

Première partie

INTRODUCTION

1. Contexte

1.1. Elevage et antibiotiques

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

Ces pratiques séculaires présentent malheureusement des inconvénients majeurs dont la prise de conscience est pourtant relativement récente: tout d'abord, la pression de sélection appliquée par l'Homme envers les animaux d'élevage s'exerce unilatéralement en faveur des critères relatifs aux productions alors que les bovins n'ont jamais été soumis à des pressions d'infection plus agressives qu'aujourd'hui. Ensuite, si le secteur des productions animales a jusqu'ici réagi en recourant à l'administration massive d'antibiotiques, on peut aisément comprendre que cela a pour conséquence la création d'une pression de sélection envers les bactéries qui ne peut aboutir qu'à l'émergence de maladies dues à la prépondérance de souches multirésistantes (Ferber, 2000 ; Angulo *et al.*, 2004 ; Molbak, 2004). Cette situation est particulièrement préoccupante dans notre pays puisque des études publiées récemment démontrent que la Belgique fait partie des sept pays européens qui consomment le plus d'antibiotiques (Goossens *et al.*, 2005; Ferech *et al.*, 2006).

1.2. Les pneumonies des bovins

Diminuer l'importance des maladies bovines est donc devenu une priorité absolue, puisque l'on sait que ce sont les coûts liés aux maladies qui ont l'impact le plus important sur la rentabilité des fermes et ce, indépendamment du cours du marché (Gardner *et al.*, 1996). Ces coûts sont, sans la moindre équivoque, surtout causés par les maladies respiratoires (Martin, 1981 ; Griffin *et al.*, 2000; Speer *et al.*, 2001).

Parmi celles-ci, ce sont les pneumonies qui exercent, de loin, l'impact le plus flagrant : quelles que soient les conditions, elles sont responsables d'environ 75% des maladies diagnostiquées (Jensen *et al.*, 1976; Roth, 1986; Edwards, 1996). Sur le plan de la morbidité, les taux moyens varient entre 15 et 45% (Kelly, 1986) et sur celui de la létalité, les pneumonies sont directement incriminées dans 45 à 55% des cas (Perino, 1992; Vogel et Parrott, 1994; Edwards, 1996). De son côté, la mise en œuvre

des traitements médicamenteux censés guérir les maladies respiratoires génère approximativement 8% des coûts de production totaux (Martin, 1981; Griffin *et al.*, 1995; Griffin, 1997), sans tenir compte des pertes encourues du fait de performances zootechniques (gain quotidien moyen, indice de consommation et production laitière) moindres. Par ailleurs, la race Blanc Bleu Belge, numéro un chez nous, se distingue des autres races bovines par des capacités pulmonaires et cardiaques largement inférieures à celles des autres bovins (Lekeux *et al.*, 1994). Ces déficits tant anatomiques que fonctionnels en font des animaux moins résistants en cas de maladie respiratoire avec une morbidité associée de 36%, soit 50% de plus que ce qui est observé dans le monde entier (Bureau *et al.*, 2001). De plus, la même enquête démontre que le taux de mortalité associé aux maladies respiratoires pendant la première année de vie vaut 2,1% en spéculation Blanc Bleu Belge alors qu'il n'est que de 1,4% dans les autres races (Muggli-Cockett *et al.*, 1992; Bureau *et al.*, 2001).

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

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

2. La mannheimiose

2.1. Mannheimia haemolytica

Mannheimia haemolytica est un coccobacille à gram négatif, faiblement hémolytique, dont la taxonomie complète est : super-royaume des bactéries ; phylum des protéobactéries ; classe des gammaprotéobactéries ; ordre des pasteurellales ; famille des pasteurellaceae ; genre *mannheimia* (The NCBI taxonomy browser, sans date). Elle changea, depuis sa découverte en 1885 par Théodore Kitt, plusieurs fois « d'identité » : baptisée *bacterium bipolare multocidum* (Kitt, 1885), on la connut ensuite un certain temps sous le nom de *Pasteurella bovisseptica* (Jones, 1921) avant d'être renommée

2.4. Les cibles chez l'hôte

La pathogénie de la mannheimiose implique les neutrophiles et les macrophages dont le rôle central a été démontré expérimentalement par plusieurs équipes indépendantes; ainsi, une exposition par aérosol à *M. haemolytica* induit, chez des veaux, une infiltration rapide de neutrophiles dans le poumon et une augmentation significative du ratio neutrophile/macrophage dans le liquide de lavage pulmonaire (Walker *et al.*, 1985). Par ailleurs, lorsque des bovins sont déplétés de leurs propres neutrophiles circulants par un traitement à l'hydroxyurée, la pneumonie est, et de très loin, moins sévère et moins étendue que chez l'animal normalement pourvu en neutrophiles (Slocombe *et al.*, 1985; Breider *et al.*, 1988 ; Weiss *et al.*, 1991). Ces données *a priori* paradoxales suggèrent que les neutrophiles endossent un rôle proactif dans la progression de la mannheimiose.

2.5. Rôle du LFA-1

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

Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui jouent un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire bien que leur reconnaissance en tant que récepteurs de surface ne date que de 1987 (Hynes, 1987). Depuis, elles ont été étudiées intensivement (plus de 35000 articles à ce jour) et semblent impliquées dans de nombreux processus biologiques, physiologiques et pathologiques. Toutes les intégrines sont des hétérodimères dont les sous-unités α et β sont associées non covalentiellement et possèdent chacune un domaine extracellulaire volumineux et des domaines transmembranaire et cytoplasmique plutôt courts (Hynes, 1992). Une vingtaine d'intégrines sont actuellement décrites ; elles sont classées en huit sous-familles selon leur sous-unité β commune (tableau I), par exemple la famille β_2 -intégrine dont la sous-unité β_2 est le CD18. Celle-ci s'associe avec les sous-unités α CD11a-d, formant ainsi les hétérodimères CD11a/CD18 ou LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) qui prédomine, CD11b/CD18 ou Mac-1, CD11c/CD18 ou CR4 et CD11d/CD18 (Berman *et al.*, 2003). Les récepteurs CD11a-d/CD18 sont présents à la surface de tous les leucocytes et médient une adhésion de haute affinité à une grande variété de types cellulaires qui expriment un ou plusieurs de leurs ligands, à savoir les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAMs). Cette sous-famille

Tableau I (non exhaustif): La famille des intégrines

Sous-unités		Ligands et contre-récepteurs	Expression
β1	α1	Collagènes, laminine	T*, B*, Mo
	α2	Collagènes, laminine	T*, NK, Mo, pl
	α3	Fibronectine, laminine, collagènes	Mo, Tc, LAK
	α4	Fibronectine (V25), VCAM-1	Mo, T*, B, CL, F
	α5	Fibronectine	T*, Mo
	α6	Laminine	T*, Mo, pl
	α7	Laminine	T, Mo
	α8	?	
	αV	Vibronectine, fibronectine (?)	
β2 (CD18)	αL ou CD11a	ICAM-1, ICAM-2	T, B, Mo, N, NK
	αM ou CD11b	Composant C3b du complément (inactivé), fibrinogène, facteur X, ICAM-1	Mo, NK
	αX ou CD11c	Fibrinogène, composant C3b du complément (inactivé) ?	NK, N
	CD11d	?	?
β3	αIIb	Fibrinogène, fibronectine, facteur de von Willebrand, vitronectine, thrombospondine	pl
	αV	Vitronectine, fibrinogène, fibronectine, facteur de von Willebrand, thrombospondine, fibronectine, ostéopontine, collagènes	B, Mo, pl, F
β4	α6	Laminine ?	T, Mo
β5	αV	Vitronectine	Mo
β6	αV	Fibronectine	L
β7	α4	Fibronectine (V25), VCAM-1	B
	αIEL	?	
β8	αV	?	

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

3. Articles de synthèse

3.1. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism

L. Zecchinon, T. Fett, D. Desmecht. Veterinary Research 36 (2): 133-156 (2005).

3.2. Anatomy of the lymphocyte function-associated antigen-1

L. Zecchinon, T. Fett, P. Vanden Bergh, D. Desmecht. Clinical and applied immunology reviews, 6: 149-172 (2006).

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

L. Zecchinon, T. Fett, P. Vanden Bergh, D. Desmecht. Clinical and applied immunology reviews, 6: 191-200 (2006).

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

L. Zecchinon, T. Fett, P. Vanden Bergh, D. Desmecht. Clinical and applied immunology reviews, 6: 201-216 (2006).

3.5. Bind another day: the LFA-1/ICAM-1 interaction as therapeutic target

L. Zecchinon, T. Fett, P. Vanden Bergh, D. Desmecht. Clinical and applied immunology reviews, 6: 173-189 (2006).

Vet. Res. 36 (2005) 133–156
 © INRA, EDP Sciences, 2005
 DOI: 10.1051/vetres:2004065

133

Review article

How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism

Laurent ZECCHINON, Thomas FETT, Daniel DESMECHT*

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

(Received 22 June 2004; accepted 6 October 2004)

Abstract – *Mannheimia haemolytica* induced pneumonias are only observed in goats, sheep and cattle. The bacterium produces several virulence factors, whose principal ones are lipopolysaccharide and leukotoxin. The latter is cytotoxic only for ruminant leukocytes, a phenomenon that is correlated with its ability to bind and interact with the ruminant β 2-integrin Lymphocyte Function-associated Antigen 1. This paper globally reviews all the information available on host-pathogen interactions underlying respiratory manheimiosis (formerly pasteurellosis), from the stable and the Petri dish to the biochemical cascade of events triggered by the leukotoxin inside ruminant leukocytes. One conclusion can be made: the most widespread cattle respiratory disease with the most important impact on beef production worldwide, is probably due to a tiny ruminant-specific focal variation in the CD18- and/or CD11a-expressing genes.

Mannheimia haemolytica / leukotoxin / β 2-integrin / ruminant

Table of contents

1. Introduction.....	134
2. Bovine pneumonias.....	134
3. <i>Mannheimia haemolytica</i>	134
3.1. Diversity.....	134
3.2. Antibiotic resistance.....	135
3.3. Pathogenesis.....	135
3.4. Clinical signs and lesions.....	136
3.5. Known host-pathogen interactions.....	136
4. Leukotoxin.....	137
4.1. The main virulence weapon.....	137
4.2. Production and activation.....	137
4.3. Gene organisation and transcriptional regulation.....	137
4.4. Natural diversity.....	138
5. The leukotoxin targets(s).....	138
5.1. Macrophages and neutrophils.....	138
5.2. β 2-integrins.....	139
5.3. Lymphocyte Function-associated Antigen 1.....	139

* Corresponding author: daniel.desmecht@ulg.ac.be

6. The lipopolysaccharide.....	140
7. Modes of action	141
7.1. Apoptosis/necrosis	141
7.2. Death pathways.....	141
7.3. Pore formation	146
7.4. Molecular synergies with other pathogens	147
8. Conclusion and perspective	147

1. INTRODUCTION

Man understood many centuries ago that it would be more valuable to breed rather than to hunt animals like cattle, sheep and goats but he quickly realised the difficulty in warranting good animal health. Several practices such as sanitary slaughtering, quarantining animals, importing restrictions, vaccination and medical treatments have been intended to control, if not eradicate, illnesses. In the same way, antibiotics are used to fight against pathogens that have found in highly concentrated breeding conditions a choice niche extremely favourable for the contagion. Nevertheless, it is now clearly established that prophylaxy and metaphylaxy create a selective pressure towards the emergence of resistant strains which in turn could lead to new pathologies [55].

2. BOVINE PNEUMONIAS

The decrease of animal diseases (and bovine diseases in particular) has thus become an absolute priority since it is well-known that medical cost has the main impact on farm profitability, independently of market prices [60]. These costs are unequivocally brought by respiratory diseases [65, 119, 157] since about 25% of the calves experience at least one episode of respiratory disease during the first year of life, with frequencies over six birth years ranging from 14 to 38%. The incidence of bovine respiratory diseases is greater in male calves than in female calves during both preweaning and feedlot periods [133].

On the morbidity level, pneumonias do exert, by far, the most severe impact: they are responsible for about 75% of clinically visible diseases [52, 85] with average respiratory morbidity rates ranging from 15 to 45% [95].

On the mortality level, pneumonias are directly incriminated in about 45 to 55% of the cases [52, 174].

On the production costs level, medical treatments generate about eight percent of total production costs, without making an allowance for losses due to lower zootechnical performances [65, 66].

The main biological causes of bovine pneumonias are (i) the lungworm *dictyocaulus viviparus*, (ii) the viruses – the Herpes Virus-1, the Respiratory Syncytial Virus, the Parainfluenza-3 virus, the Viral Diarrhea-Mucosal Disease, the adenovirus, the coronavirus and (iii) the bacteria – *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* and *Arcanobacterium pyogenes* [51, 86, 87, 111, 131, 189].

Most authors consider that, whatever the causative factor (environment, virus, parasite), the bacterium *M. haemolytica* is systematically found as a complicating agent. Consequently, we will further focus on this bacterium and the way it acts.

3. MANNHEIMIA HAEMOLYTICA

3.1. Diversity

Mannheimia haemolytica is a weakly hemolytic, gram-negative coccobacillus with the following complete taxonomy: superkingdom *Bacteria*; phylum *Proteobacteria*; class

Gammaproteobacteria; order *Pasteurellales*; family *Pasteurellaceae*; genus *Mannheimia* [166].

The bacterium has been the subject of extensive reclassification in the past: first called *Bacterium bipolare multocidum* by Theodore Kitt in 1885 [96], it was renamed *Pasteurella haemolytica* in 1932 [135] and classified into two biotypes, A and T, based on its ability to ferment arabinose and trehalose, respectively [154]. There were 13 A serotypes and four T serotypes identified [194], the latter being reclassified as *Pasteurella trehalosi* in 1990 [19, 155]. Nine years later, studies based on DNA-DNA hybridisations and 16S RNA sequencing led to renaming previous A serotypes (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 and A17) as *Mannheimia haemolytica* while the remaining A11 serotype became *M. glucosida* [7, 194]. The name *Mannheimia* was given in tribute to Walter Mannheim, a German biologist whose research has improved the understanding of the taxonomy of the *Pasteurellaceae* family [7].

From the twelve serotypes described, A1 and A2 are prevailing all over the world. A1 is known as the major causative agent of bovine mannheimiosis (formerly pasteurellosis, also known as the shipping fever), even if other serotypes like A6, A7, A9, A11 and A12 have also been reported [144]. A1 and A2 are both able to colonise the upper respiratory tract of cattle and sheep but they are often species-specific. So, healthy cattle frequently carry serotype A2 in their upper respiratory tract but following a stress or a coinfection, A1 quickly takes the place of A2 as the main serotype [58], probably by horizontal transfer from ill animals [70]. However, recent surveys have shown that serotype A6 is increasingly prevalent in the United Kingdom [49] and in the USA [3, 143] with about 30% of strains serotyped. Nevertheless, based on lipopolysaccharide profiles and outer membrane proteins within each serotype, it has been concluded that, apart from the nature

of their capsules, serotypes A1 and A6 are extremely similar [39, 130].

3.2. Antibiotic resistance

Due to the often ineffective immunoprophylactic measures taken, antimicrobials are used to a large extent for prophylaxy, metaphylaxy or growth-stimulation. Moreover, the delay of analysing isolates from ill animals in a diagnostic lab makes it difficult to choose a suitable antibiotic and that is why it is commonly required to start the therapy immediately. Consequently, the result is that *M. haemolytica* exhibit increasing resistance to a large number of antimicrobial agents [177].

Besides, isolates are investigated for their antimicrobial resistance properties in the national monitoring programmes of only five European countries: France, Germany, the United Kingdom, the Netherlands and Portugal [25, 94, 118]. Data obtained from Germany and France in 1997 illustrate that there is a high degree of variability among isolates originating from the same animal source and that resistance rates may also vary over time [94].

Molecular analysis has provided insight into the variety of resistance genes so far known to be present in *Mannheimia* isolates. Most of these resistance genes are associated with mobile genetic elements and can thus easily be exchanged between bacteria. The occurrence of these resistance genes in a wide range of bacteria implies that *Mannheimia* isolates have access to large gene pools within which an interchange of resistance genes takes place [94].

The most frequent resistances are found against beta-lactams, tetracyclines, sulfonamids and aminoglycosides [76, 94, 177]. A few resistance genes have already been cloned and sequenced [70].

3.3. Pathogenesis

Mannheimia haemolytica plays a major role as a secondary pathogen in the final

progression of severe pleuropneumonias in cattle, sheep and goats. Its pathogenesis involves many predisposing agents such as viruses (Parainfluenza virus 3, Bovine Herpes virus 1, Bovine Respiratory Syncytial virus), bacteria (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*), environment (excessive temperatures, change of feed, dust, ...) or stress associated to weaning, dehorning and shipping [51, 111, 189–191]. These factors seem to alter the upper respiratory tract epithelium allowing *M. haemolytica* to colonise it, escaping clearance, and to move from the nasopharynx to the lungs, leading to a broncho-alveolar kind of pneumonia which is accompanied by high morbidity [52, 85] and mortality [52, 174].

3.4. Clinical signs and lesions

The severity of the clinical signs can vary from unapparent to rapidly fatal disease but a few characteristic features could be mentioned: there is always some degree of depression and anorexia, fever as high as 42 °C, increased heart rate, a substantial weight loss and rhinitis resulting in a mucopurulent nasal discharge or a dry, encrusted muzzle. Increased lacrymation and a cough are often present. The respiratory rate increases in the early stages, followed by dyspnea of such severity as to cause oral breathing and expiratory grunting in some cases. Auscultation reveals increased vesicular and bronchial sounds anteroventrally, progressing to rales that are at first moist but later dry; pleuritic friction rubs may be heard. Calves may stand with elbows abducted and neck extended and diarrhea occurs in some animals [189].

Pulmonary lesions are lobar, anteroventrally distributed and are characterised by extensive infiltration of neutrophils (that fail to combat infection) [153, 175] and exudation of fibrin into airways and alveoli. In histological descriptions, the pleura was seldom mentioned, presumably because it did not differ from expectations suggested by the gross lesions of fibrinous exudation.

