

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).

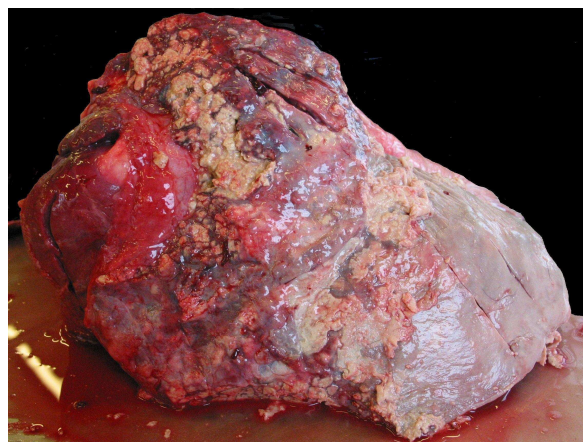


Figure 1 : Pneumonie nécrosante multifocale et pleurésie fibrineuse viscérale où *Mannheimia haemolytica* a pu être mise en évidence. Grandes plaques de nécrose observées sur un lobe diaphragmatique gauche coupé transversalement dans son tiers proximal.

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).

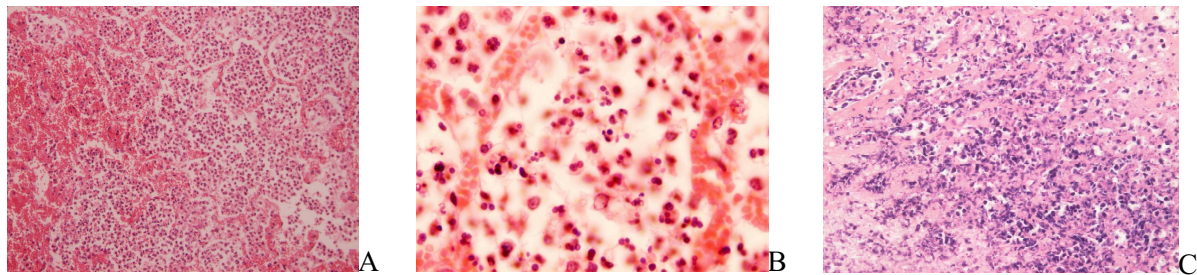


Figure 2 : Lésions histologiques pulmonaires d'une infection à *Mannheimia haemolytica* (hématoxyline-éosine). On constate une infiltration massive dans les alvéoles de leucocytes (A, grossissement 200x), s'avérant être des polymorphonucléaires neutrophiles (B, grossissement 400x) qui vont rapidement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

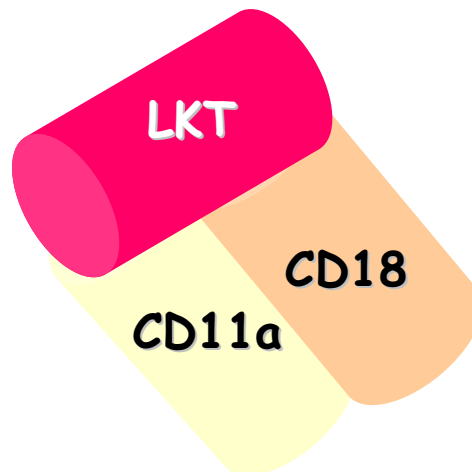


Figure 3 : Interaction moléculaire responsable de la spécificité d'espèce de *Mannheimia haemolytica* envers les ruminants. La liaison spécifique de la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* sur le récepteur dimérique LFA-1 (CD11a/CD18) des ruminants est responsable de la spécificité d'espèce qu'exhibe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

CaCD11a : -----M-NSCTIVMRF : 10
 #
 BoCD11a : -----M-NSCIIVLRL : 10
 #
 OvCD11a : -----M-NSYTIIVMRF : 10
 HuCD11a : -----MKDSCITVMAM : 11
 #
 MuCD11a : -----MSFRIAGPR : 9
 RaCD11a : MALRICWRQEHSQSGHTPPPPPHPRIPGAVTCSPPSCRWQACVLSLAVQTGSDLNQLGALGQTPHKAARKVGSLECLSLLVANEVQTDGCNKNGQMAEDL : 100
 # # # # #

CaCD11a : -LLSGPFFVFAPAWSYNLDVRRHVNESFPLAGRHFGRVLOVQCNRVVVGAPNEGNRMGNLYOCOPETCDCLPVTIL-SSSYTSKYLGMTLATDPTSCNLLAC : 108
 # # # # #
 BoCD11a : -LLSGPFFVFAPAWSYNLDVRRHVNESFPLAGRHFGRVLOVQCNRVVVGAPSEGNSMGNLYOCOPETCDCLPVTIL-SSNYTSKYLGMTLATDPTSDNLLAC : 108
 # # # # #
 OvCD11a : -LLSGPFFVFAPAWSYNLDVRRHVNESFPLAGRHFGRVLOVQCNRVVVGAPNEGNRMGNLYOCOPETCDCLPVTIL-SSSYTSKYLGMTLATDPTSCNLLAC : 108
 # # # # #
 HuCD11a : ALLSGFFFFVAPASSYNLDVRRGARSFSPPRAGRHFGRVLOVQCNRVVVGAPGEGNSTGSLYOCQSGTCHCLPVTILRGSNYTSKYLGMTLATDPTDGSILLAC : 111
 # # # # #
 MuCD11a : LLLGLQLQFAKAWSYNLDTRPTQSF-LAQAGRHFGRVLOVQCNRVVVGAPGEGNSTGSLYHCHPSSSCQPVHL-GSNHTSKYLGMTLATDAAKGSILLAC : 108
 # # # # #
 RaCD11a : AWSCLLPV--NAWSYNLDTRHAQSF-LTQAGRHFGRVLOVQCNRVVVGAPGEGNSTGSLYHCHPSSSCQPVHL-GSNHTSKYLGMTLATDAAKGSILLAC : 196
 # # # # #

CaCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYL I HENLRCPVLOGHFPGYQECIKGNVDLVFLFDGSMSLQQDEFKIVDFMKDVMKKSLSNSYQFAAVQFSTDFKTEFFFLDY : 208
 # # # # #
 BoCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYL I HENLRCPVLOGHFPGYQECIKGNVDLVFLFDGSMSLQQDEFKIVDFMKDVMKKSLSNSYQFAAVQFSTDFKTEFFFLDY : 208
 # # # # #
 OvCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYL I HENLRCPVLOGHFPGYQECIKGNVDLVFLFDGSMSLQQDEFKIVDFMKDVMKKSLSNSYQFAAVQFSTDFKTEFFFLDY : 208
 # # # # #
 HuCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYLFRQNLQCPMLQCRPGFQECIKGNVDLVFLFDGSMSLQDPDEFQKILDFMKDVMKKSLSNTSYQFAAVQFSTDFKTEFFFLDY : 211
 # # # # #
 MuCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYLFPQSLQCPMLQCRPGFQECIKGNVDLVFLFDGSMQSLDRKDFEKILEFMKDVMKKSLSNTSYQFAAVQFSTDFKTEFFFLDY : 208
 # # # # #
 RaCD11a : DPGLSRTCDQNTYLSGLCYLFSQSLQCPMLQCRPGFQECIKGNVDLVFLFDGSMQSLDKKDFEKIVDFMKDVMKKSLSNTSYQFAAVQFSTDFKTEFFFLDY : 296
 # # # # #

CaCD11a : N R Q - K D P D A L L A G V K H M R L L T N T F G A I N Y V A K E V F R Q E L G A R P D A T K V L I I I T D G E A T D E Q N I D A A K D I I R Y I I G I G K N F K I K E S Q E A L H Q F A S K P V E E F : 307
BoCD11a : I R Q - K D P D A L L A G V K H M R L L T N T F G A I N Y V A K E V F R P D L G A R P D A T K V L I I I T D G E A T D E H N I D A A K D I I R Y I I G I G K N F K I K E S Q E A L H Q F A S K P V E E F : 307
OvCD11a : N R Q - K D P D A L L A G V K H M R L L T N T F G A I N Y V A K E V F R Q E L G A R P D A T K V L I I I T D G E A T D E Q N I D A A K D I I R Y I I G I G K N F K I K E S Q E A L H Q F A S K P V E E F : 307
HuCD11a : V K R - K D P D A L L K H V K H M L L L T N T F G A I N Y V A T E V F R F E L G A R P D A T K V L I I I T D G E A T D S C N I D A A K D I I R Y I I G I G K H F Q I K E S Q E T L H K F A S K P A S E F : 310
MuCD11a : V K Q N K N P D V L L G S V Q P M F L L T N T F R A I N Y V V A H V F K E S G A R P D A T K V L I I I T D G E A S D K C N I S A A H D I I R Y I I G I G K H F V S V Q K Q K T L H I F A S E P V E E F : 308
RaCD11a : I K L N K N P D V L L G N V T P M F L L T N T F R A I N Y V V T H V F K E S G A R P D A T K V L I I I T D G E A S D N C N I D A A Q D I I R Y I I G I G K H F S T Q K Q E K L H I F A S K P V E E F : 396

