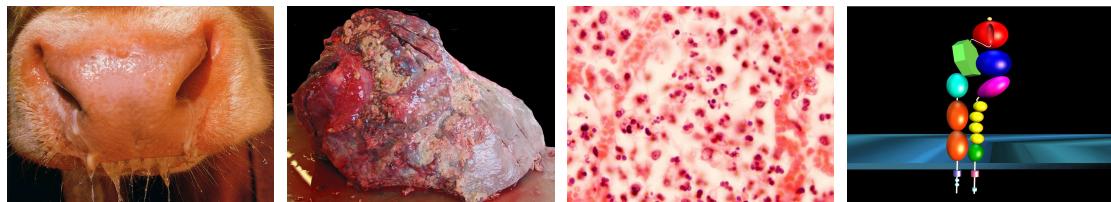




UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DE MORPHOLOGIE ET PATHOLOGIE
SECTEUR DE PATHOLOGIE SPECIALE

**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**



**Molecular dissection of the leukotoxin- β_2 -integrin LFA-1 (CD11a/CD18)
interaction, responsible for the *Mannheimia haemolytica*
species-specificity towards ruminants**

Laurent ZECCHINON

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES
ORIENTATION SANTE ET PRODUCTIONS ANIMALES**

ANNEE ACADEMIQUE 2006-2007

REMERCIEMENTS

L'expression de ses plus sincères remerciements, au terme d'un travail de recherche, reste pour le doctorant un moment intense et émouvant. Il se revoit ainsi aux premiers jours, errant dans les couloirs obscurs (de la Connaissance) et tentant d'expliquer l'inexplicable (ça a marché et ça ne marche plus). Il s'émerveille devant des choses qui restent anodines pour beaucoup (mais qu'y a-t-il de plus beau qu'un fragment d'ADN scintillant sous la lampe UV, surtout quand il présente la taille attendue ?) et s'enrichit au cours de discussions philosophico-politico-sportivo-scientifiques. Quelquefois (très rarement), son attention se détourne sur une jolie étudiante mais il ne se consacre réellement qu'à une seule maîtresse : la Science. Il brave tous les dangers (de la myocardite à la mononucléose) et relève tous les défis (trouver une place de parking, passer une commande via SAP, désactiver l'alarme...) pour finalementachever sa quête personnelle qui l'aura transformé à jamais.

Ainsi, pour m'avoir permis d'effectuer ce voyage initiatique en m'accueillant chaleureusement au sein d'un service où il fait bon travailler, je remercie tout particulièrement Messieurs les professeurs Freddy Coignoul et Daniel Desmecht. Ma plus profonde reconnaissance s'adresse à ce dernier, mon promoteur, qui a su m'encadrer tout en laissant s'exprimer ma personnalité. Son enthousiasme, son efficacité, sa disponibilité et sa gentillesse ont largement contribué à l'aboutissement de cette thèse.

Ce travail ne serait pas ce qu'il est sans l'importante contribution de Thomas Fett, mon fidèle compagnon (de travail !), le Jack Bauer de la biologie moléculaire, prince des RACE PCRs, duc des double-transfections, marquis des immunomarquages, comte de la cytométrie en flux, interlocuteur UDI, pilote chevronné (de la pipette multi-canaux), véritablement « hépatant » et aussi jovial qu'efficace.

Je salue également mes collègues de tous horizons, présents et passés, dont la sympathie et la bonne humeur remplissent de joie chacune de mes journées : Nicolas Antoine-Moussiaux (le cas pathologique typique de la passion des trypanosomes poussée à l'extrême), Etienne Baise (ses connaissances n'ont d'égales que sa gentillesse et sa disponibilité), Rui Pedro Bras Martins Faisca (le tour du monde en Twingo), Aurore Broers (formée par Anne, déformée par Thomas, une voix et le classement de la plus belle vache de France), Dao Bui Tran Anh (les mille et une fragrances culinaires du Vietnam), Dominique Cassart (qui est au bon goût ce que Rika Zaraï est à la médecine), Sandy Clauwaert (fente et braquemart n'ont plus de secrets pour elle), Karine Cloquette (ah, ce fameux à-fond saladier...), Anne et François Cornet (Brenda et Brandon, les faux jumeaux du*