The interlobular septa are distended with gelatinous material and contain edema, fibrin, leukocytes, and distended lymphatics which are frequently thrombosed. The bronchi have normal walls although there may be some necrosis and desquamation of epithelial cells. They often contain the products of deeper inflammatory processes: necrotic debris, leukocytes, fibrin, etc. [51, 189]. The cut surface usually consists of several colours due to the changes described above, plus hemorrhage, infarction, necrosis and solidification of tissue; either in the acute, fluid, congestive stages of the disease process (red hepatisation) or in the subacute stages where exudates had become more purulent (grey hepatisation) [51]. The term consolidation is used more commonly today for such exudative changes. The smaller airways are inflamed, starting at the terminal bronchioles. The alveoli contain oedema, fibrin, and occasionally haemorrhages in variable proportions, but the more interesting aspects are the inflammatory cells (neutrophils and macrophages) and the areas of coagulation necrosis. These latter are multifocal and may involve whole or confluent lobules, but not whole lobes. The necrosis importance is in fact wrought by the cytolysis of many neutrophils and macrophages that pour a variety of toxic compounds (enzymes, histamine, prostaglandins, etc.) in situ which in turn aggravate pulmonary damage [51, 189].

3.5. Known host-pathogen interactions

Several virulence factors have been described for *M. haemolytica*: they include the capsule that plays a great role in adherence and invasion, outer membrane proteins that are important in eliciting the protective immune response, adhesins implicated in colonisation, the neuraminidase that reduces the viscosity of respiratory mucus and allows closer bacterial apposition to the cell surface, the lipopolysaccharide (LPS) and the leukotoxin (LKT).

These factors allow *M. haemolytica* to escape or exceed clearance and host defences,

to proliferate in the lung and to cytolysise alveolar macrophages and neutrophils, which further enhances the lung injuries [31, 91, 183].

The roles of the main actors of the illness, that is to say LKT, LPS, neutrophils and macrophages, will be further described below.

4. LEUKOTOXIN

4.1. The main virulence weapon

Leukotoxin appears to be the main virulence factor. Indeed, inactivation of *M. haemolytica* leukotoxin by a gene knock-out hardly causes any further pulmonary lesions although the wild-type and mutant strains were equally capable of colonising the upper respiratory tracts of the calves [165]. Moreover, necrosis of neutrophils can be reproduced in vitro with purified LKT [5, 34, 40, 46, 88, 89, 161, 162, 176]. Biologically, it is worth noting that even if LKT is able to bind leukocytes from various animal species, it is only cytotoxic for ruminant leukocytes, suggesting that the interaction specificity between LKT and ruminant leukocytes could be responsible for the ruminant-specificity of *M. haemolytica* [92, 149, 161]. Amongst leukocytes, macrophages are more resistant than neutrophils to the lytic effect of LKT, and alveolar macrophages from adult cattle are more resistant than alveolar macrophages from calves under 16 weeks of age [137].

4.2. Production and activation

The leukotoxin is a 102 kDa-protein which is secreted in the logarithmic-phase of growth. It belongs to the RTX (repeats in toxin) family of multidomain exotoxins, which includes amongst others the *Escherichia coli* hemolysin, *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysins, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin, *Pasteurella aerogenes* Pax toxin, *Bordetella pertussis*

adenyl cyclase hemolysin, *Actinobacillus equuli* hemolysin, *Actinobacillus suis* hemolysins and maybe a secreted protein from *Haemophilus paragallinarum* [16, 91, 126, 147, 180]. All these pore-forming toxins contain near the C-terminal ends of the protein highly conserved regions containing glycine-rich nonapeptide repeats, the number of which ranges from six (LKT in this case) to 41, and seems to be related to their mechanism of activation and secretion [32, 91, 110]. LKT is synthesised as an inactive form (proLKT) that needs acylation to become active. This process is thought to be necessary in order to remove charges from the toxin and to increase its hydrophobicity [159]. Following Westrop et al., a domain between amino acids 379 and 616 of LKT is required for recognition of the protoxin by the acylase and Lys-554 is a likely activation site [182], although it may not be the only one [140].

The study of biological effects induced by two genetically defined leukotoxin mutants has demonstrated that neither acylation nor the amino terminal 344 amino acids are required for LKT binding to the CD18 subunit of LFA-1, but are essential for LKT-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation, generation of reactive oxygen metabolites, production of IL-8 and cytolysis in target cells [167].

4.3. Gene organisation and transcriptional regulation

A four-gene polycistronic operon codes for the synthesis, the activation and the secretion of LKT: in the order of their genetic organisation, *lktC* is needed for LKT acylation and hence activation, *lktA* codes for LKT itself, and *lktB* and *lktD* code for proteins involved in secretion [71, 160]. Two kinds of transcripts are produced, the main of which (90%) is ~ 3.5 kb long and solely encodes for *lktCA*. Rarer transcripts span the entire four-gene cluster (~ 7.5 kb long) via antitermination within the *lktA-lktB* intergenic region [73, 160].

The promoter region appears to be complex and LKT expression is regulated at the transcriptional level by various *cis*- and *trans*-acting factors [70, 72, 73, 116, 160]. The operon promoter activity reaches its maximum during the early logarithmic phase of bacterial growth and declines as the cells enter late logarithmic and stationary phases [54], which is well-correlated with the maximum production of LKT [9, 14, 178]. LKT is produced and secreted into the culture supernatant by all of the *M. haemolytica* strains, although some strain-to-strain variation in the amount of produced or secreted leukotoxin could be observed [40].

Bacterial growth and LKT production are co-regulated by factors such as iron, temperature [117] and oxygen. The role of O₂ in the expression of LKT was studied by Uhlich et al. and it was demonstrated that FnrP, homologous to Fnr, the global transcriptional regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*, suppresses and increases LKT transcription respectively under aerobic and anaerobic conditions [171, 172]. Furthermore, similar results of anaerobic regulation of toxin production have been obtained with *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* [97]. At first sight, an increase in toxin production under anaerobic conditions seems astonishing for a respiratory pathogen. This could nevertheless appear as an evolutionary advantage since the lung lesions are anteroventrally distributed, a region which is known to be less oxygenated as the disease progresses. Thus, increasing lesions lead to less oxygenated areas; which in turn cause an increase in LKT production that amplify the disease.

4.4. Natural diversity

Robert Davies and his team have studied the *Mannheimia haemolytica* leukotoxin diversity in cattle and sheep. Sequence analysis of the *lktA* gene from 31 ovine and bovine strains has allowed the identification of eight main allelic variants. The substitution rates differ across the entire structural gene, suggesting a variation in the

degree of selection imposed on different segments of the protein [42]. In 2002, the study of polymorphism and molecular divergence of the entire leukotoxin operon in 23 bovine and ovine isolates of *M. haemolytica*, six strains of *Mannheimia glucosida* and three of *Pasteurella trehalosi* has confirmed the complex mosaic structure of the operon, suggesting that it has been derived from a series of inter- and intra-species horizontal DNA transfers between distinct lineages of *M. haemolytica*. The most conserved gene seems to be *lktD*, while *lktA* contains overall more substitutions than the other operon genes [43], even leading to leukotoxin diversity. For example, serotype A2 strains are associated with at least four different leukotoxin types (LktA2, LktA3, LktA8 and LktA10), whereas serotype A1, A5, A6, A8, A9 and A12 isolates are much less diverse and associated with very similar leukotoxins (LktA1.2 and LktA1.3) [40, 42]. Accordingly, Davies and Baillie have studied the effect of this amino acid diversity on leukotoxin cytotoxicity against bovine and ovine cell types [40], previously investigated on the basis of their genetic relationships [41]. Some leukotoxins associated with bovine (LktA1.1) and ovine (LktA1.2 and LktA1.3) strains differ in their cytotoxicity against the same cell type, i.e. against bovine or ovine neutrophils but overall, the leukotoxin structure and function are highly conserved in *M. haemolytica*. Therefore, the data support the hypothesis that the most likely advantage of the recombinational exchanges to the pathogen is the generation of antigenic variation which will provide an adaptive advantage against the host antibody response [40].

5. THE LEUKOTOXIN TARGETS(S)

5.1. Macrophages and neutrophils

The central role of macrophages and neutrophils in the development of fulminating pneumonic manheimiosis is well supported.

Experimental aerosol exposure to *M. haemolytica* induces rapid infiltration of neutrophils into the lung and a marked increase in the neutrophil/macrophage ratio in pulmonary lavage fluid of calves [175]. These changes correlate well with characteristic reported histologic features in which (i) small airways become plugged with purulent exudate [112] and (ii) clustered inflammatory cells with elongated or streaming nuclei, referred to as “oat cells”, are commonly found within inflamed alveoli [51]. Furthermore, there is reliable evidence indicating that mobilisation of neutrophils does not effectively fight infection but contributes to the development of lung lesions; as a matter of fact, neutrophil depletion prior to inoculation with *M. haemolytica* protected calves from the development of gross fibrinopurulent pneumonic lesions [153, 179], although less severe inflammatory changes still occurred [20]. Thus, the host-pathogen interaction centrally involved is between LKT and polymorphonuclear leukocytes (PMN) and the neutrophil-mediated inflammatory response itself appears to be a major determinant of *M. haemolytica* pathogenesis.

5.2. β 2-integrins

Another amazing observation has led to set a hypothesis concerning the nature of the interaction between LKT and ruminant neutrophils: LKT do not induce leukocyte cytolysis from BLAD animals, an acronym designating the genetic illness called Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, which is characterised by a deficit in PMN trafficking. This shortage significantly decreases, nay, abolishes their ability to self-extract from the bloodstream by diapedesis, resulting in the recurrent apparition of infectious disorders in these animals.

At the molecular level, the BLAD phenotype is due to the D128G mutation in the CD18 beta subunit of β 2-integrins which results in a very important decrease of their membrane expression [151, 152]. Indeed, this family of integrins is precisely respon-

sible for the leukocyte fixation at the endothelium surface – the initial step of diapedesis – through their interaction with intercellular adhesion molecules (ICAM). Therefore, the resistance exhibited by BLAD neutrophils towards LKT suggests that β 2-integrins are the ruminants Achille heel for *M. haemolytica*'s LKT.

5.3. Lymphocyte Function-associated Antigen 1

Integrins are transmembrane receptors that play an important role in cellular adhesion even if their recognition as a surface receptor family only dates back to 1987 [81]. Since, they were extensively studied (more than 26 000 articles to date) and appear to be implicated in many biological, physiological and pathological processes. All integrins consist of a 120 to 180 kDa alpha subunit and a 90 to 110 kDa beta subunit that are non-covalently associated single-pass transmembrane proteins [158]. The bulk of each integrin subunit is extracellular, where it typically functions as a receptor for extracellular matrix molecules or as a counterreceptor for surface proteins of apposed cells [82]. Approximately 20 integrins are described to date, which are classified into eight sub-families, named according to their beta subunit, for example β 2-integrins. CD18 is the constant beta-subunit of the β 2-integrin family. It is found associated with CD11a-d alpha-subunits, leading to the heterodimers CD11a/CD18 or LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) that predominates, CD11b/CD18 or Mac-1, CD11c/CD18 or CR4 and CD11d/CD18 [15, 168]. The CD11a-d/CD18 heterodimers are expressed on all leukocytes and mediate high affinity adhesion to a variety of cell types that express one or more of the β 2-integrin ligands, the intercellular adhesion molecules (ICAM-1 to -5) [8, 59, 129, 168].

The expression level of β 2-integrins is regulated by several factors, including mediators of inflammation, cytokines (interleukins-1 and -4, interferon α and tumour

necrosis factor- β) and the formation of Fc-g-receptor complexes. For example, phorbol myristate acetate (PMA), a mimetic of diacylglycerol that activates the protein kinase C [50, 132, 136], increases the expression of LFA-1 from normal bovines but not from BLAD animals, because the mutant CD18 is no more able to bind any CD11. These findings indicate that the expression of CD18 by bovine neutrophils is a dynamic system, capable of rapidly responding to inflammatory stimuli by increasing surface expression of CD18 [33, 62].

In the context of the interaction between LKT and ruminant β 2-integrins, several studies have demonstrated that when bovine leukocytes are incubated with antibodies directed against CD11a or CD18, the cytotoxic effect of LKT is decreased, nay, abolished. These data suggest that the binding of LKT on ruminant LFA-1 is liable for the virulence specificity of *M. haemolytica* against ruminants. The precise identification of the subunit that binds LKT appears controversial [88], even if CD18 seems probable [5, 46, 109]. Fortunately, the recent cloning, sequencing and characterisation of the *Bos taurus* CD11a [56] will give the first opportunity to express homologous and heterologous LFA-1 in vitro to definitely answer the question.

6. THE LIPOPOLYSACCHARIDE

Bacterial lipopolysaccharides (LPS), derived from gram-negative microorganisms, typically consist of a hydrophobic domain known as lipid A (or endotoxin), a non-repeating "core" oligosaccharide and a distal polysaccharide (or O-antigen) [145].

The presence of LPS in RTX toxin preparations, as well as the harsh conditions required to remove it, suggests that LPS may complex with RTX toxins. More, concentrated culture supernatant preparations of *M. haemolytica* contain LKT and LPS as the most prominent components, with an LPS/LKT molar ratio around 60:1. Com-

plexes result in enhanced and stabilised leukolytic activity [100, 108]. It could then be postulated that the reproduction of disease in vitro with purified LKT would not be attributed to LKT alone. This statement can be disproved since (i) purified LKT is generally preincubated with the LPS inhibitor polymyxin B and (ii) LPS could be quantified with the *Limulus* amoebocyte lysate test.

Furthermore, a recent study has indicated an association between the incidence and severity of ovine pneumonic manheimiosis and the LPS chemotype, suggesting an important role for the LPS chemotype in determining host-species susceptibility to lung infection [75]. Indeed, the LPS chemotype varies both between and within serotypes of *M. haemolytica* and is predominantly smooth in bovine isolates and rough in ovine isolates [4, 39, 98].

The LPS receptors and signal pathways in mononuclear phagocytes have been reviewed by Chen et al.; many investigators have reported that binding of LPS to many cell types is nonsaturable. Many other studies have on the other hand provided evidence for a role of receptors as potential targets in LPS stimulation [27]. For example, it is amazing to know that β 2-integrins have been described as transmembrane signalling receptors for LPS [83, 185]. It has furthermore been concluded that CD18 molecules are not essential for cellular responses to LPS [186].

Some experiments have shown that LPS complexes with an LPS-binding acute phase protein that is rapidly synthesised in vivo following an inflammatory response. This protein, termed LPS binding protein (LBP), binds with high affinity to all chemotypes of LPS via lipid A [169, 170]. Complexes of LPS and LBP interact with human monocytes via specific binding to the CD14 molecule [187]. It has, however, been shown that LPS can activate mononuclear phagocytes in the absence of LBP, leading to the conclusion that the CD14-dependent pathway may not be unique for LPS interaction with

and stimulation of macrophages and monocytes.

Most types of lipid A bind a membrane-spanning receptor identified as toll-like receptor 4 (TLR4) present on macrophages and endothelial animal cells via an interaction that involves other proteins, including LBP, CD14 and MD-2 [2, 77, 124, 141, 148, 150]. In macrophages, lipid A activation triggers the biosynthesis of diverse mediators of inflammation such as TNF- α and IL-1 β [17, 48] and activates the production of costimulatory molecules required for the adaptative immune response [124, 125], events that are desirable for clearing local infections. The reader who wants to know more about LPS endotoxin is invited to read the complete review of Raetz and Whitfield [145].

Several transmembrane signalling mechanisms appear to be involved in LPS-induced activation of alveolar macrophages [27, 163, 173, 188]. We will further describe those involved in *M. haemolytica*'s pathogenesis.

7. MODES OF ACTION

7.1. Apoptosis/necrosis

Low and high concentrations of LKT induce respectively apoptosis and cell lysis in bovine leukocytes. The ability of low LKT concentrations to induce apoptosis in host leukocytes may allow bacteria to escape host immune surveillance by destroying the actors of innate response (macrophages and neutrophils) and enhancing the inflammatory process. At higher concentrations, the apoptotic mechanisms would be exceeded and necrosis occurs, leading to lung lesions. Nevertheless, it is not really easy to distinguish the effects caused by LKT and LPS since it is likely that they could act separately or together (when they form complexes) via common or distinct pathways that act as a complex network, transmitting many messages inside and outside the cell, controlling cell life and leading to cell lysis [34, 162].

Table I. Main biological effects triggered by LKT and LPS in leukocytes. LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen-1; LKT: leukotoxin; LPS: lipopolysaccharide; NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B.

Biological effects	LKT	LPS
LFA-1 synthesis	•	
NF- κ B activation and cytokines release	•	•
Intracellular calcium elevation	•	•
Release of arachidonic acid metabolites	•	

However, activation of bovine neutrophils by *M. haemolytica* leads in bulk to elevation of intracellular calcium [139], oxidative burst [114] and production of several lipid mediators [30, 69] and proinflammatory cytokines [193] (Tab. I).