CaCD11a : V K I L D T F E K L K D L F T E L Q K K I Y V I E G - - - - - T S K Q D L I S F N M E L S S S G I S A D L S E G H C V V G A V G A K D W A G G F L D L K A D L K S S T F V G N E P L T V E S R E G : 399
BoCD11a : V K I L D T F E K L K D L F T E L Q K K I Y V I E G - - - - - T S K Q D L I S F N M E L S S S G I S A D L S E G H C V V G A V G A K D W A G G F L D L K A D L K S S T F V G N E P L T V E S R A C : 399
OvCD11a : V K I L D T F E K L K D L F T E L Q K K I Y V I E G - - - - - T S K Q D L I S F N M E L S S S G I S A D L S E G H C V V G A V G A K D W A G G F L D L K A D L K S S T F V G N E P L T V E S R E G : 399
HuCD11a : V K I L D T F E K L K D L F T E L Q K K I Y V I E G - - - - - T S K Q D L I S F N M E L S S S G I S A D L S R G H A V V G A V G A K D W A G G F L D L K A D L O D D T F I C N E P L T P E V R A C : 402
MuCD11a : V K I L D T F E K L K D L F T D L Q R R I Y A T E G - - - - - I N R Q D L I S F N M E L S S S G I S A D L S K G H A V V G A V G A K D W A G G F L D I R E D L Q G A T F V G Q E P L T S D V R G C : 400
RaCD11a : V K I L D T F E K L K D L F T D L Q R K I Y A T E G E S R T L A A G T S K Q D L A S F N M E L S S S G I S A D L S K G H A V V G A V G A K D W A G G F L D I H E D L E G A T F V G Q E P L T S D E R G C : 496

CaCD11a : Y L G Y T V I T W L P S R G T M S L L A T G A P R Y Q H V G R V L L F Q Q P K R G C P W S Q I Q K I D C T I Q V G S Y F G G E L C G V D V D R D G E T E L L L I A A P L Y Y G E Q R G G R V F I Y Q K I Q L : 499
BoCD11a : Y L G Y T V I T W L P S R G T M S L L A T G A P R Y Q H V G R V L L F Q Q P K R G C P W S Q I Q E I D C T I Q I G S Y F G G E L C G V D V D R D G E T E L L L I A A P L Y Y G E Q R G G R V F I Y Q K I Q L : 499
OvCD11a : Y L G Y T V I T W L P S R G T M S L L A T G A P R Y Q H V G R V L L F Q Q P K R G C P W S Q I Q K I D C T I Q V G S Y F G G E L C G V D V D R D G E T E L L L I A A P L Y Y G E Q R G G R V F I Y Q K I Q L : 499
HuCD11a : Y L G Y T V I T W L P S R Q K T S L L A S G A P R Y Q H M G R V L L F Q E P Q G G H W S Q V Q T I H C T I Q I G S Y F G G E L C G V D V D O D G E T E L L L I G A P L F Y G E Q R G G R V F I Y Q R R Q L : 502
MuCD11a : Y L G Y T V A W M T S R S S R P L L A A G A P R Y Q H V G V L L F Q A P E A G C R W N Q T Q K I E C T I Q I G S Y F G G E L C S V D L O D G E A E L L L I G A P L F G E Q R G G R V F T Y Q R R Q S : 500
RaCD11a : Y L G Y T V A W L T S R S S R P L L A A G A P R Y Q H V G V L L F Q A P E A G C H W N Q T Q K I E C T I Q I G S Y F G G E L C S V D L H O D G E T D L L L I G A P L F Y G E Q R G G R V S V Y Q R R S : 596

CaCD11a : **G**E**Q****V****S****E****L****O****G****E****T****G****Y****P****L****G****R****F****G****A****A****I****A****A****L****T****D****I****N****G****D****E****L****T****D****V****A****V****G****A****P****L****E****E****Q****G****A****V****I****F****N****G****Q****Q****G****L****S****P****R****F****S****O****R****I****E****G****I****Q****M****F****S****G****I****Q****W****F****G****R****S****I****H****G****V****K****D****L****G****D****G****L****A****D****V****A****V****G** : 599

BoCD11a : **E****F****Q****V****S****E****L****O****G****E****T****G****Y****P****L****G****R****F****G****A****A****I****A****A****L****T****D****I****N****G****D****E****L****T****D****V****A****V****G****A****P****L****E****E****Q****G****A****V****I****F****N****G****Q****Q****G****L****S****P****R****F****S****O****R****I****E****G****I****Q****M****F****S****G****I****Q****W****F****G****R****S****I****H****G****V****K****D****L****G****D****G****L****A****D****V****A****V****G** : 599

OvCD11a : **G****E****Q****V****S****E****L****O****G****E****T****G****Y****P****L****G****R****F****G****A****A****I****A****A****L****T****D****I****N****G****D****E****L****T****D****V****A****V****G****A****P****L****E****D****Q****G****A****V****I****F****N****G****Q****Q****G****L****S****P****R****F****S****O****R****I****E****G****I****Q****M****F****S****G****I****Q****W****F****G****R****S****I****H****G****V****K****D****L****G****D****G****L****A****D****V****A****V****G** : 599

HuCD11a : **G****F****E****V****S****E****L****O****G****D****P****G****Y****P****L****G****R****F****G****E****A****I****T****A****L****T****D****I****N****G****D****G****L****V****D****V****A****V****G****A****P****L****E****E****Q****G****A****V****I****F****N****G****R****H****G****L****S****P****O****P****S****O****R****I****E****G****I****Q****V****L****S****G****I****Q****W****F****G****R****S****I****H****G****V****K****D****L****E****G****D****G****L****A****D****V****A****V****G** : 602

MuCD11a : **L****F****E****V****S****E****L****O****G****D****P****G****Y****P****L****G****R****F****G****A****A****T****A****L****T****D****I****N****G****D****R****L****T****D****V****A****V****G****A****P****L****E****E****Q****G****A****V****I****F****N****G****K****P****G****L****S****P****O****P****S****O****R****I****Q****C****A****O****V****F****P****G****I****R****W****F****G****R****S****I****H****G****V****K****D****L****G****D****R****L****A****N****V****V****G** : 600

RaCD11a : **L****F****E****V****S****E****L****O****G****D****P****G****Y****P****L****G****R****F****G****A****A****T****S****A****L****T****D****I****N****G****D****G****L****T****D****V****A****V****G****A****P****L****E****E****Q****G****A****V****I****F****N****G****K****P****G****G****F****S****S****C****S****S****O****R****I****P****G****I****O****V****S****P****G****V****R****W****F****G****R****S****I****H****G****V****K****D****L****G****D****R****L****A****D****V****V****G** : 696

CaCD11a : **A****E****G****Q****V****I****V****L****S****S****R****-****P****V****V****D****I****I****T****S****V****S****F****S****P****A****E****I****P****V****H****E****V****E****C****S****Y****S****T****S****N****Q****K****E****G****V****N****I****T****V****C****F****O****V****K****S****L****I****S****T****F****O****G****H****L****V****A****N****T****I****Y****T****L****Q****L****D****G****H****R****T****R****S****R****G****L****F****P****G****C****K****H****E****L****N****G****N****T****A****V** : 698

BoCD11a : **A****E****G****Q****V****I****V****L****S****S****R****-****P****V****V****D****I****I****T****S****V****S****F****S****P****A****E****I****P****V****H****E****V****E****C****S****Y****S****T****S****N****Q****K****E****G****V****N****L****T****V****C****F****O****V****K****S****L****I****S****T****F****O****G****H****L****V****A****N****T****I****Y****T****L****Q****L****D****G****H****R****T****R****S****R****G****L****F****P****G****C****K****H****K****L****I****G****N****T****A****V** : 698

OvCD11a : **A****E****G****Q****V****I****V****L****S****S****R****-****P****V****V****D****I****I****T****S****M****S****F****S****P****A****E****I****P****V****H****E****V****E****C****S****Y****S****T****S****N****Q****K****E****G****V****N****I****T****V****C****F****O****V****K****S****L****I****S****T****F****E****G****H****L****V****A****N****T****I****Y****T****L****Q****L****D****G****H****R****T****R****S****R****G****L****F****P****G****C****K****H****E****L****N****G****N****T****A****V** : 698

