortalité cellulaire (marquage à l'iodure de propidium). Nous constatons à la figure 24 que les lignées K-562 transfectées avec les variants du mutant 17 du LFA-1 bovin où l'histidine est remplacée par une lysine (K, —) ou une arginine (R, —) présentent une mortalité dose-dépendante de l'ajout de leucotoxine avec un maximum avoisinant 25 % de cellules en nécrose pour la plus faible dilution de LKT. Les contrôles positifs et négatifs de sensibilité à la leucotoxine, à savoir les lignées K-562 transfectées respectivement avec le LFA-1 bovin (—) ou le LFA-1 chimérique constitué du CD11a bovin et du CD18 humain (—) sont également représentés. Pour chaque lignée, nous avons évalué la mortalité en présence de 10 % de paraformaldéhyde (PAF, à l'extrême droite) ou de RPMI 1640 supplémenté (deuxième abscisse en partant de la droite) et nous avons obtenu les résultats attendus pour ces contrôles, à savoir une forte mortalité en présence de PAF et une faible mortalité en présence de milieu de culture.

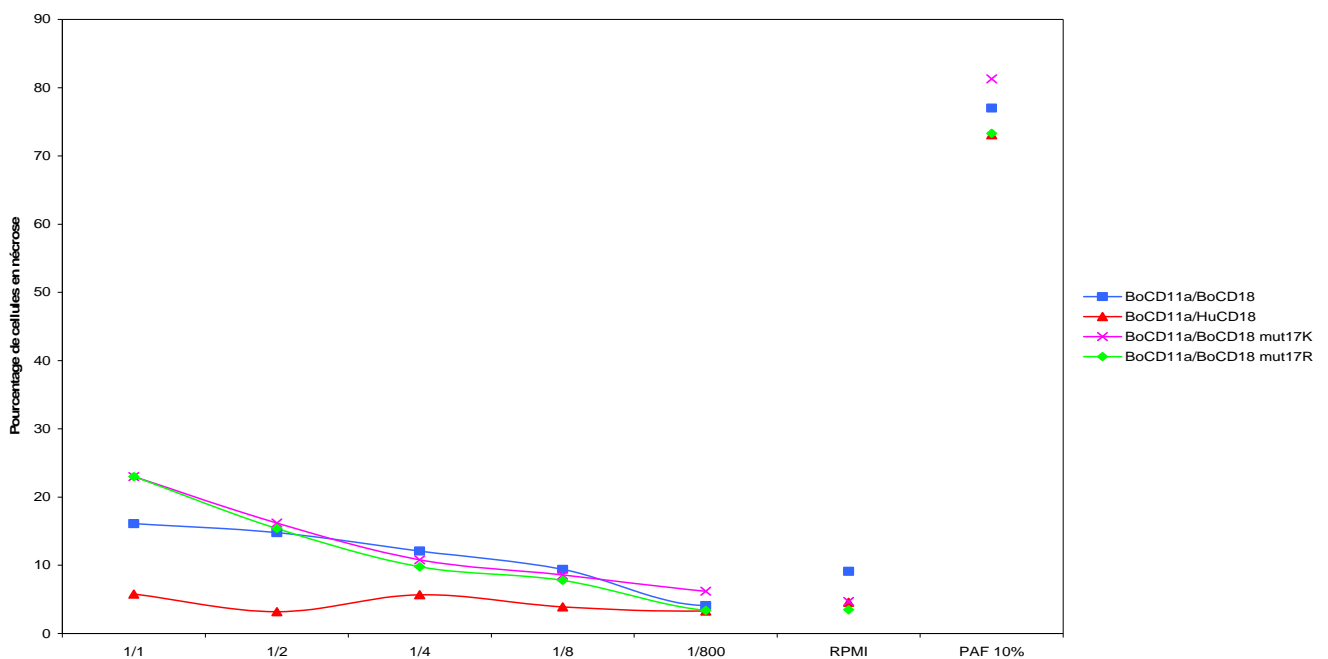


Figure 24 : Sensibilité à la leucotoxine de lignées K-562 exprimant de manière transitoire le LFA-1 bovin, la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou les deux variants du mutant 17 du LFA-1 bovin. Le graphique présente la mortalité, mesurée par marquage à l'iodure de propidium, de lignées de K-562 exprimant le LFA-1 bovin, la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou les variants du mutant 17 du LFA-1 bovin en réponse à l'ajout de dilutions croissantes de leucotoxine, de milieu de culture RPMI 1640 supplémenté ou de paraformaldéhyde (PAF) 10 %. Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations.