7.2. Death pathways

Upon binding to LFA-1, LKT induces tyrosine (Y735) phosphorylation of the CD18 tail via a nonreceptor tyrosine kinase (NRTK) signalling cascade involving PI3-kinase and Src kinases in bovine (Figs. 1 to 4), but not in porcine leukocytes (LKT binds to porcine LFA-1 without eliciting any effects). This binding is known to involve G proteins [79, 90] and to cause, in a dose dependent way, sustained elevation in intracellular calcium in bovine leukocytes [36, 89, 139] that results mainly from an incoming flux from the extracellular medium via voltage-gated channels (Fig. 2) [61, 79, 80, 139]. This calcium entrance is clearly involved in cytolysis [61] and is essential for triggering the NF- κ B translocation into the nucleus (detectable after five minutes of exposure), as well as the production of proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-8, since calcium chelation blocks both phenomena (Fig. 1) [80, 99, 192, 193]. It should be noted that NF- κ B is known to be exploited by some pathogens [164] and that its activation and calcium elevation by LKT have only been observed

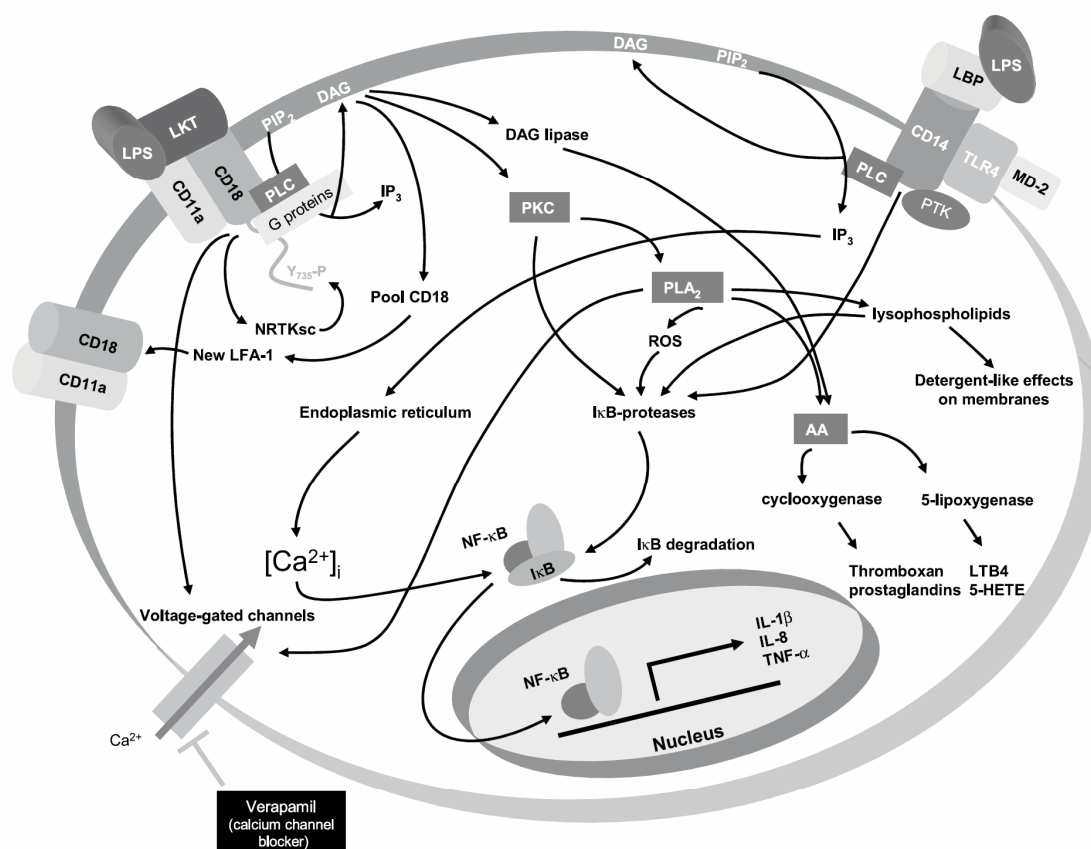


Figure 1. Leukocyte signalling pathways triggered by LKT and LPS. AA: arachidonic acid; DAG: diacylglycerol; 5-HETE: 5-hydroxy-eicosatetraenoic acid; IκB: Inhibitor kappa B; IL-1β: interleukin-1 beta; IL-8: interleukin-8; IP₃: inositol triphosphate; LBP: LPS binding protein; LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen-1; LKT: leukotoxin; LPS: lipopolysaccharide; LTB₄: leukotriene B₄; NF-κB: Nuclear Factor-kappa B; NRTKsc: nonreceptor tyrosine kinase signalling cascade; PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLA₂: phospholipase A₂; PLC: phospholipase C; PKC: protein kinase C; PTK: protein tyrosine kinase; ROS: reactive oxygen species; TNF-α: Tumour Necrosis Factor-alpha; TLR4: toll-like receptor 4.

in bovine alveolar macrophages (BAMs) but not in porcine alveolar macrophages (PAMs) or bovine pulmonary artery endothelial cells (BPAECs), suggesting cell-type and species-specific activation mechanisms. On the other hand, LPS effects are demonstrable in BAMs, PAMs and BPAECs [80]. On the contrary to LKT, LPS induces at very low concentrations (1 to 10 ng/mL) an elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in the absence of extracellular Ca^{2+} , suggesting a release from intracellular stores (Fig. 2). The requirement of an LPS binding protein (LBP)-CD14-cou-

pled signalling mechanism involving tyrosine phosphorylation through a non Gi-Go coupled activation of PLC activation seems to be necessary, even if the role of other G proteins cannot be ruled out [79].

The expression of proinflammatory cytokine genes is differentially regulated by tyrosine kinase-dependent and -independent pathways in BAMs in response to LKT and LPS, since tyrosine kinase inhibitor herbimycin A blocks the expression of TNF-α, IL-1β and IL-8 genes in BAMs stimulated with LKT, while only the expression

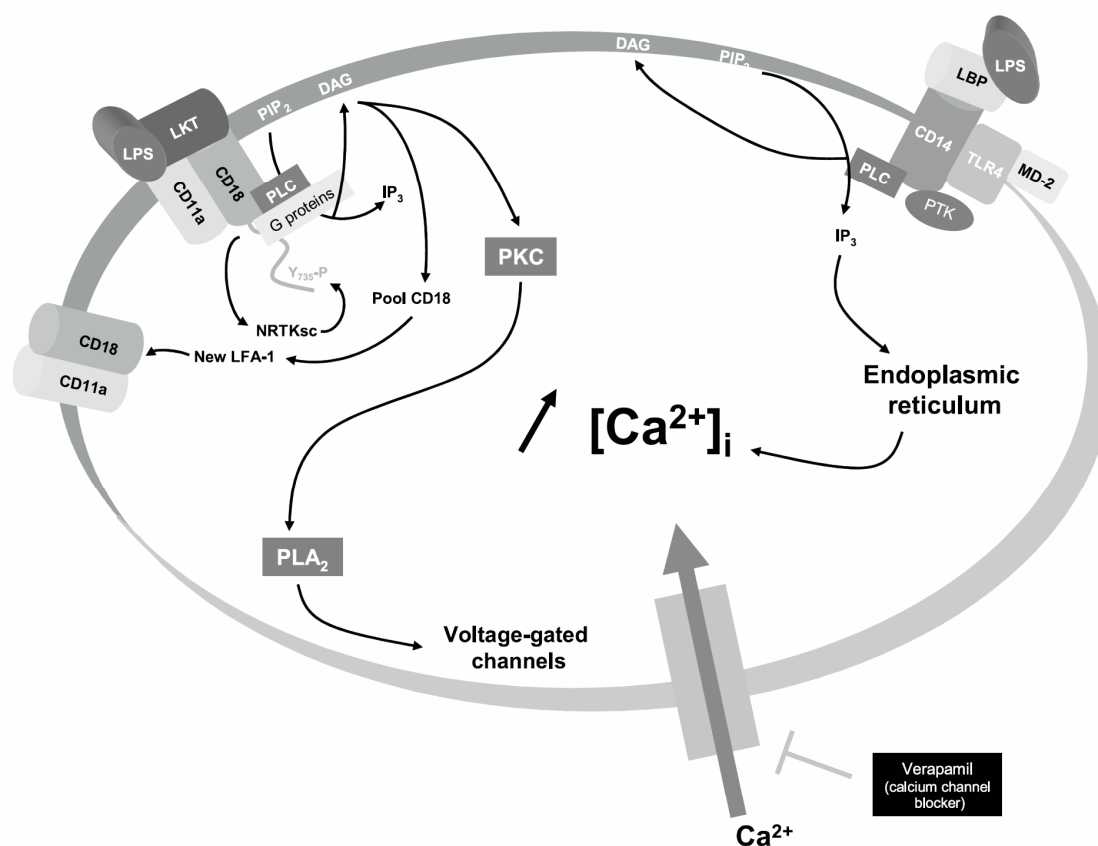


Figure 2. Leukocyte signalling pathways triggered by LKT and LPS leading to elevation of intracellular calcium. DAG: diacylglycerol; IP₃: inositol triphosphate; LBP: LPS binding protein; LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen-1; LKT: leukotoxin; LPS: lipopolysaccharide; NRTKsc: nonreceptor tyrosine kinase signalling cascade; PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLA₂: phospholipase A₂; PLC: phospholipase C; PKC: protein kinase C; PTK: protein tyrosine kinase; TLR4: toll-like receptor 4.

of IL-1 β is blocked in BAMs stimulated with LPS [80].

Activation of phospholipases A₂ (PLA₂) by LKT and C (PLC) by LKT and LPS has also been reported (Figs. 1 to 4) [64, 79, 90, 142].

PLA₂ are a diverse class of enzymes with regards to function, localisation, regulation, mechanism, sequence, structure and role of divalent metal ions. They play a central role in diverse cellular processes including phospholipid digestion and metabolism, host defence, and signal transduction by catalysing the hydrolysis of the sn-2 fatty acyl bond

of many different phospholipids which may themselves serve as intracellular second messengers or can be further metabolised as precursors in the production of specific proinflammatory lipid mediators such as leukotrienes, prostaglandins and hydroxyecosatetraenoic acids (HETES) via arachidonic acid (AA) formation (Fig. 4) [123]. Mammalian leukocytes contain several types of PLA₂ enzymes, the type most commonly involved in arachidonic acid production being high-molecular-mass (85 kDa) cytosolic PLA₂ (cPLA₂) [10, 11] which requires micromolar concentrations of Ca²⁺ for translocation from the cytosol to the nuclear

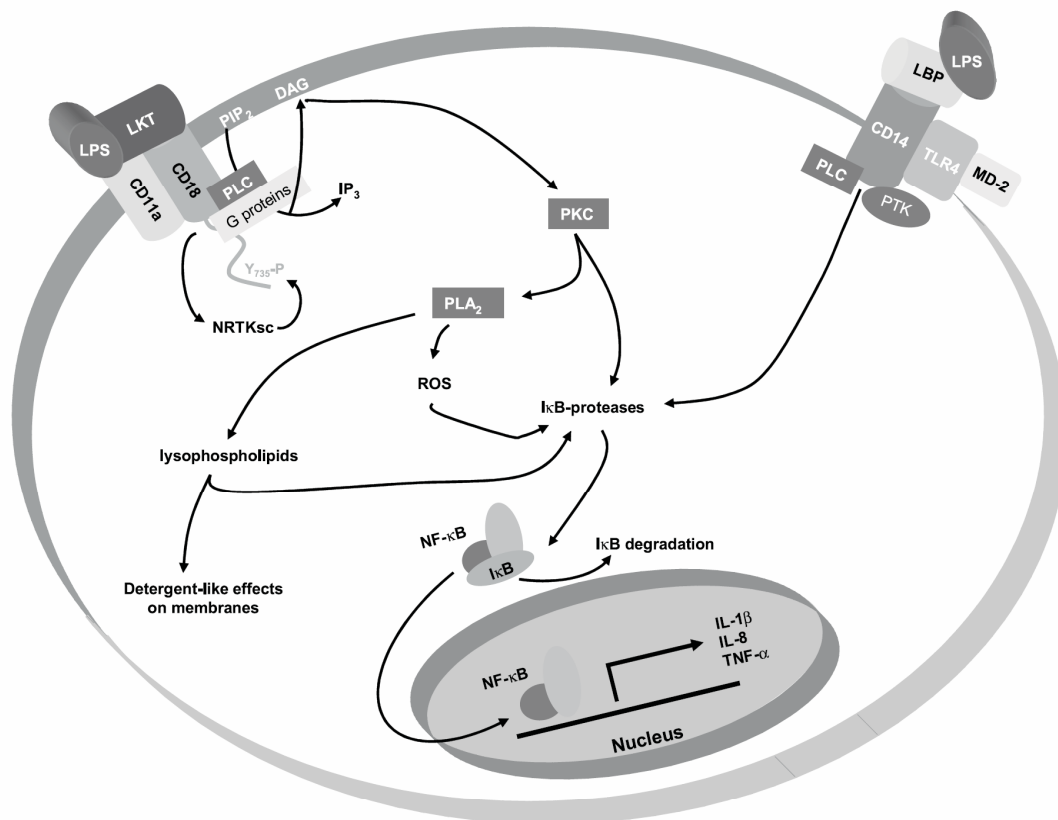


Figure 3. Leukocyte signalling pathways triggered by LKT and LPS leading to NF- κ B activation. DAG: diacylglycerol; I κ B: Inhibitor kappa B; IL-1 β : interleukin-1 beta; IL-8: interleukin-8; IP₃: inositol triphosphate; LBP: LPS binding protein; LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen-1; LKT: leukotoxin; LPS: lipopolysaccharide; NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B; NRTKsc: nonreceptor tyrosine kinase signalling cascade; PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLA₂: phospholipase A₂; PLC: phospholipase C; PKC: protein kinase C; PTK: protein tyrosine kinase; ROS: reactive oxygen species; TNF- α : Tumour Necrosis Factor-alpha; TLR4: toll-like receptor 4.

envelope [44, 45, 47, 63, 123]. The cPLA₂ activity seems to be regulated by G proteins and by protein kinase C [79, 90]. Although cPLA₂ is clearly implicated, one must also assume that other phospholipases, including sPLA₂ (secretory PLA₂), may also be involved in the molecular pathogenesis of *M. haemolytica* LKT [176].

The 5-lipoxygenase products of AA, leukotriene B₄ (LTB₄) and 5-hydroxy-eicosatetraenoic acid (5-HETE), are implicated (Fig. 4) as important chemotactic agents for bovine neutrophils and mediators of inflammation in *M. haemolytica* infection [28, 57,

68, 176]. LTB₄ and 5-HETE may in fact serve as biological amplifiers in the inflammatory process by inducing a further accumulation of polymorphonuclear leukocytes (PMN) at the site of injury [69, 120]. Moreover, the hydrolysis of phospholipids by PLA₂ leads to the elaboration of lysophospholipids, which are known to cause detergent-like effects on membranes [181] and to induce apoptosis (via NF- κ B) as well as necrosis (Fig. 3) [78, 121, 122].

Phospholipase C-induced hydrolysis of phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂) releases inositol triphosphate (IP₃) and

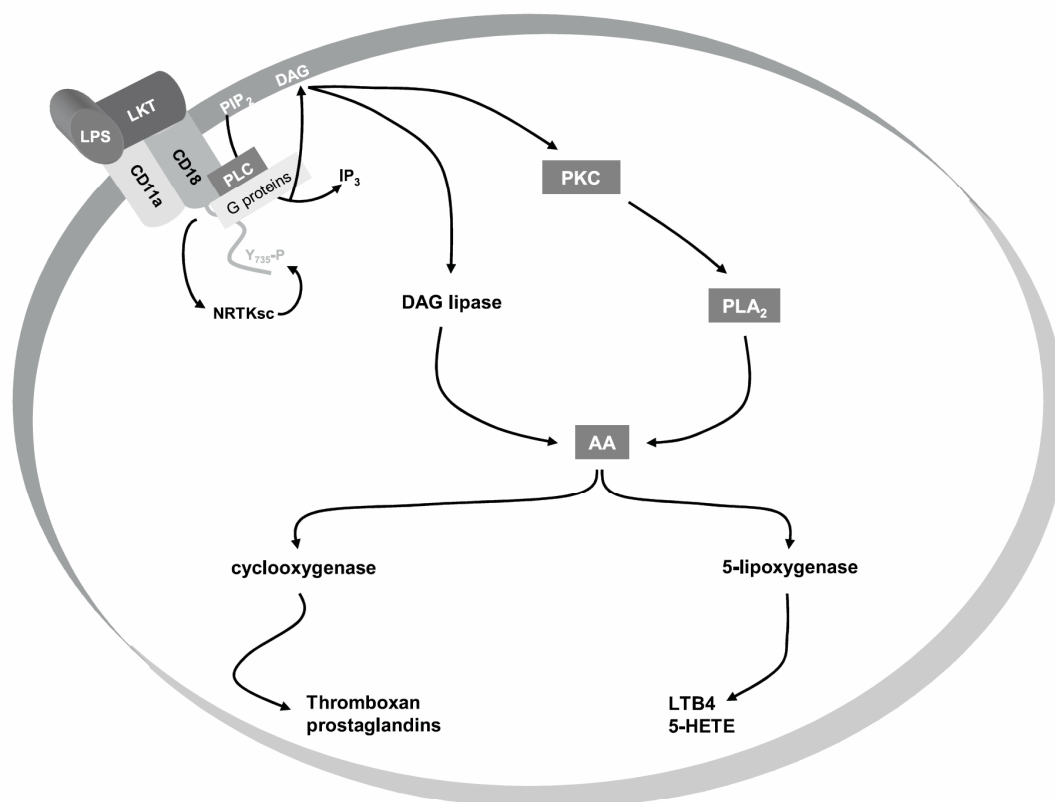


Figure 4. Leukocyte signalling pathways triggered by LKT and LPS leading to arachidonic acid metabolites. AA: arachidonic acid; DAG: diacylglycerol; 5-HETE: 5-hydroxy-eicosatetraenoic acid; IP₃: inositol triphosphate; LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen-1; LKT: leukotoxin; LPS: lipopolysaccharide; LTB₄: leukotriene B₄; NRTKsc: nonreceptor tyrosine kinase signalling cascade; PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLA₂: phospholipase A₂; PLC: phospholipase C; PKC: protein kinase C; TLR4: toll-like receptor 4.

diacylglycerol (DAG). It has been shown in murine and rat macrophages that IP₃ mediates intracellular Ca²⁺ mobilisation from endoplasmic reticulum stores by LPS [107, 142]. In BAMs, this release does not involve AA [79], even if a DAG lipase pathway could convert DAG to AA [6], most probably in LKT stimulation (Fig. 4). DAG is also known to activate the protein kinase C (PKC) family in a variety of cell systems [12, 132, 136]. Phorbol esters, such as phorbol myristate acetate (PMA), can substitute for DAG in activating PKC [132] in a prolonged action, since phorbol esters are not readily metabolised. PMA rapidly induces NF- κ B translocation into the nucleus [104] and increases the expression of LFA-1 from

bovine neutrophils, leading to enlarge the disease by increasing the number of LKT binding sites (Fig. 1) [62]. Dore et al. have shown that in PMA-non-stimulated bovine neutrophils, most PKC activity was detected in the cytosolic fraction and was dependent on the presence of added calcium and phospholipids whereas membrane-associated PKC did not have such a dependence. Stimulation with PMA caused redistribution of PKC activity in the cell consisting of a decrease in cytosolic PKC activity and an increase in membrane-associated PKC activity. As in non-stimulated cells, the former was dependent on the presence of calcium and phospholipids and the latter did not have such a requirement [50].

Oxygen-derived free radicals are also generated following LKT stimulation (Fig. 3) [114]. At the molecular level, they could act as second messengers and activate several factors and genes involved in the immune response and in apoptosis [35]. When over-produced, they exceed the antioxidant defence systems i.e. nonenzymatic (vitamin A, C and E) and enzymatic (superoxide dismutase) mechanisms, which leads to oxidative stress that entail several biological effects on proteins [37, 38], DNA and lipids [21]. For its part, *Mannheimia haemolytica* may be able to resist at least to a certain level of free radical damage, since serotypes A1 and A2 produce superoxide dismutase [1, 146].