service), Annabelle Decreux (la seule qui arrive à faire se déplacer José Remacle), Martin Dermine (alias La croquette, alias Petit scarabée, alias l'héritier Kennedy, alias Tintin, alias Love, alias Droopy sous valium, alias... ; même la CIA s'y perd !), Diane Drescher (ouf ! un round de selex sans contaminations), Thierry Flandre (vive le port du casque à vélo), Mutien-Marie Garigliany (Big Jim contre l'Influenza), Carine Garot (experte ès opérations diverses), Joël Gérardin (une distillation, un séquençage et un lancer de pingouin), Stéphanie Glineur (Grande prêtresse des Cadets d'Uccle et échangiste de thés exotiques), Adélite Habyarimana (le Wesley Snipes du service, partenaire privilégié des tatamis ainsi que des restaurants de Boncelles et d'ailleurs, grand philosophe des bizarries du comportement féminin et amateur de Leffe blonde devant l'Eternel), Johnny Hannaert (un veau sous un bras, un homard sous l'autre), Sylvain Hansen (le stagiaire idéal), Michel Jansen (l'Aldo Maccione de la Faculté, courant régulièrement dans le campus à l'affût d'une étudiante en détresse), Thierry Jauniaux (le vétérinaire de la mer et des bois du Sart-Tilman), Sandra Jolly (la Régine de la Liégeoise), Arnaud (on en a bavé pour ces foutus mutants !) et Patricia Lefèvre (l'alcool non, l'eau ferrugineuse oui), Michaël Leroy (si LINUX pouvait être un système de transfection...), Maria Licata (la descendante d'Assurancetourix), Mélanie Palm (la championne de la vaisselle moussante et de la gifle imparable), Soumya Pastoret (une touche d'exotisme namurois), Gregory Pire (le fils spirituel écolo de Jamel Debbouze et Fernand Raynaud), Michaël Sarlet (un p'tit lotto ?), Anne (le plein emploi et une patience à toute épreuve) et Cédric Thomas (quel plaisir d'aborder des sujets de fond avec quelqu'un d'aussi calme et serein), Vanessa Tomme (mais où est donc ce fichu centième échantillon ?), Philippe Vanden Bergh (le poste avancé du team β_2 -intégrine au Touquet), Nanny Wenzlow (non, je ne lui ai rien fait !) et Hussein Zezafoun (toujours partant pour une bière). Merci à tous d'avoir contribué, de près ou de loin, à ce travail.

Je tiens aussi à exprimer ma (demi-)gratitude à notre « sponsor », l'IRSIA, pour son financement. Dommage que d'obscures raisons aient amputé le projet de la moitié des crédits prévus.

Enfin, mes pensées s'envolent vers ma famille (tout particulièrement mes deux chéries) et mes amis qui m'ont toujours supporté, dans tous les sens du terme...

**Fente et braquemart : termes d'escrime, respectivement une action consistant à une détente de la jambe arrière combinée avec une projection de la jambe avant et une épée courte à double tranchant (XIV et XV^{ème} siècles). Je me demande encore pourquoi je suis numéro un à son classement des vieux pervers...*

*Il ne faut donner que la moitié de son esprit
aux choses de cette espèce que l'on croit,
et en réserver une autre moitié libre
où le contraire puisse être admis
s'il en est besoin.*

Fontenelle

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN(c)	acide désoxyribonucléique (complémentaire)
ARN	acide ribonucléique
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BHV-1	<i>bovine herpesvirus-1</i>
BLAD	<i>bovine leukocyte adhesion deficiency</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BLOSUM	<i>blocks substitution matrix</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BVD-MD	<i>bovine viral diarrhoea-mucosal disease</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DMSO	diméthylsulfoxyde
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FPLC	<i>fast polynucleotide liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
ICSI	<i>intracytoplasmic sperm injection</i>
IDAS	<i>I-domain allosteric site</i>
IPTG	isopropylthiogalactoside
JAM-A	<i>junctional adhesion molecule-A</i>
kDa	kiloDalton
LB agar	Luria Bertani agar
LB-SMGT	<i>linker based-sperm mediated gene transfer</i>
LCR	<i>locus control region</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LKT	<i>leukotoxin</i>
LPS	lipopolysaccharide
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MIDAS	<i>metal ion-dependent adhesion site</i>
MLCP	motif de liaison des cations potentiel
pb	paire de base

PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pi-3	<i>parainfluenza-3</i>
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
PSI	<i>plexine sémaphorine intégrine</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VIH-1	virus de l'immunodéficience humaine-1
VSV	<i>vesicular somatitis virus</i>

TABLE DES MATIERES

<u>PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION</u>	1
1. Contexte	2
1.1. Elevage et antibiotiques	2
1.2. Les pneumonies des bovins	2
2. La mannheimiose	3
2.1. <i>Mannheimia haemolytica</i>	3
2.2. Pathogénie	4
2.3. Facteurs de virulence	5
2.5. Rôle du LFA-1	6
3. Articles de synthèse	9
3.1. How <i>Mannheimia haemolytica</i> defeats host defence through a kiss of death mechanism	10
3.2. Anatomy of the lymphocyte function-associated antigen-1	34
3.3. Key roles of LFA-1 in leukocyte migration and immune response	58
3.4. LFA-1 and associated diseases: the dark side of a receptor	68
3.5. Bind another day: the LFA-1/ICAM-1 interaction as therapeutic target	84
<u>DEUXIEME PARTIE: CONTRIBUTION PERSONNELLE</u>	101
4. Objectifs des recherches	102
5. Caractérisation du récepteur LFA-1 des ruminants	104
5.1. Matériel et méthodes	104
5.1.1. Schéma général	104
5.1.2. Isolement des leucocytes	104
5.1.3. Extraction d'ARN	104
5.1.4. Obtention des extrémités de l'ADN complémentaire	105
5.1.5. Obtention de l'ADN complémentaire entier	106
5.1.6. Bioinformatique	108
5.2. La sous-unité CD11a	109
5.2.1. Description	109
5.2.2. Comparaison générale entre espèces	118
5.2.3. Comparaison entre ruminants et non-ruminants	120
5.3. La sous-unité CD18	123
5.3.1. Description	123
5.3.2. Comparaison générale entre espèces	128
5.3.3. Comparaison entre ruminants et non-ruminants	130
5.4. Conclusions	132
5.4.1. Le LFA-1 des ruminants	132
5.4.2. Rôles du CD11a et du CD18	133
5.4.3. Dans l'intimité de la liaison entre la leucotoxine et le CD18	134

6.	Production et validation fonctionnelle de la leucotoxine de <i>M. haemolytica</i>	137
6.1.	Matériel et méthodes	137
6.1.1.	Schéma général	137
6.1.2.	Culture bactérienne	137
6.1.3.	Purification	138
6.1.4.	Mise en évidence par électrophorèse	138
6.1.5.	Identification par Western blot	139
6.1.6.	Test de viabilité cellulaire (MTS)	139
6.1.7.	Test de compétition avec l'anticorps anti-LKT MM601	140
6.2.	Production et purification de la leucotoxine	141
6.2.1.	Choix de la souche et des conditions de culture	141
6.2.2.	Mise au point du protocole de purification	141
6.2.3.	Analyse du profil électrophorétique des fractions obtenues	142
6.2.4.	Identification de la leucotoxine par Western blot	143
6.3.	Evaluation de l'activité cytotoxique de la leucotoxine	144
6.3.1.	Test de viabilité cellulaire	144
6.3.2.	Spécificité cellulaire de la cytotoxicité de la LKT	145
6.4.	Inhibition de l'activité cytotoxique par un anticorps anti-leucotoxine	146
6.5.	Conclusion	147
7.	Vers la caractérisation du site de liaison de la leucotoxine de <i>M. haemolytica</i>	148
7.1.	Matériel et méthodes	148
7.1.1.	Schéma général	148
7.1.2.	Choix des peptides synthétiques	148
7.1.3.	Test de compétition par mesure de la viabilité cellulaire	150
7.1.4.	Mutagenèse dirigée du CD18 bovin	150
7.1.5.	Obtention de l'ADN complémentaire du CD18 humain	152
7.1.6.	Double-transfection transitoire de la lignée lymphoblastique K-562 en vue de l'expression de récepteurs LFA-1 bovins mutés	153
7.1.7.	Immunomarquage des lignées transfectées	153
7.1.8.	Test de mortalité cellulaire	154
7.2.	Tentative d'inhibition de l'activité cytotoxique de la leucotoxine par compétition avec des peptides synthétiques	154
7.3.	Etude de lignées lymphoblastiques exprimant de manière transitoire des récepteurs LFA-1 mutés	156
7.3.1.	Au niveau du domaine transmembranaire du CD18	156
7.3.2.	Au niveau du domaine cytoplasmique du CD18	158
7.4.	Conclusion	160
8.	Articles originaux	161
8.1.	The bovine (<i>Bos taurus</i>) CD11a-encoding cDNA : molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins	162
8.2.	Cloning and characterisation of the primary structure of the sheep lymphocyte function-associated antigen-1 α subunit	167
8.3.	Molecular characterisation of the caprine (<i>Capra hircus</i>) lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit-encoding cDNA	173
8.4.	Molecular cloning and characterisation of the CD18 partner in ovine (<i>Ovis aries</i>) β_2 -integrins	179
8.5.	Characterization of the caprine (<i>Capra hircus</i>) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of <i>Mannheimia haemolytica</i>	185