HuCD11a : **A****E****S****M****I****V****L****S****S****R****-****P****V****V****D****M****V****T****L****M****S****F****S****P****A****E****I****P****V****H****E****V****E****C****S****Y****S****T****S****N****K****M****K****E****G****V****N****I****T****I****C****F****O****I****K****S****L****Y****P****O****F****O****G****R****L****V****A****N****T****I****Y****T****L****Q****L****D****G****H****R****T****R****R****R****G****L****F****P****C****R****H****E****L****R****R****N****I****A****V** : 701

MuCD11a : **P****E****C****R****V****V****L****S****S****R****-****P****V****V****D****V****V****T****E****L****S****F****S****P****E****E****I****P****V****H****E****V****E****C****S****Y****S****A****R****E****E****Q****K****H****G****V****K****L****K****A****C****F****R****I****K****P****L****T****P****O****F****O****G****R****L****L****A****N****T****S****Y****T****L****Q****L****D****G****H****R****M****R****S****R****G****L****F****P****D****C****S****H****E****L****S****C****N****T****S****I** : 699

RaCD11a : **A****E****G****Q****V****I****V****L****R****A****I****I****P****D****C****G****L****L****T****S****T****G****I****V****-****D****E****I****P****V****H****E****V****E****C****S****Y****S****A****S****Q****E****C****K****E****G****V****K****L****K****V****C****F****O****I****R****P****L****T****S****O****F****O****G****R****L****L****A****N****T****S****Y****T****L****Q****L****D****G****H****R****T****R****S****R****G****L****F****P****C****S****R****E****L****G****N****T****S****V** : 795

CaCD11a : **I****S****V****K****S****C****F****M****F****W****F****H****F****P****-****I****C****I****Q****D****L****I****S****P****I****N****V****S****L****S****Y****S****L****W****E****E****E****C****I****P****R****D****P****R****A** : 742

BoCD11a : **I****P****V****K****S****C****F****V****F****W****F****H****F****P****-****I****C****I****Q****D****L****I****S****P****I****N****V****S****L****S****Y****S****L****W****E****E****E****C****I****P****R****D****P****R****A** : 742

OvCD11a : **I****S****V****K****S****C****F****M****F****W****F****H****F****P****-****I****C****I****Q****D****L****I****S****P****I****N****V****S****L****S****Y****S****L****W****E****E****E****C****I****P****R****D****P****R****A** : 742

HuCD11a : **I****T****S****M****S****C****T****D****F****S****F****H****F****P****-****V****C****V****Q****D****L****I****S****P****I****N****V****S****L****N****F****S****L****W****E****E****E****C****I****P****R****D****Q****R****A** : 745

MuCD11a : **I****P****D****K****S****C****L****D****F****H****F****H****F****P****-****I****C****I****Q****D****L****I****S****P****I****N****V****S****L****N****F****S****L****L****E****E****E****C****I****P****R****D****Q****K****-** : 742

RaCD11a : **I****P****D****K****S****C****M****D****F****H****F****H****F****P****V****R****Q****P****V****L****E****F****R****E****G****L****T****A****I****C****I****Q****D****L****I****S****P****I****N****V****S****L****N****F****S****L****L****E****E****E****C****S****P****R****D****Q****K****G****L****L****M****G****V****F****S****V****G****G****K****P****T****K****T****R****L****P****Y****S****A****F****C****D****G****N****K****Y****A****N****S****Q****V****I****K****K****G****S****S****G** : 895

```

CaCD11a : -----OGRDIPPILKPSPHLETKEIPFEKNCGEDKCEADLKLAFSDMRSKILHLTPSASLSVR : 801
BoCD11a : -----LDRDIPPILKPSPHLETKEIPFEKNCGEDKCEADLKLAFSDMRSKILRLTPSASLSVR : 801
OvCD11a : -----OGRDIQPILKPSPHLETKEIPFEKNCGEDKCEADLKLAFSDMRSKILHLTPSASLSVR : 801
HuCD11a : -----OGKDIPPILRPSLHSETWEIPFEKNCGEDKCEANLRVSFSPARSRALLRLTAFASLSVE : 804
MuCD11a : -----GRAMQPILRPSIHTVTKEIPFEKNCGEDKCEANLITS-SPARSGPLRLMSSASLAVE : 799
RaCD11a : LTSVVIVYDHQFCRFGLTGAYYAQDLLTLSTLSSLLRPQOGRDMQPILRPSIHAVTKEIPFEKNCGEDKCEADLAS-PPARSGVLRLMSSASLAVE : 994
# # # # #

CaCD11a : -----LILRNTAEDAYWOVTLSFPQGLSFRKVEALKPHSHVPVGCFELPEEAIQSRLSCNVSSPIFGADSMVDIQVMFNTLOKGSWGDLIKLHANVSCDNEN : 901
BoCD11a : -----LILRNTAEDAYWOVTLSFPQGLSFRKVEILKPHSHVPVGCFELPEEAVVHSRALSCNVSSPIFGEDSMVDIQVMFNTLOKGSWGDFILIQANVSCDNED : 901
OvCD11a : -----LILRNTAEDAYWOVTLSFPQGLSFRKVEALKPHSHVPVGCFELPEEAIQSRLSCNVSSPIFGADSMVDIQVMFNTLOKGSWGDLILIHANVSCDNEN : 901
HuCD11a : -----LSISNLEEDAYWQLDLHFPGLSFRKVEMLKPHSQIPVSCFELPEESRLISRALSCNVSSPIFKAGHSWALQMFNTLVNSWGDSVELHANVTCDNED : 904
MuCD11a : WILSNSGEDAYWRLDLDFPGLSFRKVEMLQPHSRMPVSCFELIESSLITKTLKCNVSSPIFKAGQEVSLQVMFNTLLNSWEDFVELNGTVHCENEN : 899
RaCD11a : WILRNLGEDAYWRLDLDFPGLSFRKVEMLQPHSQIPVSCFELIESSLITKTLKCNVSSPIFKAGKQMTLQVMFNTLLNSWGDFVELNGTVHCENEN : 1094
# # # # #

CaCD11a : -----SSLLEDNSATASIPVMYPINILKDOENSTLYINFTPKSPKIHVKHIYOVRIOPSNYD-NVPLEALVRVEVHSELITHRWSIQMEPPVNCSSRNLE : 1000
BoCD11a : -----SSLLEDNSATISIPVMYPINILKDOENSTLYISFTPKSPKIHVKHIYOVRIOPSNYD-NMPLEALVRVERVHSEGLITHKWSIQMEPPVNCSPRNLE : 1000
OvCD11a : -----SSLLEDNSATASIPVMYPINILKDOENSTLYISFTPKSPKIHVKHIYOVRIOPSNYD-NVPLEALVRVERVHSEGLITHRWSIQMEPPVNCSPRNLE : 1000
HuCD11a : -----SDLLEDNSATIIEILYPINILIQDOEDSTLYSFTPKGPKIHQVKHMYOVRIOPSIHDHNIETLEAVVGVEQPSEGPITHQWSVQMEPPVPCHYEDLE : 1004
MuCD11a : -----SSLQEDNSAATHIPVLYPVNILKEOENSTLYISFTPKGPKTQVQHVYOVRIOPSAYDHNMPLEALVGVERPHSEDLITYTSVQTDLVTCHSEDLK : 999
RaCD11a : -----SSLGKDNSATTRIPVLYPVNILIEDOENSTLYISFTPKGPKTQVQHIYKVRIOPSAYDHNMPLEALVEVEQPHSEGPIAHITWTVHT----- : 1182
# # # # #