In summary (Tab. I), several factors that lead to cell lysis could be produced or activated following LKT and LPS stimulation.

7.3. Pore formation

LKT belongs to the RTX toxin family whose members are known to lyse their target cells through the formation of pores that lead to the efflux of K^+ , influx of Ca^{2+} , colloidal osmotic swelling and eventual cell lysis. The pore size varies among bacterial species from 0.6–1 nm (LKT in this case) [29, 53, 84] to 2–3 nm in diameter [18, 102]. The LKT pore formation mechanism has not yet been described but we could approach it by analysing the way the other RTX toxins act.

Thus, the characterisation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin (LTX) pore formation in HL60 cells (a promyelocytic cell line) has shown that rapid cell death ensues with large conductance increases within seconds following high concentrations of toxin exposure. Cells undergo morphological changes consistent with rapid cell death [93]. When adding LTX to the bathing solution of an artificial bilayer, no channel activity was seen. However, if LTX was added to the lipid monolayer before forming the bilayer, large conductance fluctuations were seen in the bilayer. The authors

interpreted this result by implying that the aqueous form of the toxin will not spontaneously incorporate into a bilayer, but if the toxin is partially unfolded, as likely happens at the lipid monolayer-water interface, insertion into the membrane occurs and channels are formed. These are also consistent with LTX being required to interact with a cell surface receptor in order to facilitate toxin activation [93, 103]. It has been shown that this receptor is the human $\beta 2$ -integrin LFA-1, expressed on immune cell surfaces matching the profile of cytolytic targets [101].

A model for the pore forming structure of the *E. coli* hemolysin HlyA has been proposed which assumes that the hydrophobic N-terminal domains make up eight membrane-spanning α -helical sequences, four of which are hydrophobic segments of 21 amino acids each and four are amphipathic with the polar side of the helices providing the hydrophilic, negatively charged interior of the pore that may explain the reported cation selectivity of the pore. The N-terminal amphiphilic portion of hemolysin does not directly participate in the pore structure but may compete with the insertion of the α -helical amphipathic sequences assumed to be part of the pore structure and may thereby regulate the lifetime of the hemolysin pore [113]. Conflicting data on the number of toxin molecules required for pore formation have been published. However, it has been confirmed that HlyA creates a cation-selective ion channel of high conductance [13, 127, 128]. Moreover, the data suggest that a receptor is needed for the lytic activity of the toxin [13] in a two-stage process: first, the target cell binding requires glycine-rich repeat regions and modification of the toxin by the C gene product at an adjacent site and, afterwards, the N-terminal hydrophobic regions allow pore formation [32]. The target cell specificity could therefore be due either to a specific binding on the receptor, to the toxin ability to interact with the membrane or even to both parameters.

Interestingly, Ana Soloaga and her collaborators have studied the perturbation produced by purified α -hemolysin on pure phosphatidylcholine bilayers in the form of large unilamellar vesicles, under conditions in which the toxin has been shown to induce vesicle leakage. The bilayer systems containing bound protein have been examined by differential scanning calorimetry, fluorescence spectroscopy, differential solubilisation by Triton X-114, and freeze-fracture electron microscopy. The results obtained, complemented by structure prediction studies, have led to the conclusions that (i) α -hemolysin, under conditions leading to cell lysis, becomes inserted in the target membrane in the way of intrinsic or integral proteins and that (ii) inserted α -hemolysin occupies only one of the membrane phospholipid monolayers, i.e. it is not a transmembrane protein. Consequently, the insertion of one or more of these molecules in the outer monolayer of the membrane could induce an increase in the lateral pressure of the monolayer lipids and, beyond a certain increase, the monolayer will reach a point of transient breakdown (perhaps repaired by a net transfer of lipids to the inner monolayer) and subsequent leakage of contents. Upon the whole, these experiments and calculations are against the idea of *E. coli* hemolysin acting as a pore-forming toxin [156].

Moreover, it is intriguing to note that the overall pore formation mechanism resembles that of other toxins of bacterial origin such as colicins, diphtheria, tetanus and botulinum toxin [127].

7.4. Molecular synergies with other pathogens

As already stated above, *Mannheimia haemolytica*'s pathogenesis involves many predisposing viral and bacterial agents that could break down the antimicrobial barrier consisting of beta defensins and anionic peptides found in epithelial cells, resident and inflammatory cells, and serous and mucous secretions of the respiratory tract,

then allowing *Mannheimia haemolytica* to be released from its usual commensal status [22].

On the other hand, impaired neutrophils and lymphocyte functions are observed in bovine viral diarrhoea (BVD) virus [23], bovine respiratory syncytial (BRS) virus [184] and bovine herpes virus-1 (BHV-1) infected cattle. The latter is known to decrease host defence amongst others by diminishing the activities of T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes and macrophages [24, 67] and by interfering with the host's antigen presentation machinery to evade the host's immune response in vivo [74, 134]. Moreover, it has been shown that leukocyte exposure to inflammatory cytokines released in response to BHV-1 infection (interleukin-1 beta, interleukin-8, tumour necrosis factor alpha and interferon gamma) can modulate the migration and functional activation of bovine leukocytes [26, 105, 106]. So, when *Mannheimia haemolytica* enters a BHV-1 infected lung, it encounters leukocytes whose recruitment and LFA-1 expression (and hence the leukotoxin susceptibility) are increased [26, 106]. In contrast, interleukin-8 expression was minimal in lesions of BRSV pneumonia [26]. Since inflammatory cytokines (tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-8) are also produced in response to *Mannheimia haemolytica* infection [80, 99, 100, 192, 193], they may, therefore, represent therapeutic targets to be modulated in order to treat or prevent mannheimiosis, as recently demonstrated in vitro [115].

8. CONCLUSION AND PERSPECTIVE

M. haemolytica's pneumonias are known to be one of the main diseases in the cattle industry. Several virulence factors have been described, with the most important being leukotoxin and lipopolysaccharide, that could in fact be compared to "the lips that deliver the kiss of death". They could act together (because they form complexes)

or separately through distinct or common pathways, leading to the production of several factors that are able to damage the cell and to amplify the disease. Among these actors, Ca^{2+} signals play a crucial role by governing a host of vital cell functions and so are necessary for cell survival. However, more recently, it has become clear that cellular Ca^{2+} overload, or perturbation of intracellular Ca^{2+} compartmentalisation, can cause cytotoxicity and trigger either apoptotic or necrotic cell death [138].

Consequently, we can say that *M. haemolytica* could be considered among the pathogens that have reached the summum of evolution, being able to cooperate with other microbes to use the innate immune response against its host by promoting neutrophils and macrophage cell lysis. In this way, LKT seems to be very important by conferring species-specificity through specific interaction with the $\beta 2$ -integrin LFA-1. The accurate study of this binding at the molecular level will unambiguously represent a future step in the struggle against *M. haemolytica* and could open the way to the selection of naturally resistant animals.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Belgian federal services for public health and security of the food chain and environment, grant S-6107.

REFERENCES

- [1] Ackermann M.R., Brogden K.A., Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Microbes Infect.* 2 (2000) 1079–1088.
- [2] Aderem A., Ulevitch R.J., Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, *Nature* 406 (2000) 782–787.
- [3] Al-Ghamdi G.M., Ames T.R., Baker J.C., Walker R., Chase C.C., Frank G.H., Maheswaran S.K., Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States, *J. Vet. Diagn. Invest.* 12 (2000) 576–578.
- [4] Ali Q., Davies R.L., Parton R., Coote J.G., Gibbs H.A., Lipopolysaccharide heterogeneity in *Pasteurella haemolytica* isolates from cattle and sheep, *J. Gen. Microbiol.* 138 (1992) 2185–2195.
- [5] Ambagala T.C., Ambagala A.P., Srikumaran S., The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to beta(2) integrins on bovine leukocytes, *FEMS Microbiol. Lett.* 179 (1999) 161–167.
- [6] Ambs P., Fitzke E., Dieter P., AA-release is under control of PLA2 and DAG lipase in rat liver macrophages, *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 23 (1995) 81–83.
- [7] Angen O., Mutters R., Caugant D.A., Olsen J.E., Bisgaard M., Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov, *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1999) 67–86.
- [8] Bailly P., Tontti E., Hermand P., Cartron J.P., Gahmberg C.G., The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins, *Eur. J. Immunol.* 25 (1995) 3316–3320.
- [9] Baluyut C.S., Simonson R.R., Bemrick W.J., Maheswaran S.K., Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: identification and partial characterization of a cytotoxin, *Am. J. Vet. Res.* 42 (1981) 1920–1926.
- [10] Bauldry S.A., Wooten R.E., Leukotriene B4 and platelet activating factor production in permeabilized human neutrophils: role of cytosolic PLA2 in LTB4 and PAF generation, *Biochim. Biophys. Acta* 1303 (1996) 63–73.
- [11] Bauldry S.A., Wooten R.E., Bass D.A., Activation of cytosolic phospholipase A2 in permeabilized human neutrophils, *Biochim. Biophys. Acta* 1299 (1996) 223–234.
- [12] Bell R.M., Burns D.J., Lipid activation of protein kinase C, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 4661–4664.
- [13] Benz R., Schmid A., Wagner W., Goebel W., Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates, *Infect. Immun.* 57 (1989) 887–895.
- [14] Berggren K.A., Baluyut C.S., Simonson R.R., Bemrick W.J., Maheswaran S.K., Cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on bovine neutrophils, *Am. J. Vet. Res.* 42 (1981) 1383–1388.

Mannheimiosis (pasteurellosis)

149

- [15] Berman A.E., Kozlova N.I., Morozevich G.E., Integrins: structure and signaling, *Biochemistry (Mosc)* 68 (2003) 1284–1299.
- [16] Berthoud H., Frey J., Kuhnert P., Characterization of Aqx and its operon: the hemolytic RTX determinant of *Actinobacillus equuli*, *Vet. Microbiol.* 87 (2002) 159–174.
- [17] Beutler B., Cerami A., Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator, *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1988) 505–518.
- [18] Bhakdi S., Mackman N., Nicaud J.M., Holland I.B., *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores, *Infect. Immun.* 52 (1986) 63–69.
- [19] Bingham D.P., Moore R., Richards A.B., Comparison of DNA: DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella haemolytica* and related species, *Am. J. Vet. Res.* 51 (1990) 1161–1166.
- [20] Breider M.A., Walker R.D., Hopkins F.M., Schultz T.W., Bowersock T.L., Pulmonary lesions induced by *Pasteurella haemolytica* in neutrophil sufficient and neutrophil deficient calves, *Can. J. Vet. Res.* 52 (1988) 205–209.
- [21] Briganti S., Picardo M., Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 17 (2003) 663–669.
- [22] Brogden K.A., Lehmkuhl H.D., Cutlip R.C., *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats, *Vet. Res.* 29 (1998) 233–254.
- [23] Brown G.B., Bolin S.R., Frank D.E., Roth J.A., Defective function of leukocytes from cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, and the influence of recombinant cytokines, *Am. J. Vet. Res.* 52 (1991) 381–387.
- [24] Brown T.T. Jr., Ananaba G., Effect of respiratory infections caused by bovine herpesvirus-1 or parainfluenza-3 virus on bovine alveolar macrophage functions, *Am. J. Vet. Res.* 49 (1988) 1447–1451.
- [25] Caprioli A., Busani L., Martel J.L., Helmuth R., Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies, *Int. J. Antimicrob. Agents* 14 (2000) 295–301.
- [26] Caswell J.L., Middleton D.M., Sorden S.D., Gordon J.R., Expression of the neutrophil chemoattractant interleukin-8 in the lesions of bovine pneumonic pasteurellosis, *Vet. Pathol.* 35 (1998) 124–131.
- [27] Chen T.Y., Lei M.G., Suzuki T., Morrison D.C., Lipopolysaccharide receptors and signal transduction pathways in mononuclear phagocytes, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181 (1992) 169–188.
- [28] Clarke C.R., Lauer A.K., Barron S.J., Wyckoff J.H. 3rd, The role of eicosanoids in the chemotactic response to *Pasteurella haemolytica* infection, *Zentralbl. Veterinarmed. B* 41 (1994) 483–491.
- [29] Clinkenbeard K.D., Mosier D.A., Confer A.W., Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, *Infect. Immun.* 57 (1989) 420–425.
- [30] Clinkenbeard K.D., Clarke C.R., Hague C.M., Clinkenbeard P., Srikumaran S., Morton R.J., *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced synthesis of eicosanoids by bovine neutrophils in vitro, *J. Leukoc. Biol.* 56 (1994) 644–649.
- [31] Confer A.W., Panciera R.J., Clinkenbeard K.D., Mosier D.A., Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*, *Can. J. Vet. Res.* 54 (1990) S48–S52.
- [32] Coote J.G., Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 8 (1992) 137–161.
- [33] Cox E., Mast J., MacHugh N., Schwenger B., Goddeeris B.M., Expression of beta 2 integrins on blood leukocytes of cows with or without bovine leukocyte adhesion deficiency, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58 (1997) 249–263.
- [34] Cudd L.A., Ownby C.L., Clarke C.R., Sun Y., Clinkenbeard K.D., Effects of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on apoptosis and oncosis of bovine neutrophils, *Am. J. Vet. Res.* 62 (2001) 136–141.
- [35] Curtin J.F., Donovan M., Cotter T.G., Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis, *J. Immunol. Methods* 265 (2002) 49–72.
- [36] Czuprynski C.J., Noel E.J., Ortiz-Carranza O., Srikumaran S., Activation of bovine neutrophils by partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, *Infect. Immun.* 59 (1991) 3126–3133.
- [37] Davies K.J., Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9895–9901.

- [38] Davies M.J., Fu S., Wang H., Dean R.T., Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1151–1163.
- [39] Davies R.L., Donachie W., Intra-specific diversity and host specificity within *Pasteurella haemolytica* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins, *Microbiology* 142 (1996) 1895–1907.
- [40] Davies R.L., Baillie S., Cytotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene lktA, *Vet. Microbiol.* 92 (2003) 263–279.
- [41] Davies R.L., Arkinsaw S., Selander R.K., Evolutionary genetics of *Pasteurella haemolytica* isolates recovered from cattle and sheep, *Infect. Immun.* 65 (1997) 3585–3593.
- [42] Davies R.L., Whittam T.S., Selander R.K., Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (lktA) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 1394–1404.
- [43] Davies R.L., Campbell S., Whittam T.S., Mosaic structure and molecular evolution of the leukotoxin operon (lktCABD) in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 266–277.
- [44] Dennis E.A., Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13057–13060.
- [45] Dennis E.A., Rhee S.G., Billah M.M., Hannun Y.A., Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction, *FASEB J.* 5 (1991) 2068–2077.
- [46] Deshpande M.S., Ambagala T.C., Ambagala A.P., Kehrli M.E. Jr., Srikumaran S., Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis, *Infect. Immun.* 70 (2002) 5058–5064.
- [47] Diez E., Chilton F.H., Stroup G., Mayer R.J., Winkler J.D., Fonteh A.N., Fatty acid and phospholipid selectivity of different phospholipase A2 enzymes studied by using a mammalian membrane as substrate, *Biochem. J.* 301 (1994) 721–726.
- [48] Dinarello C.A., Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism, *Blood* 77 (1991) 1627–1652.
- [49] Donachie W., Bacteriology of bovine respiratory disease, *UK Vet.* 3 (1998) 44–46.
- [50] Dore M., Neilsen N.R., Slauson D.O., Protein kinase-C activity in phorbol myristate acetate-stimulated neutrophils from newborn and adult cattle, *Am. J. Vet. Res.* 53 (1992) 1679–1684.
- [51] Dungworth D., The respiratory system, in: Jubb K., Kennedy P., Palmer N. (Eds.), *Pathology of domestic animals*, 4th ed., Academic Press, San Diego, 1992, pp. 589–663.
- [52] Edwards A.J., Respiratory diseases of feedlot cattle in the central USA, *Bovine Pract.* 30 (1996) 5–7.
- [53] Ehrmann I.E., Gray M.C., Gordon V.M., Gray L.S., Hewlett E.L., Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*, *FEBS Lett.* 278 (1991) 79–83.
- [54] Fedorova N.D., Highlander S.K., Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin, *Infect. Immun.* 65 (1997) 2593–2598.
- [55] Ferber D., Antibiotic resistance. Superbugs on the hoof? *Science* 288 (2000) 792–794.
- [56] Fett T., Zecchinon L., Baise E., Desmecht D., The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA: molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins, *Gene* 325 (2004) 97–101.
- [57] Ford-Hutchinson A.W., Gresser M., Young R.N., 5-Lipoxygenase, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 383–417.
- [58] Frank G.H., Smith P.C., Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves, *Am. J. Vet. Res.* 44 (1983) 981–985.
- [59] Gahmberg C.G., Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (1997) 643–650.
- [60] Gardner B.A., Northcutt S.L., Dolezal H.G., Gill D.R., Ray F.K., Morgan J.B., Shearhart C.W., Factors influencing profitability of feedlot steers, *Animal Science Research Report*, Oklahoma Ag Experiment Station, Oklahoma State University, Stillwater, USA, 1996, pp. 164–172.
- [61] Gerbig D.G. Jr., Walker R.D., Baker J.C., Foster J.S., Moore R.N., Calcium ion involvement in the action of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, *Vet. Microbiol.* 19 (1989) 325–335.
- [62] Gilbert R.O., Kim C.A., Yen A., Modulation, in vivo and in vitro, of surface expression of

Mannheimiosis (pasteurellosis)