<i>TROISIEME PARTIE: DISCUSSION & PERSPECTIVES</i>	192
9. Spécificité du LFA-1 des ruminants	193
10. Le domaine sous-jacent à la virulence de la leucotoxine de <i>M. haemolytica</i>	194
11. Perspectives à court terme	195
12. Perspectives à long terme	195
12.1. Inventaire de la variation génétique spontanée du CD18	195
12.2. Chimiothérapie	196
12.2.1. Anticorps	196
12.2.2. Peptides	197
12.2.3. Peptidomimétiques	198
12.2.4. Inhibiteurs allostériques	200
12.3. Transgenèse	201
12.3.1. La transgenèse animale	201
12.3.2. Aspects techniques	202
12.3.3. Inconvénients de la transgenèse	205
13. Conclusion finale	207
<i>OUATRIEME PARTIE: REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	210

TITRE

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

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. Dans ce contexte, les auteurs sont unanimes pour considérer que l'agent pathogène compliquant principal, voire systématique, est *Mannheimia haemolytica*, une bactérie qui n'affecte que les ruminants. Parmi les différents facteurs de virulence incriminables, la culpabilité de la leucotoxine s'impose, notamment parce que, *ex vivo*, elle n'est capable d'induire la nécrose des leucocytes qu'à la condition *sine qua non* qu'ils soient d'origine bovine, ovine ou caprine. Au niveau moléculaire, cette spécificité est due à une interaction entre la leucotoxine et la β_2 -intégrine LFA-1, un récepteur constitué des sous-unités CD11a et CD18.

Les objectifs de notre projet étaient (i) d'identifier les différences systématiques qui distinguent les sous-unités CD11a et CD18 des ruminants de celles des autres espèces, (ii) de produire une leucotoxine pure et active, (iii) de cibler la sous-unité du récepteur responsable de la spécificité d'espèce qu'exhibe la leucotoxine de *M. haemolytica* envers les leucocytes des ruminants et (iv) plus particulièrement, d'identifier le motif moléculaire précis impliqué.

Nous avons d'abord cloné, séquencé et caractérisé les CD11a bovin, ovin et caprin, de même que les CD18 ovin et caprin, ce qui nous a permis de les contraster entre eux et avec certains de leurs homologues non ruminants, pour finalement mettre en évidence respectivement 58 et 17 sites de mutation potentiellement responsables de la virulence spécifique de *M. haemolytica* envers les ruminants. Nous avons ensuite mis au point un protocole de purification de la leucotoxine et vérifié la spécificité de son activité cytolytique *in vitro* via la réalisation de tests de cytotoxicité et de viabilité cellulaire sur diverses lignées réputées sensibles ou insensibles. Enfin, il est apparu au cours du travail que la sous-unité portant la spécificité de l'effet cytotoxique était le CD18. Nous avons alors évalué d'une part les 15 sites présents dans la région extracellulaire en tentant d'inhiber l'effet de la leucotoxine sur la lignée lymphoblastique bovine BL-3 par l'ajout de peptides dérivés de cette séquence et d'autre part les sites des portions transmembranaire et cytoplasmique en transfectant de manière transitoire la lignée lymphoblastique d'origine humaine K-562, qui n'exprime naturellement aucune β_2 -intégrine, avec les récepteurs LFA-1 mutants correspondants.

En conclusion, nous avons développé tous les outils nécessaires à l'identification précise du motif moléculaire du CD18 responsable de la spécificité d'espèce de *M. haemolytica* en excluant l'implication des sites des régions transmembranaire et cytoplasmique.