```

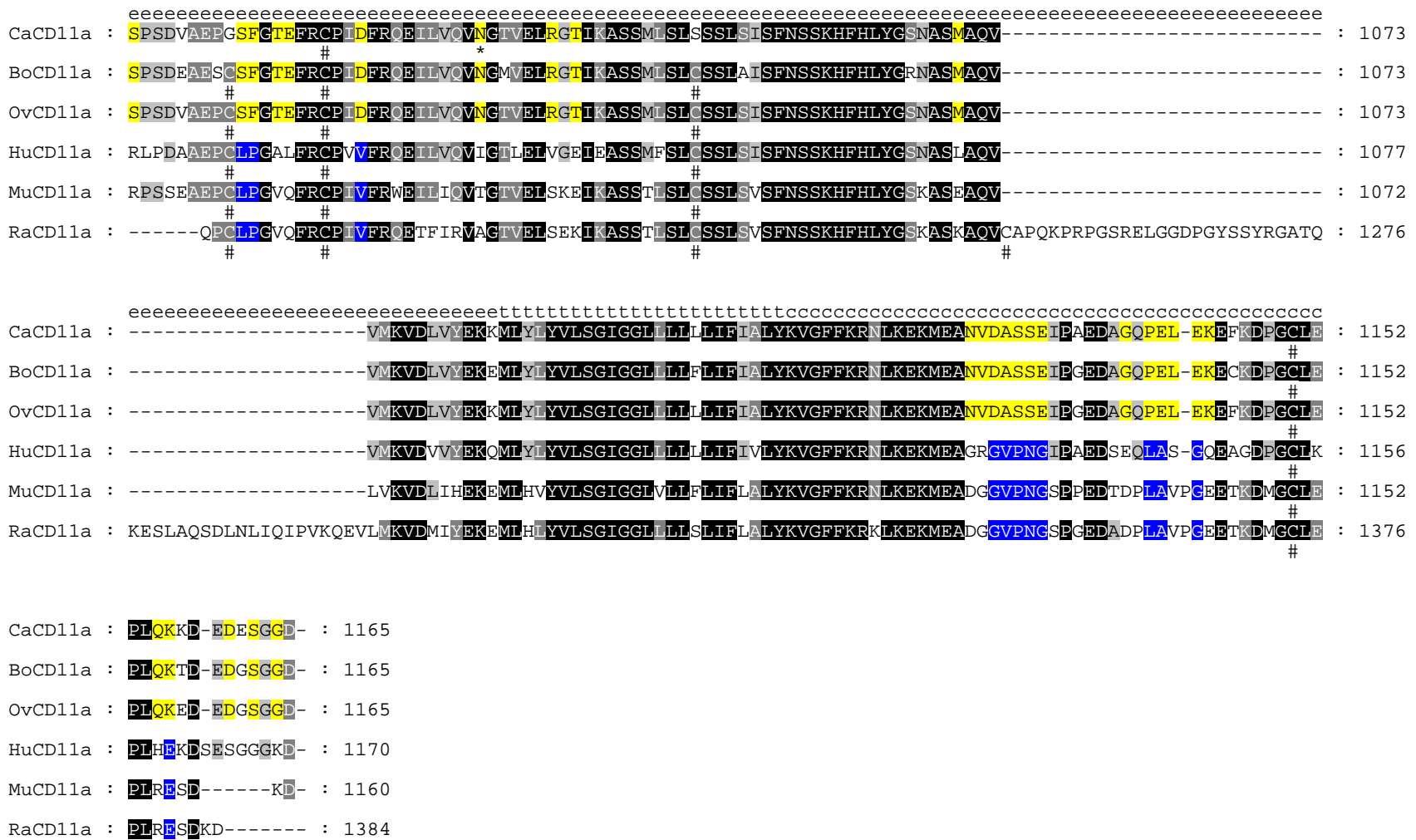


Figure 7 : Comparaison des séquences protéiques des CD11a caprin (ca), bovin (bo), ovin (ov), humain (hu), murin (mu) et de rat (ra). Les lettres sur la ligne supérieure identifient les blocs constitutifs : le peptide signal potentiel (s), le domaine extracellulaire (e), le I domain (i), le motif MIDAS (M), les motifs de liaison des cations divalents (d), la région transmembranaire (t) et la queue cytoplasmique (c). 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. Les résidus Cys conservés (#) et les sites potentiels de N-glycosylation (*) sont spécifiés sur la ligne inférieure. L'important résidu Glu-332 (+) et la Gln-743, qui est absente de l'allèle court (=), sont identifiés.

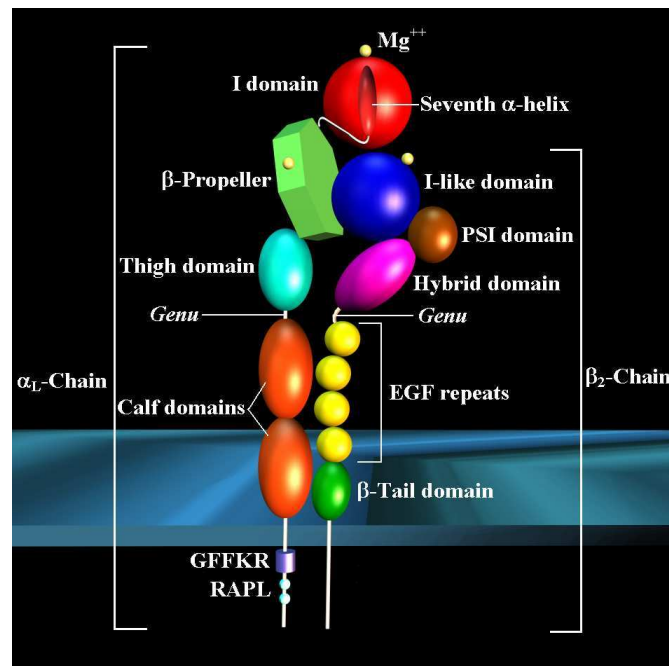


Figure 8 : Représentation schématique des domaines structuraux du récepteur LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$ ou CD11a/CD18). Les sous-unités CD11a et CD18 possèdent chacune un large domaine extracellulaire et de courtes portions transmembranaire et cytoplasmique. Chez le CD11a, le *I domain* (rouge) lie les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

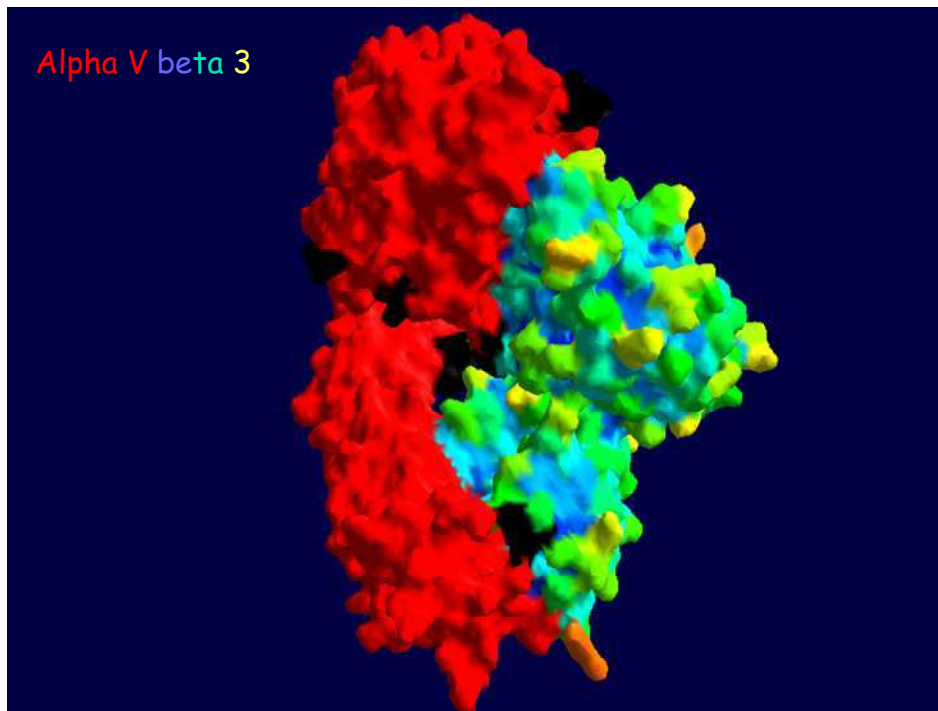


Figure 12 : Schéma de la structure tridimensionnelle de la portion extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ humaine. La sous-unité alpha est représentée en rouge et la sous-unité beta en diverses couleurs traduisant l'exposition des résidus (de bleu à rouge, en passant par le vert et le jaune, 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 (↔).