151

- CD18 by bovine neutrophils, *Am. J. Vet. Res.* 53 (1992) 1675–1678.
- [63] Glaser K.B., Mobilio D., Chang J.Y., Senko N., Phospholipase A2 enzymes: regulation and inhibition, *Trends Pharmacol. Sci.* 14 (1993) 92–98.
- [64] Glaser K.B., Sung A., Bauer J., Weichman B.M., Regulation of eicosanoid biosynthesis in the macrophage. Involvement of protein tyrosine phosphorylation and modulation by selective protein tyrosine kinase inhibitors, *Biochem. Pharmacol.* 45 (1993) 711–721.
- [65] Griffin D., Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* (1997) 367–377.
- [66] Griffin D., Perino L., Wittum T., Feedlot respiratory disease: cost, value of preventives and intervention, *Proc. Am. Assoc. Bov. Pract.* (1995) 157–160.
- [67] Hanon E., Lambot M., Hoornaert S., Lyaku J., Pastoret P.P., Bovine herpesvirus 1-induced apoptosis: phenotypic characterization of susceptible peripheral blood mononuclear cells, *Arch. Virol.* 143 (1998) 441–452.
- [68] Heidel J.R., Taylor S.M., Laegreid W.W., Silflow R.M., Liggitt H.D., Leid R.W., In vivo chemotaxis of bovine neutrophils induced by 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic and eicosapentaenoic acid, *Am. J. Pathol.* 134 (1989) 671–676.
- [69] Henricks P.A., Binkhorst G.J., Drijver A.A., Nijkamp F.P., *Pasteurella haemolytica* leukotoxin enhances production of leukotriene B4 and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by bovine polymorphonuclear leukocytes, *Infect. Immun.* 60 (1992) 3238–3243.
- [70] Highlander S.K., Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Front. Biosci.* 6 (2001) D1128–D1150.
- [71] Highlander S.K., Chidambaram M., Engler M.J., Weinstock G.M., DNA sequence of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin gene cluster, *DNA* 8 (1989) 15–28.
- [72] Highlander S.K., Engler M.J., Weinstock G.M., Secretion and expression of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 2343–2350.
- [73] Highlander S.K., Wickersham E.A., Garza O., Weinstock G.M., Expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin is inhibited by a locus that encodes an ATP-binding cassette homolog, *Infect. Immun.* 61 (1993) 3942–3951.
- [74] Hinkley S., Hill A.B., Srikumaran S., Bovine herpesvirus-1 infection affects the peptide transport activity in bovine cells, *Virus Res.* 53 (1998) 91–96.
- [75] Hodgson J.C., Moon G.M., Quirie M., Donachie W., Association of LPS chemotype of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 with disease virulence in a model of ovine pneumonic pasteurellosis, *J. Endotoxin Res.* 9 (2003) 25–32.
- [76] Hormansdorfer S., Bauer J., Resistance pattern of bovine *Pasteurella*, *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 109 (1996) 168–171 (in German).
- [77] Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S., Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product, *J. Immunol.* 162 (1999) 3749–3752.
- [78] Hsieh C.C., Yen M.H., Liu H.W., Lau Y.T., Lysophosphatidylcholine induces apoptotic and non-apoptotic death in vascular smooth muscle cells: in comparison with oxidized LDL, *Atherosclerosis* 151 (2000) 481–491.
- [79] Hsuan S.L., Kannan M.S., Jeyaseelan S., Prakash Y.S., Sieck G.C., Maheswaran S.K., *Pasteurella haemolytica* A1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways, *Infect. Immun.* 66 (1998) 2836–2844.
- [80] Hsuan S.L., Kannan M.S., Jeyaseelan S., Prakash Y.S., Malazdrewich C., Abrahamsen M.S., Sieck G.C., Maheswaran S.K., *Pasteurella haemolytica* leukotoxin and endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages requires NF-kappaB activation and calcium elevation, *Microb. Pathog.* 26 (1999) 263–273.
- [81] Hynes R.O., Integrins: a family of cell surface receptors, *Cell* 48 (1987) 549–554.
- [82] Hynes R.O., Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* 69 (1992) 11–25.
- [83] Ingalls R.R., Golenbock D.T., CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide, *J. Exp. Med.* 181 (1995) 1473–1479.
- [84] Iwase M., Lally E.T., Berthold P., Korchak H.M., Taichman N.S., Effects of cations and osmotic protectants on cytolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin, *Infect. Immun.* 58 (1990) 1782–1788.

- [85] Jensen R., Pierson R.E., Braddy P.M., Saari D.A., Lauerman L.H., England J.J., Keyvanfar H., Collier J.R., Horton D.P., McChesney A.E., Benitez A., Christie R.M., Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 169 (1976) 500–506.
- [86] Jericho K.W., Langford E.V., Pneumonia in calves produced with aerosols of bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*, *Can. J. Comp. Med.* 42 (1978) 269–277.
- [87] Jericho K.W., Yates W.D., Babiuk L.A., Bovine herpesvirus-1 vaccination against experimental bovine herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica* respiratory tract infection: onset of protection, *Am. J. Vet. Res.* 43 (1982) 1776–1780.
- [88] Jeyaseelan S., Hsuan S.L., Kannan M.S., Walcheck B., Wang J.F., Kehrl M.E., Lally E.T., Sieck G.C., Maheswaran S.K., Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes, *Infect. Immun.* 68 (2000) 72–79.
- [89] Jeyaseelan S., Kannan M.S., Briggs R.E., Thumbikat P., Maheswaran S.K., *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a non-receptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects, *Infect. Immun.* 69 (2001) 6131–6139.
- [90] Jeyaseelan S., Kannan M.S., Hsuan S.L., Singh A.K., Walseth T.F., Maheswaran S.K., *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of bovine leukocytes: role of arachidonic acid and its regulation, *Microb. Pathog.* 30 (2001) 59–69.
- [91] Jeyaseelan S., Sreevatsan S., Maheswaran S.K., Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis, *Anim. Health Res. Rev.* 3 (2002) 69–82.
- [92] Kaehler K.L., Markham R.J., Muscoplat C.C., Johnson D.W., Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*, *Infect. Immun.* 30 (1980) 615–616.
- [93] Karakelian D., Lear J.D., Lally E.T., Tanaka J.C., Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin pore formation in HL60 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1406 (1998) 175–187.
- [94] Kehrenberg C., Schulze-Tanzi G., Martel J.L., Dancla E.C., Schwarz S., Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis, *Vet. Res.* 32 (2001) 323–339.
- [95] Kelly A.P., Janzen E.D., A review of morbidity and mortality rates and disease occurrence in North American feedlot cattle, *Can. Vet. J.* (1986) 496–500.
- [96] Kitt T., Über eine experimentelle, der Rinderseuche ähnliche Infektionskrankheit, *Sitzungsber. Ges. Morphol. Physiol. Muenchen* (1885) 140–168.
- [97] Kolodrubetz D., Phillips L., Jacobs C., Burgum A., Kraig E., Anaerobic regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin transcription is ArcA/FnrA-independent and requires a novel promoter element, *Res. Microbiol.* 154 (2003) 645–653.
- [98] Lacroix R.P., Duncan J.R., Jenkins R.P., Leitch R.A., Perry J.A., Richards J.C., Structural and serological specificities of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharides, *Infect. Immun.* 61 (1993) 170–181.
- [99] Lafleur R.L., Abrahamsen M.S., Maheswaran S.K., The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha, *Infect. Immun.* 66 (1998) 4087–4092.
- [100] Lafleur R.L., Malazdrewich C., Jeyaseelan S., Bleifield E., Abrahamsen M.S., Maheswaran S.K., Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin, *Microb. Pathog.* 30 (2001) 347–357.
- [101] Lally E.T., Kieba I.R., Sato A., Green C.L., Rosenbloom J., Korostoff J., Wang J.F., Shenker B.J., Ortlepp S., Robinson M.K., Billings P.C., RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 30463–30469.
- [102] Lalonde G., McDonald T.V., Gardner P., O'Hanley P.D., Identification of a hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and characterization of its channel properties in planar phospholipid bilayers, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 13559–13564.
- [103] Lear J.D., Furlbur U.G., Lally E.T., Tanaka J.C., *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin forms large conductance, voltage-gated ion channels when incorporated into planar lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1238 (1995) 34–41.
- [104] Legrand-Poels S., Zecchinon L., Piret B., Schoonbroodt S., Piette J., Involvement of different transduction pathways in NF-kappa B activation by several inducers, *Free Radic. Res.* 27 (1997) 301–309.

Mannheimiosis (pasteurellosis)

153

- [105] Leite F., O'Brien S., Sylte M.J., Page T., Atapattu D., Czuprynski C.J., Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood neutrophils in vitro, *Infect. Immun.* 70 (2002) 4336–4343.
- [106] Leite F., Kuckleburg C., Atapattu D., Schultz R., Czuprynski C.J., BHV-1 infection and inflammatory cytokines amplify the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99 (2004) 193–202.
- [107] Letari O., Nicosia S., Chiavaroli C., Vacher P., Schlegel W., Activation by bacterial lipopolysaccharide causes changes in the cytosolic free calcium concentration in single peritoneal macrophages, *J. Immunol.* 147 (1991) 980–983.
- [108] Li J., Clinkenbeard K.D., Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, *Infect. Immun.* 67 (1999) 2920–2927.
- [109] Li J., Clinkenbeard K.D., Ritchey J.W., Bovine CD18 identified as a species specific receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, *Vet. Microbiol.* 67 (1999) 91–97.
- [110] Lo R.Y., Molecular characterization of cytotoxins produced by *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Can. J. Vet. Res.* 54 (1990) S33–S35.
- [111] Lopez A., Respiratory system, thoracic cavity and pleura, in: McGavin M., Carlton W., Zachary J. (Eds.), *Thomson's Special Veterinary Pathology*, 3rd ed., Mosby, Saint-Louis, 2001, pp. 125–196.
- [112] Lopez A., Maxie M.G., Ruhnke L., Savan M., Thomson R.G., Cellular inflammatory response in the lungs of calves exposed to bovine viral diarrhoea virus, *Mycoplasma bovis*, and *Pasteurella haemolytica*, *Am. J. Vet. Res.* 47 (1986) 1283–1286.
- [113] Ludwig A., Schmid A., Benz R., Goebel W., Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.* 226 (1991) 198–208.
- [114] Maheswaran S.K., Weiss D.J., Kannan M.S., Townsend E.L., Reddy K.R., Whiteley L.O., Srikumaran S., Effects of *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxin on bovine neutrophils: degranulation and generation of oxygen-derived free radicals, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 33 (1992) 51–68.
- [115] Malazdrewich C., Thumbikat P., Abrahamsen M.S., Maheswaran S.K., Pharmacological inhibition of *Mannheimia haemolytica* lipopolysaccharide and leukotoxin-induced cytokine expression in bovine alveolar macrophages, *Microb. Pathog.* 36 (2004) 159–169.
- [116] Marciel A.M., Highlander S.K., Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and *cis*-acting regulators of leukotoxin transcription, *Infect. Immun.* 69 (2001) 6231–6239.
- [117] Marciel A.M., Highlander S.K., Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and *cis*-acting regulators of leukotoxin transcription, *Infect. Immun.* 69 (2001) 6231–6239.
- [118] Martel J.L., Chalus-Dancla E., Coudert M., Poumarat F., Lafont J.P., Survey of antimicrobial resistance in bacterial isolates from diseased cattle in France, *Microb. Drug Resist.* 1 (1995) 273–283.
- [119] Martin S.W., Meek A.H., Davis J.A., Curtis R.A., Factors associated with morbidity and mortality in feedlot cattle calves, The Bruce County Beef Project, year two, *Can. J. Comp. Med.* (1981) 103–112.
- [120] Martin T.R., Altman L.C., Albert R.K., Henderson W.R., Leukotriene B4 production by the human alveolar macrophage: a potential mechanism for amplifying inflammation in the lung, *Am. Rev. Respir. Dis.* 129 (1984) 106–111.
- [121] Masamune A., Sakai Y., Satoh A., Fujita M., Yoshida M., Shimosegawa T., Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in AR42J cells, *Pancreas* 22 (2001) 75–83.
- [122] Masamune A., Sakai Y., Yoshida M., Satoh A., Satoh K., Shimosegawa T., Lysophosphatidylcholine activates transcription factor NF-kappaB and AP-1 in AR42J cells, *Dig. Dis. Sci.* 46 (2001) 1871–1881.
- [123] Mayer R.J., Marshall L.A., New insights on mammalian phospholipase A2(s); comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes, *FASEB J.* 7 (1993) 339–348.
- [124] Medzhitov R., Janeway C. Jr., Innate immunity, *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 338–344.
- [125] Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr., A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* 388 (1997) 394–397.
- [126] Mena-Rojas E., Vazquez Cruz C., Vaca Pacheco S., Garcia Gonzalez O., Perez-Marquez V.M., Perez-Mendez A., Ibarra-Caballero J., De La Garza M., Zenteno E., Negrete-Abascal E., Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A

- 110-kDa putative RTX protein, FEMS Microbiol. Lett. 232 (2004) 83–87.
- [127] Menestrina G., *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism, FEBS Lett. 232 (1988) 217–220.
- [128] Menestrina G., Mackman N., Holland I.B., Bhakdi S., *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes, Biochim. Biophys. Acta 905 (1987) 109–117.
- [129] Mizuno T., Yoshihara Y., Inazawa J., Kagamiyama H., Mori K., cDNA cloning and chromosomal localization of the human telencephalin and its distinctive interaction with lymphocyte function-associated antigen-1, J. Biol. Chem. 272 (1997) 1156–1163.
- [130] Morton R.J., Simons K.R., Confer A.W., Major outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serovars 1-15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars, Vet. Microbiol. 51 (1996) 319–330.
- [131] Mosier D.A., Bacterial pneumonia, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 13 (1997) 483–493.
- [132] Mosior M., Newton A.C., Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association, J. Biol. Chem. 270 (1995) 25526–25533.
- [133] Muggli-Cockett N.E., Cundiff L.V., Gregory K.E., Genetic analysis of bovine respiratory disease in beef calves during the first year of life, J. Anim. Sci. 70 (1992) 2013–2019.
- [134] Nataraj C., Eidmann S., Hariharan M.J., Sur J.H., Perry G.A., Srikumaran S., Bovine herpesvirus 1 downregulates the expression of bovine MHC class I molecules, Viral Immunol. 10 (1997) 21–34.
- [135] Newson I.E., Cross, F., Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep, J. Am. Vet. Med. Assoc. 80 (1932) 711–719.
- [136] Newton A.C., Protein kinase C: structure, function, and regulation, J. Biol. Chem. 270 (1995) 28495–28498.
- [137] O'Brien J.K., Duffus W.P., *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: relative susceptibility of bovine leucocytes, Vet. Microbiol. 13 (1987) 321–334.
- [138] Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P., Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 (2003) 552–565.
- [139] Ortiz-Carranza O., Czuprynski C.J., Activation of bovine neutrophils by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin is calcium dependent, J. Leukoc. Biol. 52 (1992) 558–564.
- [140] Pellett S., Welch R.A., *Escherichia coli* hemolysin mutants with altered target cell specificity, Infect. Immun. 64 (1996) 3081–3087.
- [141] Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B., Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene, Science 282 (1998) 2085–2088.
- [142] Prpic V., Weiel J.E., Somers S.D., DiGiuseppi J., Gonias S.L., Pizzo S.V., Hamilton T.A., Herman B., Adams D.O., Effects of bacterial lipopolysaccharide on the hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in murine peritoneal macrophages, J. Immunol. 139 (1987) 526–533.
- [143] Purdy C.W., Raleigh R.H., Collins J.K., Watts J.L., Straus D.C., Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves, Curr. Microbiol. 34 (1997) 244–249.
- [144] Quirie M., Donachie W., Gilmour N.J., Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle, Vet. Rec. 119 (1986) 93–94.
- [145] Raetz C.R., Whitfield C., Lipopolysaccharide endotoxins, Annu. Rev. Biochem. 71 (2002) 635–700.
- [146] Rowe H.A., Knox D.P., Poxton I.R., Donachie W., Divergent activity and function of superoxide dismutases in *Pasteurella haemolytica* serotypes A1 and A2 and *Pasteurella trehalosi* serotype T10, FEMS Microbiol. Lett. 150 (1997) 197–202.
- [147] Schaller A., Kuhnert P., de la Puente-Redondo V.A., Nicolet J., Frey J., Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals, Vet. Microbiol. 74 (2000) 365–376.
- [148] Schumann R.R., Leong S.R., Flaggs G.W., Gray P.W., Wright S.D., Mathison J.C., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Structure and function of lipopolysaccharide binding protein, Science 249 (1990) 1429–1431.
- [149] Shewen P.E., Wilkie B.N., Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leucocytes, Infect. Immun. 35 (1982) 91–94.
- [150] Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M., MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4, J. Exp. Med. 189 (1999) 1777–1782.

- [151] Shuster D.E., Bosworth B.T., Kehrl M.E. Jr., Sequence of the bovine CD18-encoding cDNA: comparison with the human and murine glycoproteins, *Gene* 114 (1992) 267–271.
- [152] Shuster D.E., Kehrl M.E. Jr., Ackermann M.R., Gilbert R.O., Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 9225–9229.
- [153] Slocombe R.F., Malark J., Ingersoll R., Derksen F.J., Robinson N.E., Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves, *Am. J. Vet. Res.* 46 (1985) 2253–2258.
- [154] Smith G.R., The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions of sheep, *J. Pathol. Bacteriol.* 81 (1961) 431–440.
- [155] Sneath P.H., Stevens M., *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (1990) 148–153.
- [156] Soloaga A., Veiga M.P., Garcia-Segura L.M., Ostolaza H., Brasseur R., Goni F.M., Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 1013–1024.
- [157] Speer N.C., Young C., Roeber D., The importance of preventing bovine respiratory disease: a beef industry review, *Bovine Pract.* 35 (2001) 189–196.
- [158] Springer T.A., Adhesion receptors of the immune system, *Nature* 346 (1990) 425–434.
- [159] Stanley P., Koronakis V., Hughes C., Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 309–333.
- [160] Strathdee C.A., Lo R.Y., Regulation of expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 5955–5962.
- [161] Sun Y., Clinkenbeard K.D., Cudd L.A., Clarke C.R., Clinkenbeard P.A., Correlation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin binding with susceptibility to intoxication of lymphoid cells from various species, *Infect. Immun.* 67 (1999) 6264–6269.
- [162] Sun Y., Clinkenbeard K.D., Ownby C.L., Cudd L., Clarke C.R., Highlander S.K., Ultrastructural characterization of apoptosis in bovine lymphocytes exposed to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, *Am. J. Vet. Res.* 61 (2000) 51–56.
- [163] Sweet M.J., Hume D.A., Endotoxin signal transduction in macrophages, *J. Leukoc. Biol.* 60 (1996) 8–26.
- [164] Tato C.M., Hunter C.A., Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection, *Infect. Immun.* 70 (2002) 3311–3317.
- [165] Tatum F.M., Briggs R.E., Sreevatsan S.S., Zehr E.S., Ling Hsuan S., Whiteley L.O., Ames T.R., Maheswaran S.K., Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence, *Microb. Pathog.* 24 (1998) 37–46.
- [166] The NCBI taxonomy browser [on line], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> [consulted 31 August 2004].
- [167] Thumbikat P., Briggs R.E., Kannan M.S., Maheswaran S.K., Biological effects of two genetically defined leukotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*, *Microb. Pathog.* 34 (2003) 217–226.
- [168] Tian L., Yoshihara Y., Mizuno T., Mori K., Gahmberg C.G., The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin, *J. Immunol.* 158 (1997) 928–936.
- [169] Tobias P.S., Soldau K., Ulevitch R.J., Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum, *J. Exp. Med.* 164 (1986) 777–793.
- [170] Tobias P.S., Soldau K., Ulevitch R.J., Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 10867–10871.
- [171] Uhlich G.A., McNamara P.J., Iandolo J.J., Mosier D.A., Cloning and characterization of the gene encoding *Pasteurella haemolytica* FnrP, a regulator of the *Escherichia coli* silent hemolysin sheA, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 3845–3848.
- [172] Uhlich G.A., McNamara P.J., Iandolo J.J., Mosier D.A., FnrP interactions with the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin promoter, *FEMS Microbiol. Lett.* 186 (2000) 73–77.
- [173] Ulevitch R.J., Tobias P.S., Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin, *Annu. Rev. Immunol.* 13 (1995) 437–457.