Les perspectives à court terme sont (i) d'évaluer par transfection transitoire les 15 sites répertoriés dans la région extracellulaire du CD18, (ii) de tester des LFA-1 bovins chimériques dont certains domaines spécifiques du CD18 auront été remplacés par leur correspondant humain et (iii) de vérifier le maintien de la capacité de margination et de diapédèse du ou des mutants/chimères sélectionnés. A plus long terme, nous espérons (i) disséminer dans la population bovine des animaux intrinsèquement résistants aux pneumonies bactériennes à *M. haemolytica* par introgression (si nous parvenons à mettre en évidence un allèle correspondant au(x) mutant(s) sélectionné(s)), ou par transgenèse et/ou (ii) élaborer un jeu de peptides compétiteurs du LFA-1 pour la fixation à la leucotoxine, c'est-à-dire qui seront inhibiteurs de son activité leucotoxique *in vitro* et de la virulence de *M. haemolytica* *in vivo*, le but étant 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.

MOTS-CLES

Ruminant, pneumonie, *Mannheimia haemolytica*, leucotoxine, LFA-1

TITLE

Molecular dissection of the leukotoxin- β_2 -integrin LFA-1 (CD11a/CD18) interaction, responsible for the *Mannheimia haemolytica* species-specificity towards ruminants

SUMMARY

Bacterial pneumonias represent the major problem in cattle breeding and fattening, with high morbidity and mortality levels. In this context, *Mannheimia haemolytica* plays a great role as a complicating agent in ruminant pleuropneumonias. Besides the several virulence factors incriminated, the leukotoxin is held responsible in restricting the disease to ruminants because it does not induce cytolysis of leukocytes from other species *ex vivo*. At the molecular level, this specificity is due to the tight interaction between leukotoxin and the β_2 -integrin LFA-1, a receptor made of CD11a and CD18 subunits.

The aims of this work were (i) to identify the systematic differences that distinguish ruminant CD11a and CD18 from their non-ruminant homologues, (ii) to produce an active and purified leukotoxin, (iii) to target the subunit displaying the ruminant-specificity of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin and (iv) to especially identify the concerned molecular motif.

First, we have cloned, sequenced and characterized bovine, ovine and caprine CD11a, as well as ovine and caprine CD18, providing the opportunity to contrast ruminant versus non-ruminant LFA-1. This analysis has finally led to the identification of respectively 58 and 17 potential mutation sites that could be the cause of the species-specific virulence of *M. haemolytica*. Afterwards, we have developed a purification protocol for leukotoxin and checked its specific cytotoxicity *in vitro* by cellular cytotoxicity and viability tests on several cell lines supposed to be sensitive or insensitive. At last, it appeared during the project that CD18 was necessary and sufficient to mediate the specificity of leukotoxin cytotoxicity. We have then evaluated (i) the extracellular region 15 sites by tempting to inhibit leukotoxin effect on bovine lymphoblastic BL-3 cell line with the addition of peptides mimicking this sequence and (ii) the transmembranous and cytoplasmic sites by transiently transfected human lymphoblastic K-562 cell line, that naturally express no β_2 -integrin, with corresponding mutated LFA-1 receptors.

To conclude, we have developed all the tools required to precisely identify the CD18 molecular motif responsible for *M. haemolytica* species-specificity and we have excluded the implication of transmembranous and cytoplasmic regions.

At short term, perspectives are (i) to evaluate by transient transfection the 15 CD18 extracellular region sites, (ii) to test chimeric bovine LFA-1 of which some specific domains would be substituted for by their human homologue and (iii) to check selected mutants or chimeras ability to

perform rolling and diapedesis. At longer term, we hope (i) to disseminate in bovine population animals that would become naturally resistant to *M. haemolytica* pneumonias by introgression (if we could find an allele corresponding to selected mutant(s)) or by transgenesis and/or to elaborate a panel of LFA-1 competing peptides for leukotoxin binding, i.e. that inhibit in vitro leukotoxic activity and in vivo *M. haemolytica* virulence, with the aim to propose an injectable therapeutic peptide that could be substituted to antibiotics, generating neither residues nor antibioresistance and working as a decoy for leukotoxin.

KEYWORDS

Ruminant, pneumonia, *Mannheimia haemolytica*, leukotoxin, LFA-1