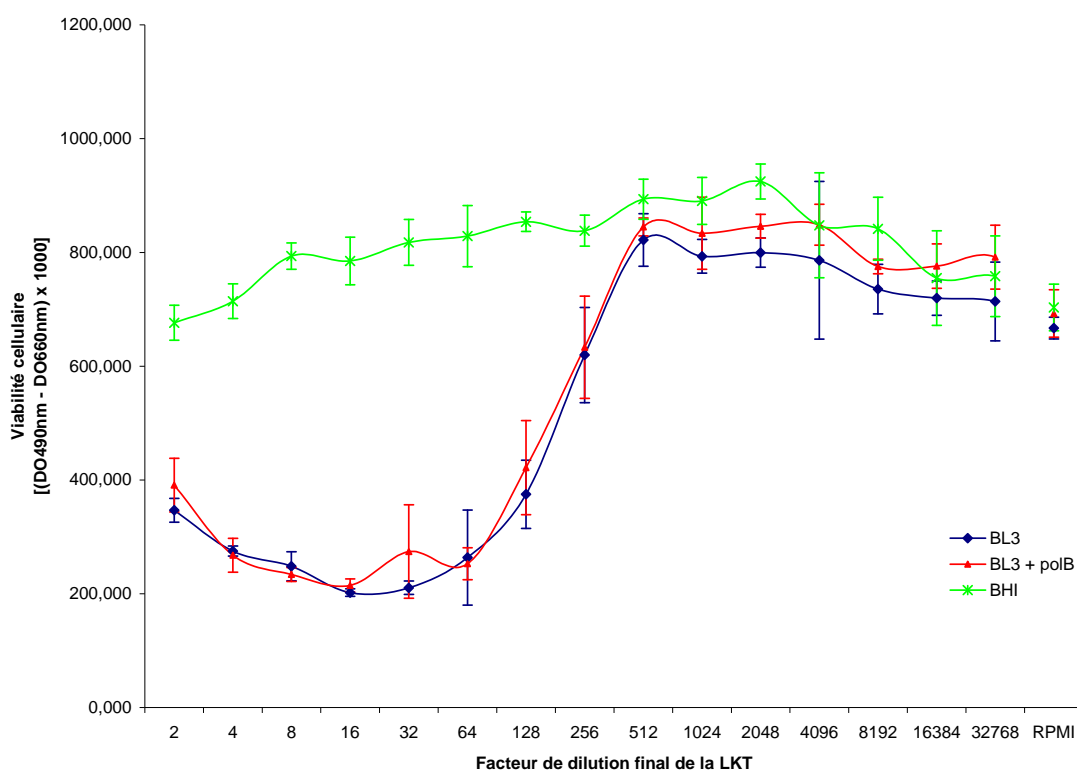


Figure 15 : Evaluation de la toxicité de la LKT mesurée par MTS. Le graphique présente la viabilité de la lignée lymphoblastique bovine BL-3 (mesurée par MTS) en réponse à l'ajout de LKT en dilution. L'effet du milieu de production de la LKT, le BHI, a été évalué, de même que l'impact de la polymyxine 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.

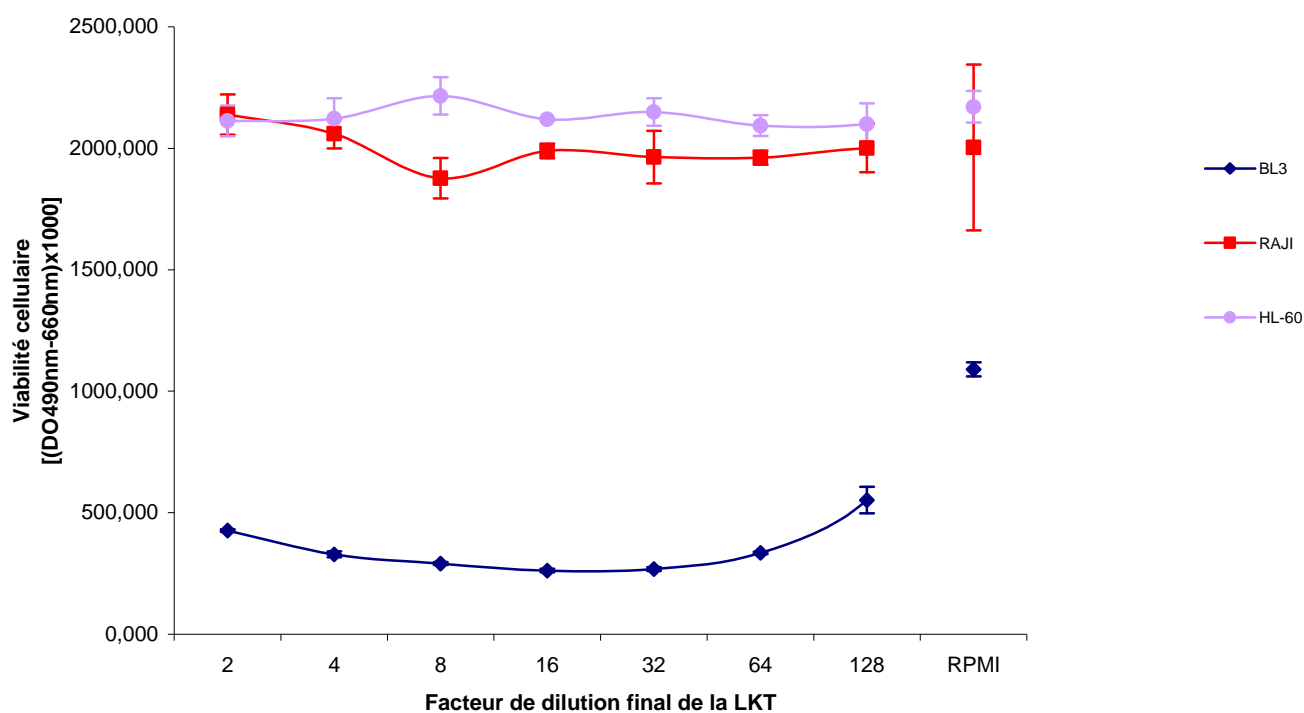


Figure 16 : Evaluation de la toxicité de la LKT mesurée par MTS. Le graphique présente la viabilité (mesurée par MTS) de plusieurs lignées cellulaires (BL-3, RAJI et HL-60) en réponse à l'ajout de LKT en dilution. Les données présentées sont représentatives de différentes expérimentations et correspondent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

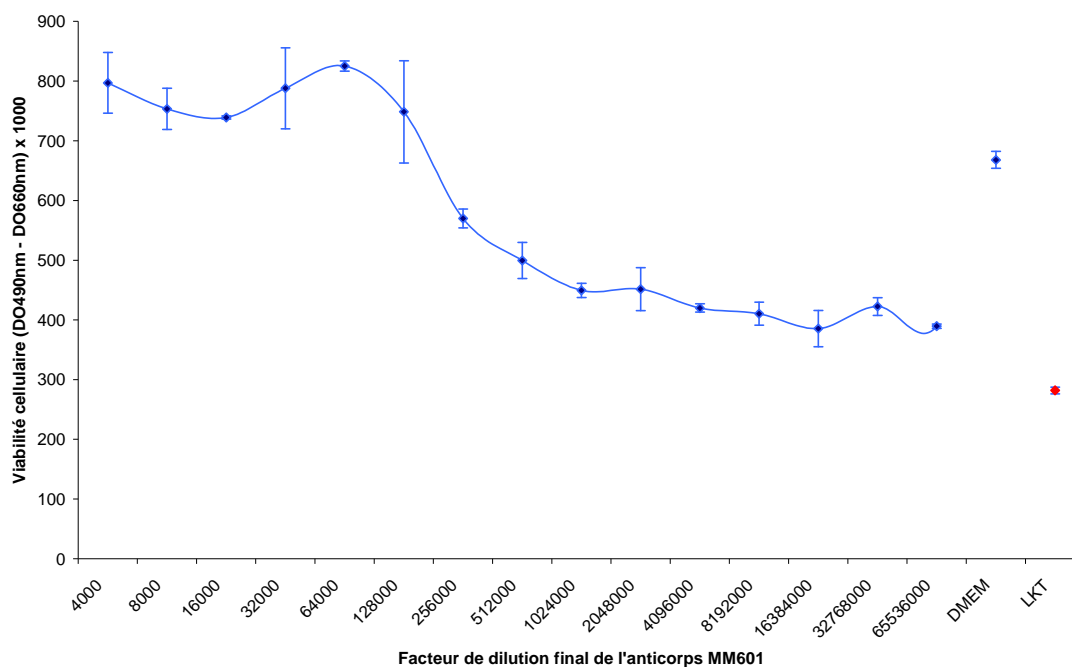


Figure 17 : Inhibition spécifique de la toxicité induite par la LKT sur les BL-3. Le graphique présente la viabilité de la lignée lymphoblastique d'origine bovine BL-3 (mesurée par MTS) en réponse à l'ajout de LKT diluée 16 fois et de dilutions croissantes de l'anticorps monoclonal inhibiteur de la LKT (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).