- [174] Vogel J.G., Parrott C., Mortality survey in feedyards: the incidence of death from digestive, respiratory and other causes in feedyards on the Great plains, *Comp. Cont. Ed. Prac. Vet.* (1994) 227–234.
- [175] Walker R.D., Hopkins F.M., Schultz T.W., McCracken M.D., Moore R.N., Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*, *Am. J. Vet. Res.* 46 (1985) 2429–2433.
- [176] Wang Z., Clarke C., Clinkenbeard K., *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils, *Infect. Immun.* 66 (1998) 1885–1890.
- [177] Watts J.L., Yancey R.J. Jr., Salmon S.A., Case C.A., A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 725–731.
- [178] Waurzyniak B.J., Clinkenbeard K.D., Confer A.W., Srikumaran S., Enhancement of *Pasteurella haemolytica* leukotoxic activity by bovine serum albumin, *Am. J. Vet. Res.* 55 (1994) 1267–1274.
- [179] Weiss D.J., Bauer M.C., Whiteley L.O., Maheswaran S.K., Ames T.R., Changes in blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis, *Am. J. Vet. Res.* 52 (1991) 337–344.
- [180] Welch R.A., RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 257 (2001) 85–111.
- [181] Weltzien H.U., Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta* 559 (1979) 259–287.
- [182] Westrop G., Hormozi K., da Costa N., Parton R., Coote J., Structure-function studies of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* and the leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* by heterologous C protein activation and construction of hybrid proteins, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 871–879.
- [183] Whiteley L.O., Maheswaran S.K., Weiss D.J., Ames T.R., Kannan M.S., *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis, *J. Vet. Intern. Med.* 6 (1992) 11–22.
- [184] Woldehiwet Z., Sharma R., Evidence of immunosuppression by bovine respiratory syncytial virus, *Scand. J. Immunol.* 11 (1992) 75–80.
- [185] Wright S.D., Jong M.T., Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide, *J. Exp. Med.* 164 (1986) 1876–1888.
- [186] Wright S.D., Detmers P.A., Aida Y., Adamowski R., Anderson D.C., Chad Z., Kabbash L.G., Pabst M.J., CD18-deficient cells respond to lipopolysaccharide in vitro, *J. Immunol.* 144 (1990) 2566–2571.
- [187] Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C., CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science* 249 (1990) 1431–1433.
- [188] Yasui K., Becker E.L., Sha'afi R.I., Lipopolysaccharide and serum cause the translocation of G-protein to the membrane and prime neutrophils via CD14, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183 (1992) 1280–1286.
- [189] Yates W.D., A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle, *Can. J. Comp. Med.* 46 (1982) 225–263.
- [190] Yates W.D., Jericho K.W., Doige C.E., Effect of bacterial dose on pneumonia induced by aerosol exposure of calves to bovine herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica*, *Am. J. Vet. Res.* 44 (1983) 238–243.
- [191] Yates W.D., Jericho K.W., Doige C.E., Effect of viral dose on experimental pneumonia caused by aerosol exposure of calves to bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*, *Can. J. Comp. Med.* 47 (1983) 57–63.
- [192] Yoo H.S., Maheswaran S.K., Lin G., Townsend E.L., Ames T.R., Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide, *Infect. Immun.* 63 (1995) 381–388.
- [193] Yoo H.S., Rajagopal B.S., Maheswaran S.K., Ames T.R., Purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages, *Microb. Pathog.* 18 (1995) 237–252.
- [194] Younan M., Fodor L., Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17), *Res. Vet. Sci.* 58 (1995) 98.

Deuxième partie

CONTRIBUTION PERSONNELLE

4. Objectifs des recherches

A l'heure actuelle, il est unanimement reconnu que l'administration à grande échelle de substances médicamenteuses en élevage bovin pose non seulement le délicat problème de leur rémanence ou de celle de leurs résidus dans les produits de consommation mais également celui de l'impact des antibiotiques, clairement établi, sur l'émergence de maladies dues à la prépondérance de souches multirésistantes (Ferber, 2000 ; Angulo *et al.*, 2004 ; Molbak, 2004). Cette situation est par ailleurs particulièrement préoccupante dans notre pays puisque des études récentes démontrent que la Belgique fait partie des sept pays européens qui consomment le plus d'antibiotiques (Goossens *et al.*, 2005; Ferech *et al.*, 2006). Cette problématique dont la prise de conscience est pourtant relativement récente trouve son origine dans l'application par l'Homme envers les animaux de rente d'une pression de sélection qui s'exerce unilatéralement en faveur des critères relatifs aux productions alors que les bovins n'ont jamais été soumis à des pressions d'infection plus agressives qu'aujourd'hui, les microbes trouvant dans les conditions d'élevage concentrationnaires une niche de choix extrêmement propice à la contagion.

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

C'est dans ce contexte général que s'inscrit notre projet en présentant à long terme l'ambition de disséminer dans la population bovine des animaux résistants à la mannheimiose, une pleuropneumonie due à la bactérie *Mannheimia haemolytica*, dont la prévalence en spéculation bovine constitue un problème économique majeur tant au niveau belge qu'européen et mondial, avec des répercussions très élevées en termes de morbidité et de mortalité (Jensen *et al.*, 1976; Roth, 1986; Edwards, 1996).

Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur la spécificité d'espèce que *Mannheimia haemolytica* exhibe vis-à-vis des ruminants et ce, via l'interaction tout aussi spécifique entre son principal facteur de virulence, la leucotoxine, et le récepteur leucocytaire *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) des ruminants.

Ainsi, le premier objectif de cette recherche a consisté (i) à cloner, séquencer et caractériser les CD11a bovin, ovin et caprin, ainsi que les CD18 ovin et caprin (le CD18 bovin étant connu), (ii) à les comparer à (certains de) leurs homologues non ruminants en vue de l'identification de sites potentiels de mutation que l'on retrouverait sans équivoque chez les ruminants alors qu'ils brilleraient par leur absence chez les non ruminants et (iii) à évaluer l'impact potentiel de ces mutations sur la conformation de la protéine.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes donné les moyens d'étudier l'interaction leucotoxine/LFA-1 en (i) produisant, (ii) purifiant et (iii) validant du point de vue fonctionnel la leucotoxine sécrétée par une souche caractérisée de *Mannheimia haemolytica*.

Enfin, dans un troisième temps, nous avons essayé de cibler la portion du LFA-1 responsable de la spécificité d'espèce de *Mannheimia haemolytica* envers des ruminants via deux approches distinctes selon la zone du LFA-1 étudiée. En ce qui concerne la portion extracellulaire, nous avons tenté d'inhiber la liaison de la leucotoxine par une compétition avec des peptides synthétiques dessinés à partir des sites du LFA-1 incriminés dans la première partie des recherches. En ce qui concerne les sites se situant aux niveaux transmembranaire et cytoplasmique, nous avons procédé à l'ingénierie de lignées cellulaires lymphoblastiques exprimant de manière transitoire des récepteurs LFA-1 bovins mutants, dans l'optique d'étudier leur (in)sensibilité à la leucotoxine.

En résumé, ces recherches visent à mettre en évidence le motif moléculaire précis responsable de la spécificité d'espèces de *Mannheimia haemolytica* envers les ruminants, au sein de l'interaction leucotoxine/LFA-1, en vue de sélectionner des animaux naturellement plus résistants à la mannheimiose, la pathologie prédominante en spéculatation bovine.

5. Caractérisation du récepteur LFA-1 des ruminants

5.1. Matériel et méthodes

5.1.1. *Schéma général*

La réalisation de notre premier objectif, à savoir la comparaison inter-espèces des sous-unités CD11a et CD18 constituant le récepteur LFA-1, directement incriminé dans le caractère spécifique de la mannheimiose vis-à-vis des ruminants, nécessite *de facto* la connaissance des séquences codantes (CDS) de ces sous-unités chez les ruminants. A l'aube de ce travail, seules la séquence du CD18 bovin (GenBank M81233) et une séquence partielle du CD11a bovin (GenBank AF440778) étaient publiées. Nous avons donc entrepris le clonage, le séquençage et la caractérisation des CD11a bovin, ovin et caprin, ainsi que des CD18 bovin, ovin et caprin et ce à partir de leucocytes isolés d'un prélèvement sanguin (ou d'une lignée lymphoblastique pour les CD11a et CD18 bovins). La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) a été réalisée par transcription inverse à partir de l'ARN total extrait de ces cellules. La technique de *RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR* a permis l'amplification des extrémités des CDS à l'aide d'amorces nucléotidiques conservées chez l'homme, les bovins et/ou la souris. Après séquençage, des amorces furent dessinées dans les régions non traduites (*untranslated regions, UTRs*) 5' et 3' en vue d'une amplification totale par *RT-PCR*. Les séquences obtenues furent ensuite intensivement étudiées grâce aux nombreux logiciels que la bioinformatique met à notre disposition.

5.1.2. *Isolement des leucocytes*

Les leucocytes furent isolés à partir de sang ovin ou caprin par la méthode du Ficoll-Paque Plus. Brièvement, une vingtaine de millilitres de sang défibriné ou traité par un anticoagulant sont aliquotés par 2 ml, dilués deux fois avec la solution saline préconisée par le fournisseur puis déposés sur 3 ml de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Belgique). Après centrifugation à 400 g pendant 30 minutes à 20°C, la bande blanche correspondant aux cellules leucocytaires est aspirée et diluée dans la solution saline. Après une seconde centrifugation (100 g, 10 minutes, 20°C), le culot cellulaire est remis en suspension à une densité de 10^7 cellules par millilitre de milieu de culture (RPMI 1640 + 2 mM L-glutamine + 10 % de sérum fœtal bovin + 100 U/ml de pénicilline + 100 µg/ml de streptomycine + 1.3 µg/ml de fungizone, tous de la société Invitrogen, Belgique) et incubé à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂.

La lignée lymphoblastique bovine BL-3 (ATCC No. CRL-8037) est cultivée dans le même milieu.

5.1.3. *Extraction d'ARN*

Les cellules récoltées sont directement stimulées au *phorbol myristate acetate* (PMA), un mimétique du diacylglycérol connu comme stimulateur de l'expression des β_2 -intégrines, à raison de

25 ng/ml de milieu de culture pendant 15 minutes à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Les cellules sont ensuite centrifugées à 100 g pendant 10 minutes à 20°C. Le culot est lavé par du PBS (Invitrogen, Belgique) et centrifugé dans les mêmes conditions. Le nouveau culot est alors lysé par l'ajout d'un millilitre par million de cellules d'une solution phénolique dénaturante, le TRIzol (Invitrogen, Belgique) pendant 5 minutes à température ambiante, permettant la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Une extraction par le chloroforme permet ensuite de récupérer l'ARN dans la phase aqueuse. Après précipitation à l'isopropanol, le culot est lavé par de l'éthanol 75 %, séché et dissous dans de l'eau traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate) 1 %.

5.1.4. Obtention des extrémités de l'ADN complémentaire

RACE

Nous avons utilisé la technologie SMART RACE (Clontech Laboratories Inc., Belgique) pour cloner les extrémités 5' et 3' des différents CD11a et CD18. La RACE s'effectue en deux étapes : la première est la synthèse d'ADNc contenant un adaptateur déterminé en 5' ou 3' et la seconde permet l'amplification par *PCR* de chacune de ces extrémités à l'aide d'une amorce correspondant à cet adaptateur déterminé et d'une autre spécifique de la cible recherchée.

En ce qui concerne le choix des amorces spécifiques, nous avons tiré avantage des séquences connues des CD11a bovin (GenBank AF440778, partielle), CD18 bovin (GenBank M81233), humain (GenBank NM000211) et murin (GenBank NM008404) pour dessiner des amorces spécifiques censées conduire à l'obtention de produits d'environ 1kb. Parmi les différents oligonucléotides évalués, seuls les suivants se sont avérés fructueux :

3'-RACE CD11a bovin	5' – GGCTGAGTCTTGCTCGTTTGGAAACC – 3'
5'-RACE CD11a bovin	5' – CAGGTCTGGCCGGAACACTTCTTTC – 3'
3'-RACE CD11a ovin et caprin	5' – TGCAATGTRAGCTCTCCCATCTTC – 3'
5'-RACE CD11a ovin et caprin	5' – CCGGCCTCCTCTCTGCTCCCATAG – 3'
3'-RACE CD18 ovin et caprin	5' – GAARGAGAARCTCAAGTCCCARTGGAACAA – 3'
5'-RACE CD18 ovin et caprin	5' – ACCTGCAGACGCCGCACTCCATC – 3'

avec R = A + G

Les étapes de transcription inverse et de *PCR* ont été réalisées conformément aux instructions du fournisseur. Les produits de 5'- et 3'- *RACE* sont analysés sur gel d'agarose 1 % (p/v) et les fragments de taille attendue sont excisés du gel et purifiés à l'aide du *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Belgique).

Clonages

Les fragments purifiés sont ensuite « TA-clonés » dans le vecteur pCRII-TOPO (Invitrogen, Belgique) avant transformation de bactéries compétentes TOP 10 (Invitrogen, Belgique) et étalement sur LB agar + 100 µg/ml d'ampicilline (ou de kanamycine). L'identification des clones recombinants est effectuée par *PCR* sur colonie à l'aide d'amorces complémentaires de séquences plasmidiques se trouvant de part et d'autre de l'insert. La taille de la bande obtenue témoigne de la présence ou l'absence de l'insert. Les conditions de *PCR* sont les suivantes : chaque colonie est diluée dans un mélange réactionnel composé de 10 µl de Master Mix (Promega, Belgique), 0.5 µl de chaque amorce (M13 forward : 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' et M13 reverse : 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3', chacune à une concentration initiale de 10 µM) et de 9 µl d'eau. Les paramètres sont les suivants : 2 min 30 à 94°C, 25 cycles incluant (i) 30 s à 94°C, (ii) 30 s à 55°C et (iii) 2 min 30 (CD18) ou 3 min 30 (CD11a) à 72°C, suivis d'une extension finale de 10 min à 72°C. Les clones recombinants sont mis en culture (5 ml) dans un milieu sélectif LB + 100 µg/ml d'ampicilline (ou de kanamycine).

Séquençages

Les plasmides issus des clones recombinants sont isolés par mini-prep via le kit QIAprep (Qiagen, Belgique) puis séquencés dans les deux sens selon la technologie du Big Dye terminator sur un ABI-3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Belgique).

5.1.5. Obtention de l'ADN complémentaire entier**RT-PCR**

L'ADNc complémentaire entier des différents CD11a et CD18 est obtenu à partir d'ARN total de leucocytes de l'espèce d'intérêt soumis à une transcription inverse en utilisant le kit Improm II (Promega, Belgique) puis à une *PCR* à l'aide d'amorces dessinées suivant les séquences des extrémités obtenues au préalable :

Dans l'UTR-5' (CD11a bovin) :	5'-CCCAAGAGCCCTCTGAGACT-3'
Dans l'UTR-3' (CD11a bovin) :	5'-GCACCTCAATCTCCACCACT-3'
Dans l'UTR-5' (CD11a ovin et caprin) :	5'-GTCGCCAGTAAATCCCAAGA-3'
Dans l'UTR-3' (CD11a ovin et caprin) :	5'-GCACCTCAATCTCCACCACT-3'
Dans l'UTR-5' (CD18 bovin) :	5'-CAGCCTGGTGAAGAGCAGAG-3'
Dans l'UTR-3' (CD18 bovin) :	5'-GCATTTTTGGTTAACGGTGAAG-3'
Dans l'UTR-5' (CD18 ovin et caprin) :	5'-CAGCCTGGTGAAGAGCAGAG-3'
Dans l'UTR-3' (CD18 ovin et caprin) :	5'-GCAGAAGGCCTTGTCTTCAC-3'

Les conditions de *PCR* sont les suivantes :

Pour les CD11a et CD18 bovin : 25 pg d'ADNc sont dilués dans un mélange réactionnel composé de 5 µl de dNTP 2 mM, 5 µl de tampon A, 5 µl de tampon B, 1 µl d'élongase (Invitrogen, Belgique), 2 µl de chaque amorce (chacune à une concentration de 10 µM), le tout amené à 50 µl avec de l'eau.

Pour le CD11a ovin : 25 pg d'ADNc sont dilués dans un mélange réactionnel composé de 5 µl de dNTP 2 mM, 1 µl d'Advantage 2 polymerase (BD Clontech, Belgique), 5 µl du tampon correspondant, 1 µl de chaque amorce (chacune à une concentration de 10 µM), le tout amené à 50 µl avec de l'eau.

Pour le CD11a caprin : 25 pg d'ADNc sont dilués dans un mélange réactionnel composé de 5 µl de dNTP 2 mM, 0.2 µl de Platinum® Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen, Belgique), 5 µl du tampon correspondant, 1 µl de MgSO₄ 50 mM, 1 µl de chaque amorce (chacune à une concentration de 10 µM), le tout amené à 50 µl avec de l'eau.

Pour les CD18 ovin et caprin : 25 pg d'ADNc sont dilués dans un mélange réactionnel composé de 25 µl de Master Mix (Promega, Belgique) contenant de la Taq polymérase, 1 µl de chaque amorce (chacune à une concentration de 10 µM), le tout amené à 50 µl avec de l'eau.