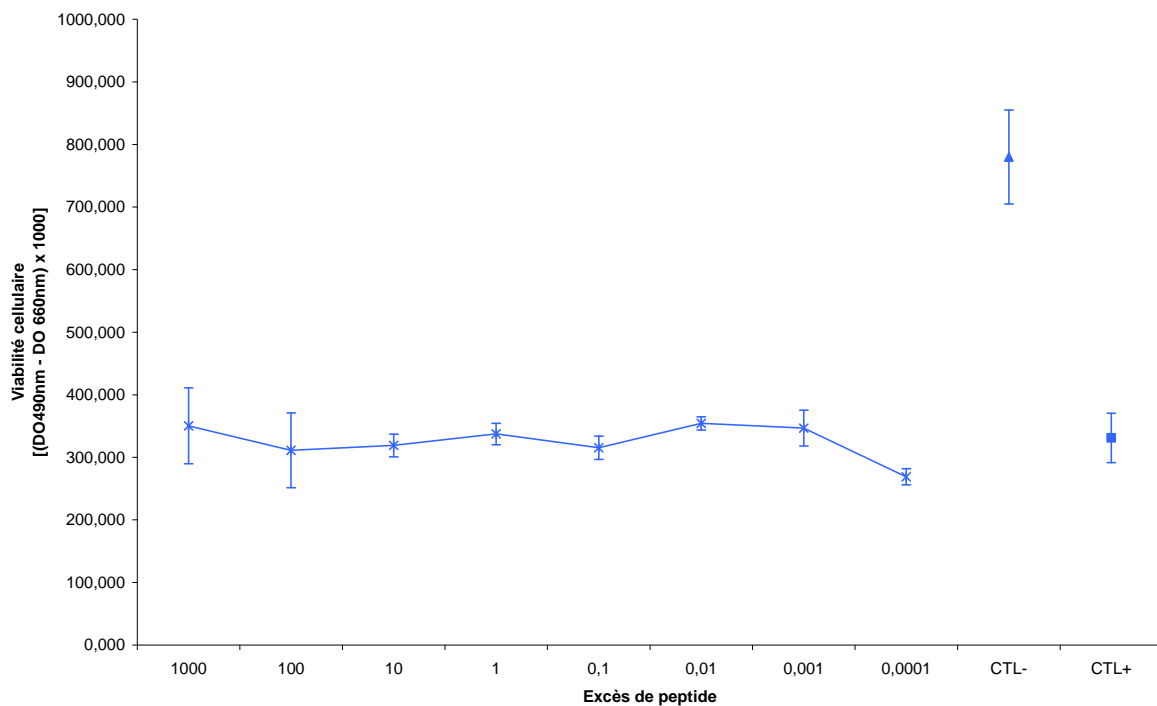


Figure 20 : Tentative d'inhibition de la toxicité induite par la LKT sur les BL-3 via une compétition avec un mélange de peptides dérivés de la séquence du CD18 bovin. Le graphique présente la viabilité de la lignée lymphoblastique d'origine bovine BL-3 (mesurée par MTS) en réponse à l'ajout de LKT diluée 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).

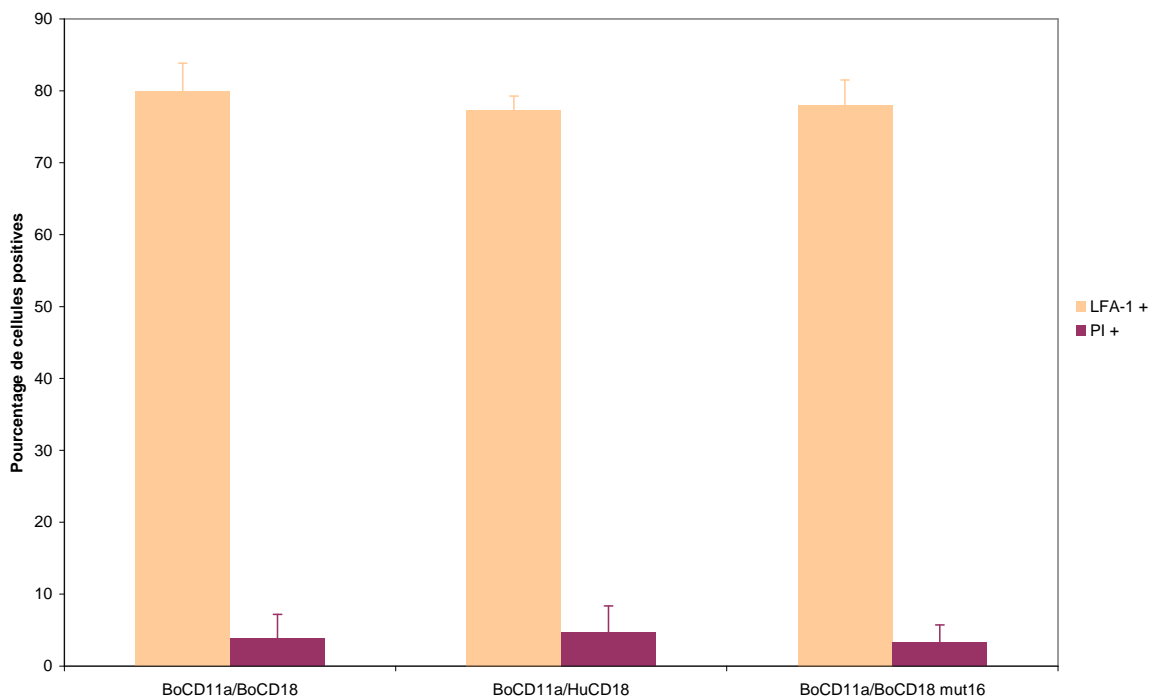


Figure 21 : Expression du LFA-1 bovin, de la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou du mutant 16 du LFA-1 bovin après transfection transitoire de cellules K-562. Le graphique présente le pourcentage de cellules K-562, mesuré par immunomarquage, exprimant le LFA-1 bovin, la chimère constituée 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.

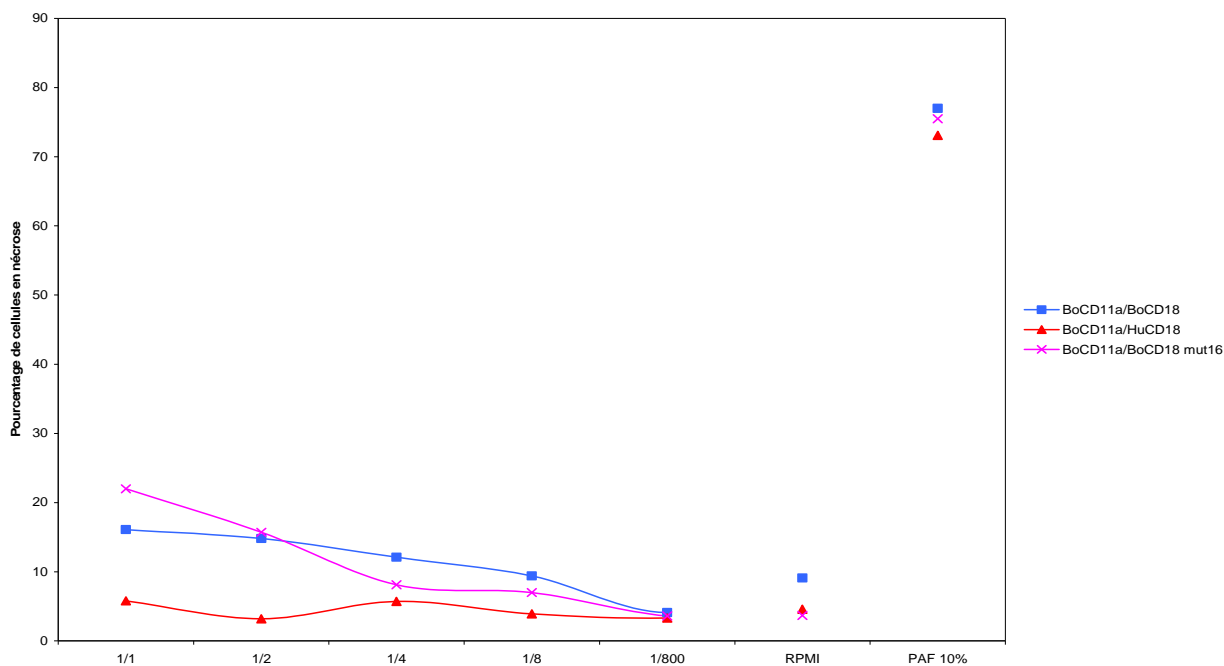


Figure 22 : Sensibilité à la leucotoxine de lignées K-562 exprimant de manière transitoire le LFA-1 bovin, la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou le mutant 16 du LFA-1 bovin. Le graphique présente la mortalité, mesurée par marquage à l'iodure de propidium, de lignées de K-562 exprimant 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).

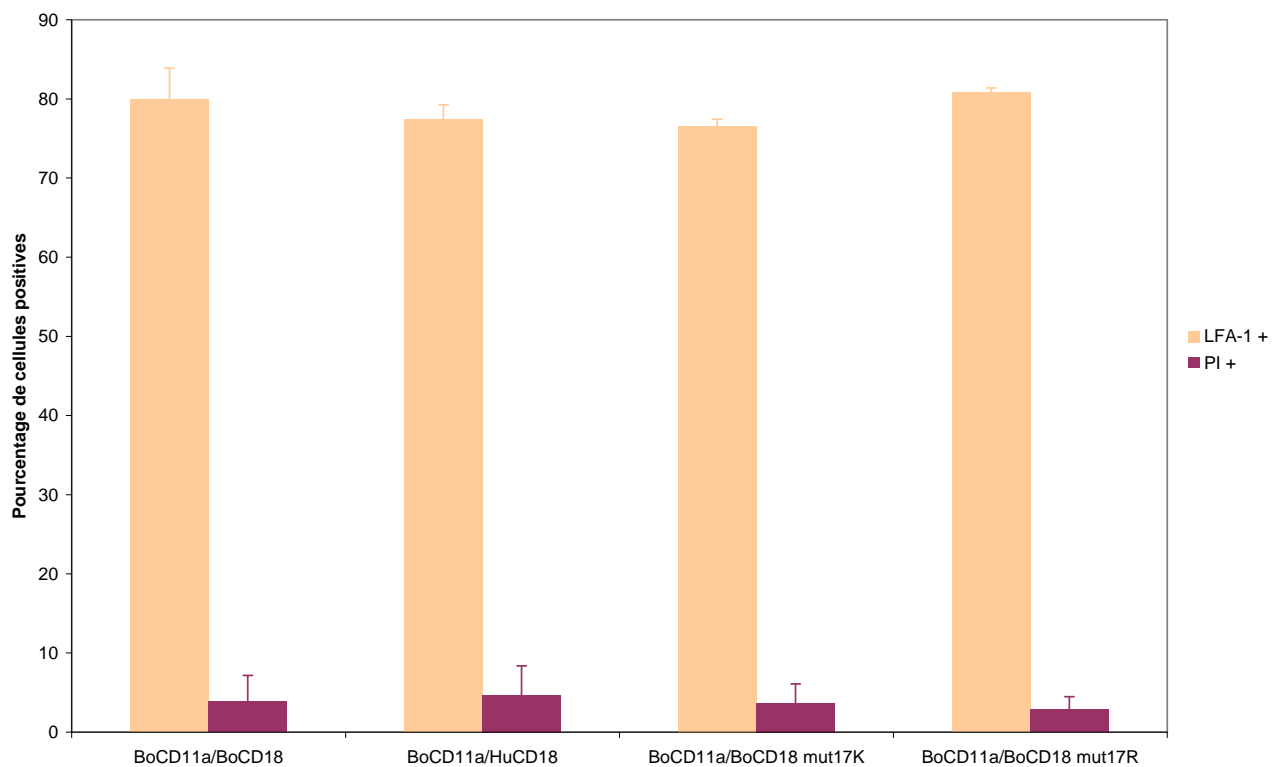


Figure 23 : Expression du LFA-1 bovin, de la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou des variants du mutant 17 du LFA-1 bovin après transfection transitoire de cellules K-562. Le graphique présente le pourcentage de cellules K-562, mesuré par immunomarquage, exprimant le LFA-1 bovin, la 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.

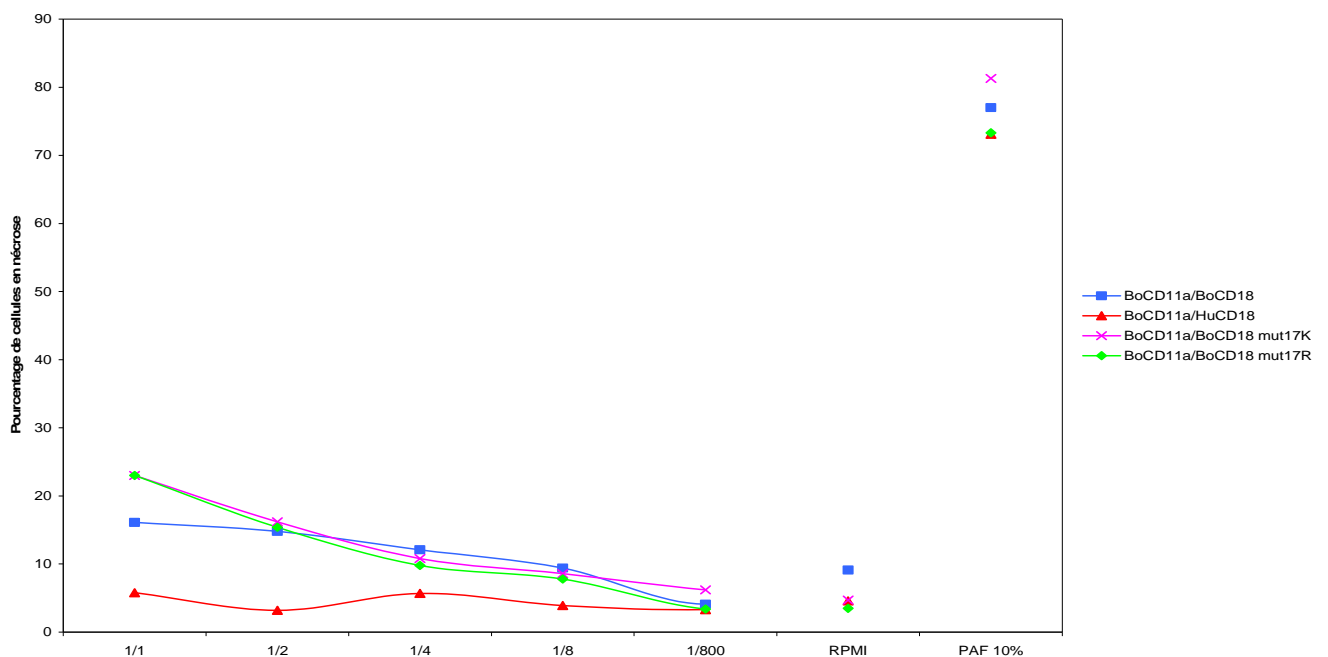


Figure 24 : Sensibilité à la leucotoxine de lignées K-562 exprimant de manière transitoire le LFA-1 bovin, la chimère constituée du CD11a bovin et du CD18 humain ou les deux variants du mutant 17 du LFA-1 bovin. Le graphique présente la mortalité, mesurée par marquage à l'iodure de propidium, de lignées 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.



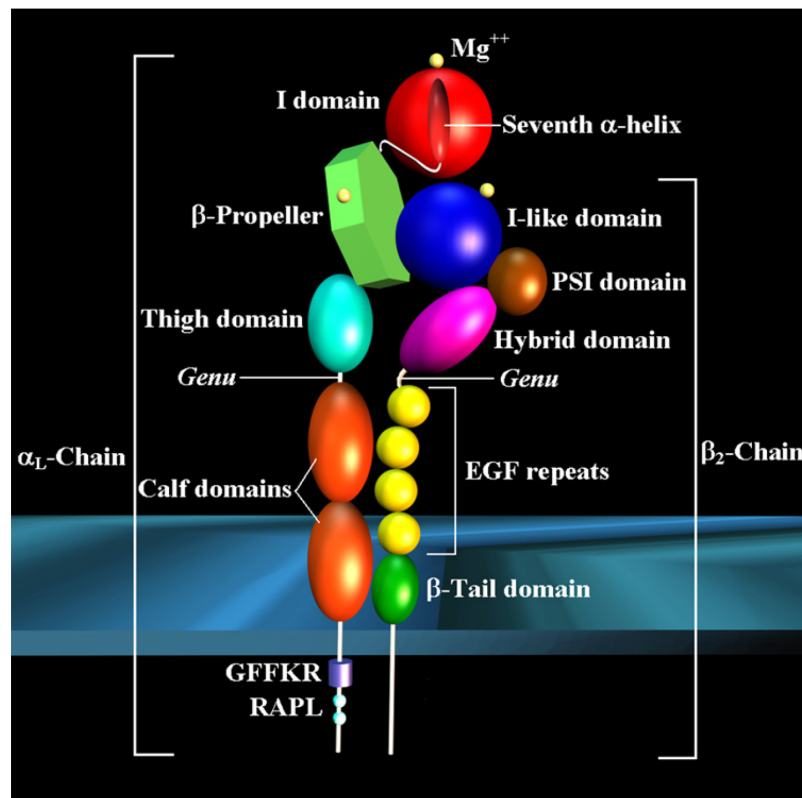


Fig. 1. Schematic representation of structural domains of LFA-1. The CD11a and CD18 subunits each possess a large extracellular domain and short transmembrane and cytoplasmic parts. In the CD11a subunit, the ligand-binding I domain (red) binds ICAMs in a manner that depends on the presence of a magnesium ion (light yellow) in the MIDAS. The seventh α -helix of the I domain links to the β -propeller region (green), that continues 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