Les paramètres de l'amplification sont 2 min 30 à 94°C, 35 cycles incluant (i) 30 s à 94°C, (ii) 45 s à X°C et (iii) 2 min 30 (pour le CD18) ou 3 min 30 (pour le CD11a) à 68°C, suivis d'une extension finale de 10 min à 68°C, avec X = 56°C pour le CD11a bovin, 60°C pour le CD11a caprin, 58°C pour le CD18 bovin et le CD11a caprin, 53°C pour les CD18 ovin et caprin.

Clonages et séquençages

Les produits de *PCR* obtenus sont ensuite traités comme décrit aux points 2.4.2 et 2.4.3.

Dix-huit amorces (neuf dans le sens direct et autant dans le sens indirect) se sont avérées nécessaires afin de couvrir l'entièreté des CD11a :

M13 forward :	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 reverse :	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
CD11a sens 1 :	5'-TGCCAGTCACACTGAGTTCC-3'
CD11a sens 2 :	5'-GTTGGCTGGAGTCAAACACA-3'
CD11a sens 3 :	5'-TTCAACATGGAGCTGTCCTC-3'
CD11a sens 4 :	5'-AGACGGAGCTGTTGCTGATT-3'
CD11a sens 5 :	5'-TCATCACAAGCGTGTCTTC-3'
CD11a sens 6 :	5'-CCTGAAACCCTCACCACACT-3'
CD11a sens 7A (bovin):	5'-TGAGCTGCAACAATGAGGAC-3'
CD11a sens 7B (ovine et caprine):	5'-TGAGCTGCGACAATGAGAAC-3'
CD11a sens 8A (bovin):	5'-CCTCCATGTTGAGCCTCTGT-3'
CD11a sens 8B (ovine et caprine):	5'-CCTCCATGTTGAGCCTTTCT-3'

CD11a rev 1 :	5'-GGTTGTCACCTGTGGGGTCT-3'
CD11a rev 2 :	5'-AGCACTTTGGTGGCATCTG-3'
CD11a rev 3 :	5'-TCCTGCCCTCGATTCTACTG-3'
CD11a rev 4 :	5'-GCCACGTCTGTCAGCTCAT-3'
CD11a rev 5 :	5'-CCATCCAGCTGCAGAGTGT-3'
CD11a rev 6 :	5'-GTGACCTGGACCCAGTAAGC-3'
CD11a rev 7 :	5'-ATGGTGGATCCTGGGACTCT -3'
CD11a rev 8 :	5'-CCGCTCAGCACGTAGAGATA-3'

Quatorze amorces (sept dans le sens direct et autant dans le sens indirect) se sont avérées nécessaires afin de couvrir l'entièreté des CD18 :

M13 forward :	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 reverse :	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
CD18 sens 1 :	5'-CTGAACTTCACAGGGCAAGG-3'
CD18 sens 2 :	5'-CATTGGTTTCGGGTCCTC-3'
CD18 sens 3 :	5'-CCACCTGGAAGACAACCTGT-3'
CD18 sens 4 :	5'-AGCAGCAGTCCTTACCATC-3'
CD18 sens 5 :	5'-CAACTGCGAACGCTACGAC-3'
CD18 sens 6 :	5'-GCTGCTGGATGACCTACACC-3'
CD18 rev 1A (bovin):	5'-TAGAGCGTCACTTCCTGTGG-3'
CD18 rev 1B (ovin et caprin) :	5'-TAGAGAGTCACTTCCTCTGG-3'
CD18 rev 2 :	5'-CTGCTTCCCGACTTCTGTCT-3'
CD18 rev 3 :	5'-GATAAGCTCCACCACGTTCC-3'
CD18 rev 4 :	5'-GCAGTTCTTCCCGATGTAGC-3'
CD18 rev 5 :	5'-CAGCCCTGAGTGGACTTGAG-3'
CD18 rev 6 :	5'-CAGATGACCAGCAGGAGGAT-3'

La séquence du CD11a bovin (GenBank AY267467) a été déduite à partir de cinq clones indépendants, celles du CD11a ovin ont été déduites à partir de neuf clones indépendants (GenBank AY731091 et AY731092), de même que celles du CD11a caprin (GenBank AY773018 et AY773019). La séquence du CD18 bovin obtenue correspond à celle publiée (GenBank M81233) tandis que les séquences du CD18 ovin ont été déduites à partir de neuf clones indépendants (GenBank AY484425 et AY484426) et celle du CD18 caprin à partir de six clones indépendants (GenBank AY452481).

5.1.6. Bioinformatique

Plusieurs logiciels ont contribué à ce travail : les amorces ont été dessinées à l'aide de Netprimer (Netprimer, sans date) et Primer 3 (Rozen et Skaletsky, 2000), les analyses et comparaisons de séquences ont été effectuées respectivement avec les programmes Chromas v.2.21 (Chromas, 2004) et BLAST (Altschul *et al.*, 1990), les alignements des séquences protéiques sont réalisés par GeneDoc

v.2.6.002 (Nicholas *et al.*, 1997) selon la matrice BLOSUM 62, la présence d'un peptide signal est évaluée par SignalP v.2.0.b2 (Nielsen *et al.*, 1997), les sites de N-glycosylation potentiels sont proposés par NetNGlyc v.1.0 (Jensen *et al.*, 2002) et les prédictions de structures secondaires par GOR IV (Garnier *et al.*, 1996 ; Combet *et al.*, 2000). Les analyses de structure tridimensionnelle sont effectuées à l'aide de Swiss-PdbViewer v.3.7. (Guex et al. 2003).

5.2. La sous-unité CD11a

5.2.1. Description

Les séquences de l'ADN complémentaire des CD11a bovin (GenBank AY267467), ovin (GenBank AY731092) et caprin (GenBank AY773019) contiennent ~ 4500 pb avec un cadre de lecture ouvert de 3498 pb codant pour 1165 acides aminés, suivi de 500 à 1000 pb dans l'UTR-3' (figures 4 à 6). Pour les CD11a ovin et caprin, un second allèle a été identifié (respectivement GenBank AY731091 et AY773018), codant pour 1164 acides aminés (3495 pb).

Les CD11a bovin, ovin et caprin contiennent un peptide signal potentiel de 23 résidus, un domaine extracellulaire de 1061 ou 1062 résidus (24-1084/1085), une région transmembranaire de 24 résidus (1085/1086-1108/1109) et une courte queue cytoplasmique de 57 résidus (figures 4 à 8). Le domaine extracellulaire contient un domaine inséré ou *I domain* de 172 résidus (153-324) très proche de ceux trouvés dans les sous-unités α des intégrines séquencées à ce jour et localisé entre les feuillets β 2 et 3 d'une *seven bladed β -propeller region* (Huang et Springer, 1997). Le *I domain* est homologue aux domaines répétés du facteur de von Willebrand et de la *cartilage matrix protein* (Springer, 1990) et peut être exprimé en tant que domaine isolé. Sa structure tridimensionnelle consiste en un coeur de cinq feuillets β parallèles entourés d'hélices α , avec d'un côté, un court brin antiparallèle (Qu et Leahy, 1995). Le *I domain* contient un site d'adhésion dépendant des ions métalliques (*metal ion dependent adhesion site*, MIDAS) (Lee *et al.*, 1995) constitué des résidus 159-163, 228 et 261 et un *I-domain allosteric site* (IDAS) qui joue un rôle fonctionnel dans la liaison d'ICAM-1 (Huth *et al.*, 2000; Lupher *et al.*, 2001; Lum *et al.*, 2002). Trois répétitions avec un motif de liaison des cations divalents sont également présentes (résidus 465-473, 527-535 et 587-595) (figure 7).

Les CD11a bovin, ovin et caprin matures contiennent respectivement 22, 21 et 19 résidus cystéyles, dont, toujours respectivement, deux, un et un dans la portion cytoplasmique, ainsi que huit, sept et neuf sites de N-glycosylation potentiels (Asn-X-Thr/Ser), tous localisés dans la région extracellulaire (figure 7). Tous les résidus cystéyles et tous (sauf un) les sites de N-glycosylation potentiels se trouvent à l'extérieur du *I domain* et des motifs de liaison des cations divalents (figure 7), en accord avec l'hypothèse que ces régions pourraient subir des changements conformationnels importants lors de la liaison du ligand (Rothlein et Springer, 1986; Larson *et al.*, 1989).

1:		<u>M N S C I I V L R L L L L S G P P F V F A P A W S Y N L D V R H V Q</u>	32
-54:	CCAAGAGCCCTCTGAGACTATACCTGGGCTGGCTCCCTCCAGCTGGCTTGAAGGATGAATTCCTGCATCATCGTGC	AGGTTGCTGCTGCTGCTGGACTTTTGCTTTTGCCCGACCTGGAGCTACAACCTGGATGTGCGACATGTGCAA	96
33:	N F S F P L A G R H F G Y R V L Q V G N G V V V G A P S E G N S M G N L Y Q C Q P E T G D C L P V T		82
97:	AACTTCTCCTTTCCACTTGCCTGGAGGCATTTGGGTACCCTCTCTGCAAGTTGGAAATGGGGTTCTCGTGGGAGCTCCAAGCGAAGGGAACAGCATGGGAAACCTGTATCAATGCCAGCCAGAACTGGAGCTCCCTGCCAGTCA		246
83:	L S S N Y T S K Y L G M T L A T D P T S D N L L G C D P G L S R T C D C N I Y L S G L C Y L I H E N		132
247:	CTAGTCCCAAGTACTCCAAAGTACTTGGGAATGACCTTTGGCAACAGACCTTGGACCAACCTGTTGGACTGTGATCCTGGCTGTCTCGAATCATGTGACCCAGAACATCTATCTAAGTGGTCTGTGTACCTCCAGCAGAAAC		396
133:	L R G P V L Q G H P G Y Q E C I K G N V D L V F L F D G S M S L Q Q D E F E K I V D F M R D V M K K		182
397:	CTGAGGGTCCGGTGTGCAAGGGCACCTGGTTATCAGGAATGTATAAAGGGCAACGTAGACTTGGTATTTCTGTTTGGATGGCTCAATGAGCTTGCAGCAAGATGAATTTGAGAAAATTTGGACTTCATGAGGGATGTGATGAAGAAA		546
183:	L S N S S Y Y Q F A A V Q F S T Y F R T E F T F L D Y I R Q K D P D A L L A G V K H M R L L T N T F G		232
547:	CTCAGCAACTTTTCTAGCAATGAACCAATGACCTTTCAGTTTCTACATATTTTCAGAACAGAACTTACTTCTTGGYACATITAGACADPCCCTGACCTCTGTGGCTCAAACACATGGCTTTGTGGCCAGCACTTTGGT		696
233:	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 K P P T N T T L M R P K T S S R S L L G		282
697:	GCCATCAACTATGTTGGAAAAGTGTTCGGCCAGACTGGGAGCCCGCCAGATGCCACCAAAGTGTATCATCATCACGTATGGGAAGCCCGCAGCAACACAACTTGTGCGCCAAAGACATCATCCGCTCATTATTGGGG		846
283:	I G K N F K T K E S Q E A L H Q F A S A K P V E E F 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		332
847:	ATCGAACAATTTTAAAGCAAGAAAGTCAAGAGCCGCTCCACTGACGTTCAGCTTCAGACTTGGCTCCAAAGTTCACCCCGTGGAGAGTTGTAAAGCTCTGAGAGCTGAAAAGATCTATTACCAGCTGCAAAAAAGATCTATGGC		996
333:	G T S K Q D L T S F N M E L S S S G I S A D L S E G H G V V G A V G A K D W A G G F L D L K A D L K		382
997:	GGCACAAGCAAACAGGACTGACATCCTTCAACATGGAGCTGTCTCCAGCGGGATCAGCGGGACCTCAGCGAGGGCCATGGCGTTGTGGGGCCCTGGAGCCAAGGACTGGGCTGGGGGCTTTCTCGACCTGAAGGCAGACTGAAA		1146
383:	S S T F V G N E P L T V E S R A G Y L G Y T V T R L P S R G T M S L L A T G A P K Y Q H V G R V L L		432
1147:	ATCGAACAATTTTAAAGCAAGAAAGTCAAGAGCCGCTCCACTGACGTTCAGCTTCAGACTTGGCTCCAAAGTTCACCCCGTGGAGAGTTGTAAAGCTCTGAGAGCTGAAAAGATCTATTACCAGCTGCAAAAAAGATCTATGGC		1296
433:	F O Q P K R G G P W S Q I Q E I D G 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		482
1297:	TTCCAACAGCCAAAGAGAGGAGGACCCCTGGAGCCAGATCCAGGAAATAGATGGGATCCAGATTGGCTCTTATTTTGGTGGCGAGTTGTGTGGCTTGACGTGGACAGAGATGGGAGACGGAGCTGTGTGCTGATGGAGCCCCCTGTAC		1446
483:	Y G E O R G G R V F I Y Q K I Q L E F Q M V S E L Q G E T G Y P L G R F G G A A I A A L L T D I N G D E		532
1447:	TTCGGAGACAGAGAGGAGGAGGACCCCTGGAGCCAGATCCAGGAAATAGATGGGATCCAGATTGGCTCTTATTTTGGTGGCGAGTTGTGTGGCTTGACGTGGACAGAGATGGGAGACGGAGCTGTGTGCTGATGGAGCCCCCTGTAC		1596
533:	L T D V A V G A P L E E O G A V Y I F N G Q Q G G L S P R P S Q R I E G T O M F S G I Q W F G R S I		582
1597:	CTGACAGACGTGGCTGTGGGAGCCCTGGAGGAGCAGGGGGCCGTGTACATCTTCAATGGGCAACAGGGGGGCTGAGCCCGCCAGTCAAGGATAGAGGGACCCAGATGTTCTCAGGAATTCATGTTTGGAGCTCCATC		1746
583:	H G V K D L C G G D G L A D V A V G 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		632
1747:	CAGGGTGAAGGACTCCGGGGATGGCTGGCAGATGTGGCTGTGGGGCTGAGGGCCAGTGTGATCTCAGCTCCCGCCCTGGTGGGACATCAACAAGCTGTCTCTCCCGCCGAGATCCCAAGTCCAGTCAAGTCCAGT		1896
633:	C S Y S T S N Q K K E G V N L T V C F Q V K S L I S T F Q G H L V A N L T Y T L Q L D G H R T R S R		682
1897:	TGCTCCTATTCCACAGCAACCAAGAAGGAGCGTTAACCTCACAGTCTGTTCAGGTCAGTCTCTCATCTCCACCTTCAAGGGCAGCTGGTTGCCAACCTACTTACACTCTGAGCTGGATGGCCATCGGACCCGAAGCGG		2046
683:	G C T F P G G K H K L I G N T A V T 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		732
2047:	GGTTGTTPCCAGGAGCAACAACTCATCGGAACACAGCTGTACCCCTTCCAGTCTCTGTTGTGTTCAGTTTCCAGTATGCATTCAGATCATCTCCATCAAGCTCTCCCTAAGCTACTCTCTCTGGAG		2196
733:	E E G T P R D P R A L D R D I P P I L K P S P H L E T K E I P F E K N C G E D K N C E A D L K L A F		782
2197:	GAAGAAGGACACCAGGAGCCAGGGCGCTGGACAGGGACATCCGCCCCTCTGAAACCTCACACACTTGGAGACCAAGGAGATTCCTTTTGAGAAGAAGCTCGGAGAGGACAAGAATGTGAAGCAGACTGAAGCTGGCCTTC		2346
783:	S D M R S K I L R L T P S A S L S V R L T L R N T A E D A Y W V Q V T L S F P Q G L S F R K V E I L		832
2347:	TCCAGATGAGATCCAAAATCCGCTCTGACCCCTCTGCCAGCTCTCTGTGAGGCTGACATGAGGAACACAGAAATGCTTACTGGTCCAGTCCACCTCCCGGACTCTCCCAAGCTACTCTCTCTGGAG		2496
833:	K P H S H V P V G C E E L P E E A V V H S R A L S C N V S S P I F G E D S M V D I Q V M F N T L Q K		882
2497:	AAGCCCCACAGCCATGTACTGTGGGCTGCGAGGAGCTCCCTGAGGAGCCGTAGTGACAGCAGGGCCCTCTCTGCAATGTGAGCTCTCCATCTTCCGAGAAGACAGCATGGTTGATATCCAGTGATGTTAATACCTGCAGAAA		2646
883:	G S W G D F I E L Q A N V S C N N E D S S L L E D N S A T T S I P V M Y P I N V L T K D Q E N S T L		932
2647:	GGCTCCTGGGGGATTTATCGAGCTGCAGGCAATGTGAGTCCNAACAAATGAGACTCAAGCTCTCGAGGACCAACTCGCCACCACCAGCATCCCTGTCTATGATGATCCCAATGACTTCCAGAGGATCCCTCGTCCAGTGAACGGGATG		2796
933:	Y I S F T P K S P R I H H V K H I Y Q V R I Q P S N Y D N M P P L E A L V R V P R V H S E G L I T H		982
2797:	TATATCAGTTTACCACCAAGAGTCCAGGATCCACATGTCAAGCACATTTACAGGTGAGGATCCAGCTTCTAACTATGACAACATGCCCCACTGGAGGCTTGGTTAGGATACCAGGGTGACAGCGAGGGCTCATACCCAC		2946
983:	K W S I Q M E P P V N C S P R N L E S P S D E A E S T S I P V M Y P I N V L T K D Q E N S T L		1032
2947:	AAGTGAGCATAQAGATGGAGCTCCAGTCACTGCAGCCCCAGAAATCGAGAGTCCATCTGATGAGCTGAGCTTGTCTGTTGGAACCGAGTTCCGCTGCCCAATGACTTCCAGAGGATCCCTCGTCCAGTGAACGGGATG		3096
1033:	V E L R G T I K A S S M L L C S S L A I S F N S S K H F H L H G R N A S M A Q V V M K V D L V Y E		1082
3097:	GTGGAGTTGAGGGGACGATCAAGGCTCTCTCATGTTGAGCTCTGTAGTCCCTCGCTATCTCTTCAACAGCAGCAAGCATTTCCACCTCCATGGCAGGAACCCCTCCATGGCCAGGTCGTATGAAGGTTGACCTTGTATATGAG		3246
1083:	K E M L Y L Y V L S G I G G G L L L F L I F I A L Y K V G F F K R N L K E K M E A N V D A S S E I P		1132
3247:	AAAGAGATGCCTATCTACTGCTGAGCGGAATCGGGGGCTGTGTTGTTCTCTGTTTCTATAGCTCTGTGACAAAGTTGGTTTCTTCAAACCGAACTGAAGGAGAAGATGGAGGCAACGTAGATGCTTCCAGTGAATCCCT		3396
1133:	G E D A G E K E C K D P G C L E P L Q K T D E D G S G G D *		1165
3397:	GGAGAAGATGTGGGACGGAGTTGGAGAAGAGTGAAGGACCCAGCTGCCTGGAGCCCTCCAGAAGACGGATGAGGACGGAAGTGGTGGAGATTGAGGTGC		3503

Figure 4 : Séquences nucléotidique et protéique du CD11a bovin
 Le peptide signal potentiel et la région transmembranaire sont soulignés.