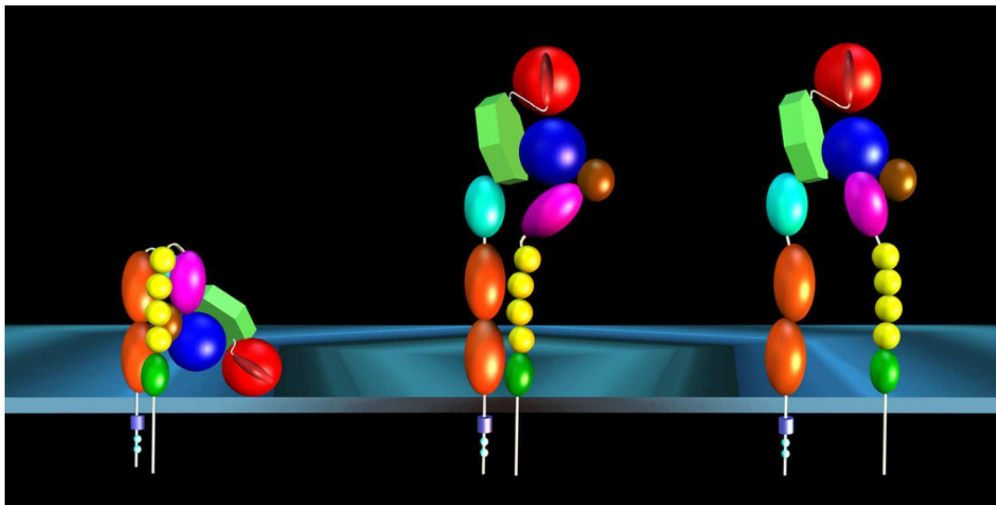


Fig. 2. Schematic representation of affinity regulation of LFA-1. Structural analyses has led to a general model in which conformational changes affecting integrin affinity occur after ligand binding or when triggered by inside-out signaling. In the low-affinity conformation (on the left), the stalk 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

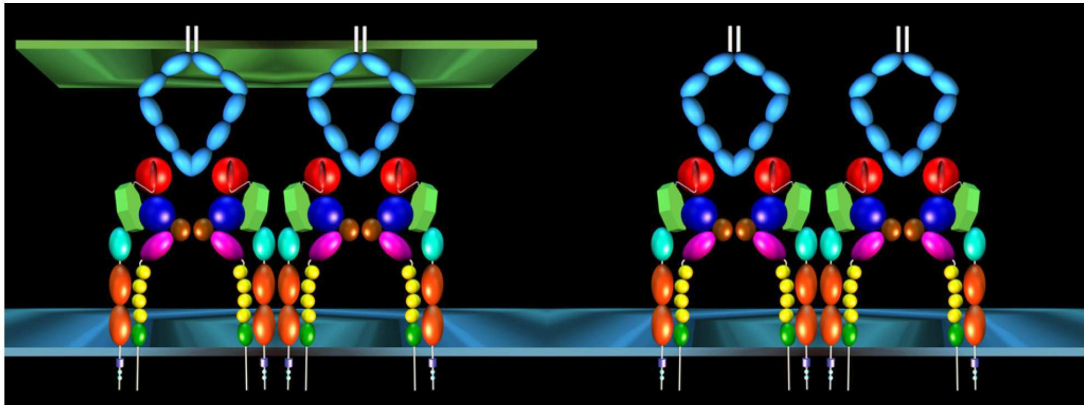


Fig. 3. Schematic representation of substrate-induced valency regulation of LFA-1. Clustering of integrins on the cell surface is induced by binding of membrane-bound (on the left) or soluble (on the right) multimeric ICAM-1 complexes. The picture was made with Ulead Cool 3D 3.5 and it should be noted 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

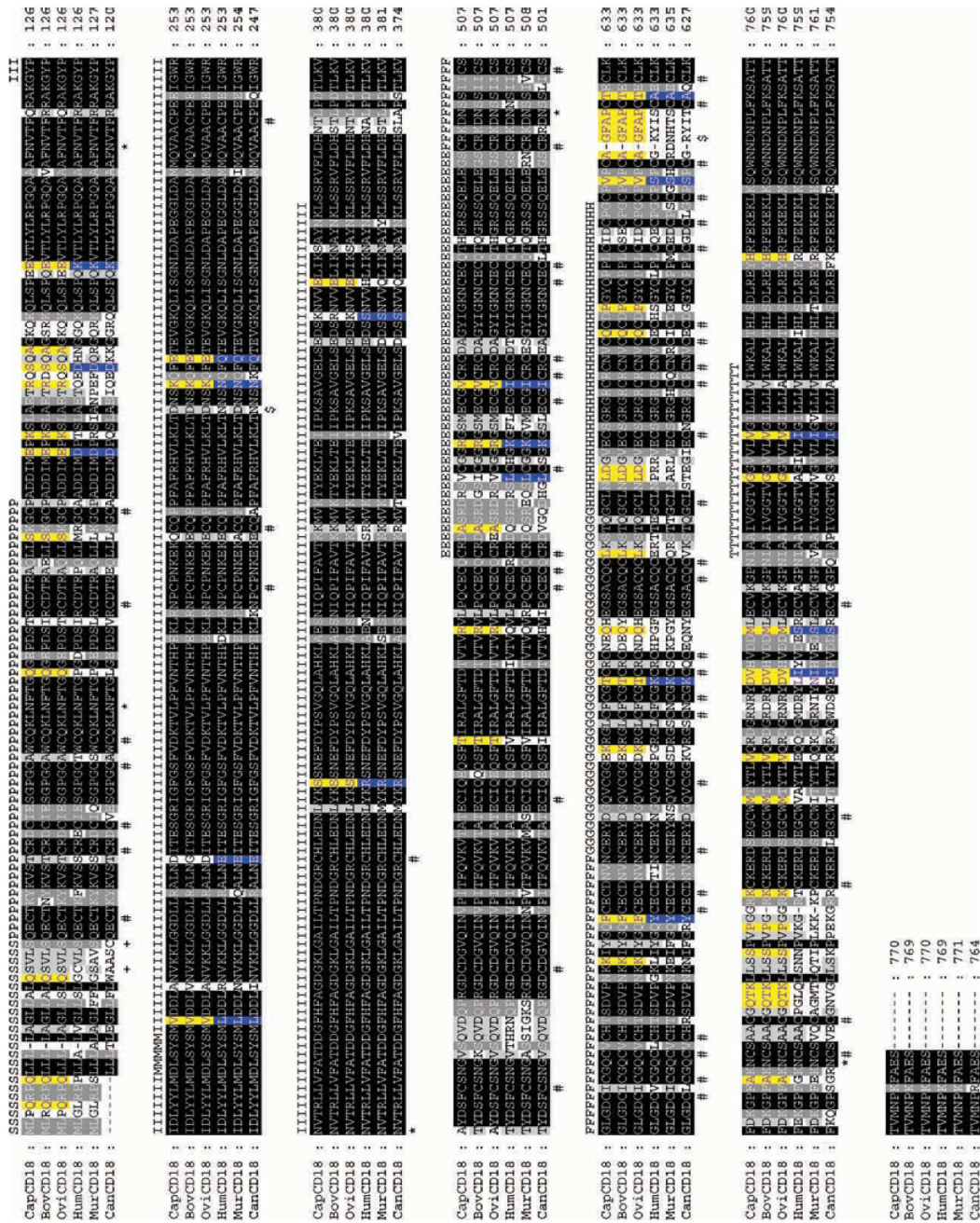


Figure 2. Comparison of the caprine (Cap-), bovine (Bov-), ovine (Ovi-), murine (Mur-) and canine (Can-) β_2 sub-units (CD18) amino acid sequences. The letters in the top row identify the constitutive blocks: putative signal peptide (S), plexin-semaphorin-integrin domain (P), I-like domain (I), MIDAS-like stretch (M), EGF domains 1 (E), 2 (F), 3 (G), 4 (H) and transmembrane region (T). Black, dark grey, light grey, yellow and blue columns represents identity among 6, 5, 4, ruminants and non-ruminants species, respectively. Conserved (*) and additional (+) cysteine residues, along with conserved (*) and additional (\$) potential N-glycosylation sites are marked at the bottom of the alignment.