1:		<u>M N S Y T I V M R F L L S G P F V F A P A W S Y N L D V R H V Q</u>	32
-55:	GTGCCAGTAAATCCCAAGAGCCCTCTGGGGTGGCTCCCTCCAGCCGCCGTAAGATGAATTCCTACACCATCGTGATGAGGTTCTCTGCTGTCTGGGCCTTTTGTCTTTGCCCCAGCCCTGGAGCTACAACCTGGATGTGCGACACGTGA		95
33:	S F S F P L A G R H F G Y R V L Q V G N R V V V G A P N E G N R M G N L Y Q C O P E T G D C L P V T		82
96:	AAGTCTCTCTCCACTTGCCTGGGAGGCATTTTGGGTACCGTGTCTGCAAGTGGGAAACAGGGTGTGTGGGAGCTCCAATGAAGGAAACAGGATGGGAAACCTGTATCAGTGCCAGCCAGAACTGGAGACTGCCTGCCAGTCA		245
83:	L S S S Y T S K Y L G M T L A T D P T S G N L L A C D P G L S R T C D D G N I Y L S G L C Y L I H E N		132
246:	ACTGAGTCCAGTACTTCCAAAGTACCTTGGGAATGACCTTGGTATGATGACCAACAGACCCCAAGTGGCAACCTTTGGCTCTGCTGGCTGTCTGCAACATCTGACCAAGAACATCTATCTAAGTGGTCTCTCYACTCCACAGAA		395
133:	L R G P V L Q G Y P G Y Q E C I K G N V D L V F L F D G S M S L Q Q D E F E K I V D F M K D V M K K		182
396:	TCTGAGGGTCCCCTGCTACAAGGGTACCTGGTTATCAGGAATGTATAAAGGGCAACGTAGACTTGGTATTTCTGTTTGTATGGCTCAATGAGCTTGCAGCAAGATGAATTTGAGAAAATTTGGACTTCATGAAGGATGTGATGAAGAA		545
183:	L S N S S Y Q F A A V Q F S T D F K T E F T F L D Y N R Q K D P D A L L A G V K H M R L L T N T F G		232
546:	ACTGAGCAACTTTGCTGCGGCTGTTCAAGTCTTCTAGTCTTCTAGAGATTCAAACAGAACTTACTTCTTGGATTACAANTAGACGAGGACCTTCCAGAGGATGATGATGCTGGCTGGAGTCAAACACATGCGTTTGGTCCAAAGCTTTGG		695
233:	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		282
696:	TGCCATCAACTATGTTGCGAAAAGTGTTCGGCAAGAGCTGGGAGCCCGCCAGATGCCACCAAGTCTTATCATCATCACTGATGGGGAAGCCACCGACGAACAGAACATTGATGCGGCCAAAGACATCATCCGTACATCATTTGG		845
283:	I G K N F K T K E S Q E A L H Q F A S K P V E F 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		332
846:	GATTGGAACTTTAAGACAAAGAAAGTCCAGAGGCGCTCCACTCAGTTGCTTCCAAACCCGTGAGGAGTTGTAAAGATCTGACGATCCGAGGAGACCTTACCCGAGCTGCAGAAAGATCATGTCAGTATTA		995
333:	G T S K Q D L T S F N M E L S S S G I S A D L S E G H G V V G A V G A K D W A G G F L D L K A D L Q		382
996:	GGCACAAAGCAACAGGACCTGACATCCTTCAACATGGAGCTGTCTCCAGCGGGATCAGTGGGACCTCAGTGGGGCCATGGCTTGTGGGGCCGTGGAGCCAAGGACTGGCTGGGGCTTTCTCGACTGAAGGCAGACCTGCA		1145
383:	S S T F V G N E Q P T V E S R E G Y L L G Y T V T W L P S R G M M S L L A T G A P R Y Q H V G R V L L		432
1146:	GAGCAGCAACTTTGTTGGGAATGAAACACCGACAGTAAATCGAGGAAAGTAAATTTGGGCTGACGTTGCTGCTCCAGGAGGATGATGATGCTGGCTGGAGTCAAACACATGCGTTTGGTCCAAAGCTTTGGTCCAAAGCTTTGG		1295
433:	F Q Q P K R G G P W S Q I Q K I D G 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		482
1296:	GTTCCAACAGCCAAAGAGAGGAGGACCTGGAGCCAGATCCAGAAAATAGACGGGATCCAGGTTGGCTCTTATTTTGGTGGCGAATTTGTGGCGTGTGAGTGGAGAGATGGGAGACAGAGCTGTTGCTGATGACGCCCTCTGTA		1445
483:	Y G E Q R G G R V F I Y Q K I Q L G F Q M V S E L Q G G E T G Y P L L G R F G A A I A A L T D I N G D E		532
1446:	CTATGGGAGAGAGAGGCGGGTGTATCTACCGAAATACAGTGGGTTCCAAATGCTCAGAGGAGGAGGAGTCCCGCTGGAGGATGATGATGCTGGCTGGAGTCAAACACATGCGTTTGGTCCAAAGCTTTGGTCCAAAGCTTTGG		1595
533:	L T D V A V G A P L E D Q G A V Y I F N G Q Q G G L S P R P S Q R I E G T Q M F S G I Q W F G R S I		582
1596:	GCTGACGGAGCTGGCTGTGGGAGCCCTCTGGAGGATCAGGGGGCTGTGTACATCTCAATGGGAGCAAGGGGGCTGAGCCCGGCCAGTCCAGCGGATAGAAGGACCCAGATGTTCTCAGGAATTCATGTTTGGACGCTCCAT		1745
583:	H G V K D L G G D G L A D V A V G A E G 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 R E V E		632
1746:	CCACGGGTGAGAGGAGGCGGGTGGCTGGCAGATGTGGCTGGGGCTGAGGCGCAGTGTGTGCTCAGCTCTCGGCTGTGGTAGACATCATCAAGCATGTCTTCTCCCGCCGAGATCCAGATCCAGTGAAGTCA		1895
633:	C S Y S T S N Q E K E G V N I T V C F Q V K S L I S T F E G H L V A N L T Y T L Q L D G H R T R S R		682
1896:	GTGCTCTATTCACAGCAACAGGAGAAGGAGGCGTTAACATCAGTCTGTTTCCAGGTCAGTCTCTCATCTCCACCTTCGAAGGGCACCTGGTTGCCAACCTCACTTACACTCTGACGCTGGAGCCCATCGGACCCGAAGCCG		2045
683:	G L T F P G G G K H E L N G N T A V T 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		732
2046:	AGGTTGTTCCAGGAGAACACGAACTCAATGGGAACACAGCTGTCACTCTGTCAAGCTCTGTTATGTTTCCGATTCAGATTCAGATTCATCTCCCATCAACGTTCCTCCCTAAGTTACTCTCTCTGTTGGGA		2195
733:	E E G T P R D P R A Q G R D I Q P I L K P S P H L E T K E I P F E K N C G E D K T C E A D L K L A F		782
2196:	GGAAGAAGGACACCGAGGACCAAGGGCGCAGGGCAGGACATCCAGCCATCTGAAACCCCTACCACACTTGGAGACCAAGGAGATCTCTTTGAGAAGAACTGCGGAGAGGACAAGACTTGTGAGGCAGACTGAAGCTGGCCCT		2345
783:	S D M R S K I L H L T P S A S L S V R L T L R N T A E D A Y W V Q V T L S F P Q G L S F R K V E A L		832
2346:	CTCCGATGATCCAAAATCTGACCTGACCCCTCCGCCAGCCTCTCTGTGAGGCTGACACTCGGAAACACAGAGAGTCTTACTGGTCCAGTCCACCTTCCCGCAGGACTCTCATTCGCAAGTGGAGGCGCT		2495
833:	K P H S H V P V G C E E L P E E A I L Q S R A L S C N V S S P I F G A D S M V D I Q V M F N T L Q K		882
2496:	CAAGCCACAGCCATGTACTGTGGGCTGTGAGGAGCTTCTGAGGAGCCATATGACAGAGCAGGGCCCTCTCTGCAACGTGAGCTCTCCATCTTCGGAGCAGACAGCATGGTTGATATCCAGGTGATTTTAAACGCTGCAGAA		2645
883:	G S G D L I E L H A N V S C D N E N S S L L E D N S A T A S I P V M Y P I N I L T K D Q E N S T L		932
2646:	AGGCTCTGGGGGATTTGATCGAGCTGCACGCAATGTGAGCTGCACAACTGAGAACTCAAGCTCTGAGGAGTCCAGCTCCGCGCCAGCCAGCAGCTCCCTGTACATGACATCAACATCCACCAAGGACAGGAACTCCACGCT		2795
933:	Y I S F T P K S P K I H H V K H I Y Q V R I Q P S N Y D N V P P L E A L L V R V P R V H S E G L I T H		982
2796:	GTATATCAGTTTACCCCCAAGAGTCCCAAGATCCACCATGTCAAGCACATCTACCAGGTGAGGATCCAGCCTTCTAATATGACAACGTGCCCCACTGGAGGCTTGGTTAGGTTACCACGGGTGCACAGCGAGGGCTCATCCCA		2945
983:	R W S I Q M E P P V N C S P R N L E S P S D V A E P C S F G T E F W V Q V T L S F P Q G L S F R K V E A L		1032
2946:	CAGGTGGAGCATAQAGATGGAGCTCCAGTCAACTGCAGCCCAAGAACTTGGAGAGTCCATGTGAGCTGAGCCTTCTGAGTCTGGAGTCCAGTCCGCAATCCAGTCCAGGAGGATCCCTTGGTCCAAAGTGAAGGAC		3095
1033:	V E L R G T I K A S S M L S L L C S S L S I S F N S S K H F H L Y G S N A S M A Q V V M K V D L V Y E		1082
3096:	GGTGGAGTTGAGGGGACGATCAAGGCTCTCCATGTTGAGCTTTGTAGCTCCCTCTCCATCTCTTCAACAGCAGCAAGCATTTCACCTCTATGGAGCAACGCCTCCATGGCCAGGTGCTCATGAAGGTTGACCTGTATATGA		3245
1083:	K K M L Y L Y V L S G I G G L L L L L I E I A L Y K V G F F K R N L K E K M E A N V D A S S E I P		1132
3246:	GAAAAAGATGCTCTATCTACGTGCTGAGTGAATCGGGGGCTGTGTTGCTGCTCTCTGATTTTCATAGCTCTGTCAAGTGTGGTTTCTCAAACGAACTGAAGGAGAAGATGGAGGCAATGTAGATGCTTCCAGTGAATCCC		3395
1133:	G E D A G O P E L E K E F K D P G C L E P L Q K E D E D G S G G D *		1165
3396:	TGGAGAAGATGCTGGGAGCCGAGTTGGAGAAAGAGTTCAAGGACCCAGGCTGCTGGAGCCCTCCAGAAGGAGGATGAGGATGGAAGTGGTGGAGATTGAGGTGC		3503

Figure 5 : Séquences nucléotidique et protéique du CD11a ovine

Le peptide signal potentiel et la région transmembranaire sont soulignés. Les deux séquences obtenues diffèrent par la présence/absence d'une glutamine en position 743 (#).

1: M N S C T I V M R F L L S G P F V F A P A W S Y N L D V 28
 -68: GTCCAGTAAATCCCAAGACCCCTCTGAGGCTATACTGGGGTGGCTCCCTCCAGCCGGCTTGAAAGATGAATTCCTGCACCATCGTGATGAGGTTCCCTGCTGTCTGGGCTTTTGTCTTTGCCCCAGCCTGGAGCTACAACCTGGATG 82
 29: R H V Q N F S F P L A G R H F G Y R V L Q V G N R V V V G A P N E G N R M G N L Y Q C Q P E T G D C 78
 83: TGCACATGTACAAAACCTTCCTCCTCCACTTGTCCGGGGAGGCATTTTGGTACCGTGTCTGCAAGTGGGAAACAGGGTTGTTGTTGGGAGCTCAAATGAAGGGAACAGGATGGGAAAACCTGTATCAGTGCACGGCAGAAAACCTGGAGACT 232
 79: L P V T L S S S Y T S K Y L G M T L A T D P T S G N L L A C D P G L L G C D P G L S R T C D Q N I Y L S G L L C Y L 128
 233: GCCTCAGTACACACTGAGTTCAGCTTACCTCCAGTACTTGGAAAGTACCCTGCAGAACCCAGTGAACCCCAAGTGGCAACCTTTTGGCTGTGATCCTGGGCTGTCTCGAATCATGTGACCAGAACATCTTAAGTGGCTCTCYTTACC 382
 129: I H E N L R G P V L Q G H P G Y Q E C I K G N V D L V F L F D G S M S L Q Q D E F G K I V D F M K D 178
 383: TCATCCATGAGAATCTGAGGGGTCCCGTGTACAAGGACCCCTGGTTATCAGGAATGTATAAAGGGCAACCTGAGACTTGGTATTCTGTTTGTGATGGCTCAATGAGCTTCGACGAAGTGAATTTGGGAAAATTTGGACTTTCATGAAGG 532
 179: V M K K L S N S S Y Q F A A V Q F S T D F K T E F T F L D Y N R Q K D P D A L L A G V K H M R L L T 228
 533: ATGTCATGAAGAACTCAGCAAACCTTCCTTACCAAGTCTGCGGCTGTTTCAAGTTCCTACAGATTTCAAAGCAGAATTTTACTTGATTTACAATAGACAGGACCCTGACGCTCAGCGTCTGTTGGCTGGAAGTGAAGATCTATTACCCGAGTCAAGGAGG 682
 229: 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 278
 683: CCAACACCTTGGTGCCATCAATATGTTGCGAAAGAAGTGTCCGGCAAGAGCTGGGAGCCGCGCCAGATGCCACCAAAGTCTTATCATCATCACTGATGGGGAAGCCACCAGCACAGAACATTTGATCGCGCAAAGACATTTATCC 832
 279: Y I I G I G K N F K T K E S Q E A L L G C Q F A S K P V E E F V K I L D T F E K L K D L F T T E L Q K K I 328
 833: GCTACATCTGGGATGGAAAGAACTTTAAGACCAAGAAAGTCAAGAGGAGLCTCCATCAGTTCAGGCTCCAAACCCCTGAGGAGGATTTGGAAGATTCAGACACTTTGAGAAGCTGAAAGATCTAATCCAGAGTCAAGGAGGAGG 982
 329: Y V I E G T S K Q D L T S F N M E L S S S G I S A D L S E G H G V V G A V G A K D W A G G F L D L K 378
 983: TCATGTTATTGAGGGCACAAAGCAACAGGACCTGACATCCTCAACATGGAGCTGTCTCCAGCGGAATTAGCGAGAGCTCAGCGAGGGCCATGGTGTGTTGGGGGCCGTTGGAGCCAAAGACTGGGCTGGGGGCTTCTCGAGCTGA 1132
 379: A D L Q S S T F V G N E Q L T V E S R E G Y L T G G Y T V T W L P S R G T M S L L A T G A P P R Y Q H V G 428
 1133: AGCGATGACGAAAGTCAAGCAATGTTGTTGGGAATGAACAACCTGAGAGTCAAGCAAGTTCAGGCAAGTTCAGGCTCCAGGCTCAGGCTTCCTGATGATGTTGGTTCAGGCTCAGGCTCCGCGAGGACCTGAGCTGAGAGAGATGGGAGAGAGAGTGTGTGCTGATTG 1282
 429: R V L L F Q Q P K R G G P W S Q I Q K I D G 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 478
 1283: GGCGGTTGCTGTGTTCCAAACAGCCAAAGAGAGAGGAGCCCTGGAGCCAGATCCAGAAAATAGATGGGATCCAGGTGGCTCTTATTGTTGGTGGCAGTGTGTGGCGTTGACGTGGACAGAGATGGGAGAGAGAGTGTGTGCTGATTG 1432
 479: A P L Y Y G E Q R G G R V F I Y Q K I Q L G Q M V T S E L Q G E T G Y P L G R F G A A I A A L T D I 528
 1433: CAGCCCTGTACTATGGGAGCAGAGAGGAGGCGGTTTATCTACCAGAAAATACAGTGGGGTTCCAAAAGTCTCAGAGGAGCCAGCCAGCTACCCTTTGGACGATTTGGAGCCCAATCGCTGCCAGCAAGCA 1582
 529: N G D E L T D V A V G A P L E E Q G A V Y I F N G O Q Q G G L S P R P S Q R I E G T Q M F S G I Q W F 578
 1583: TCAATGGGGATGAGCTGACGGACGTGGCTGTTGGAGCCCTCTGAGGAGAGGCGGCTGTGATATCTTCATGAGCGAGCAAGGGGGCTGAGCCCGGGCCAGCTCAGCGGATAGAAGGGACCCAGATGTTCTCAGAAATCAATGTT 1732
 579: G R S I H G V K D L G G D G L A D V A V G A E G G V I V L L S S R P V V A D I I T S V S F S P A E I P V 628
 1733: TTGACGCTCCATCCAGGVTGAAGACCTTGGCGGGATGGCTGGCAGATGTTGGCTGAGGGCCAGTGGATGTTGCTCCGCGCTGTGGTADICATCACAGCGTGTCTTCCCGGCGGAGATCCAG 1882
 629: R E V E C S Y S T S N Q E K E G V N I T V C F Q V K S L I S T F Q G H L V A N L T Y T L Q L D G H R 678
 1883: TACGTGAAGTCGAGTGTCTTATCCACCAGCAACAGGAGAAGGAGCGTTAATCATCAGTCTGTTCAGGTCAGTCTCTCATCTCCACCCTTCCAAGGGCACCTGGTTGCCAACCTCACTTACACTCTGCAGCTGGAGCGCCATC 2032
 679: T R S R G L F P G G K H E L N G N T A V T S V K S C A G T F W F W F H I T G I Q D L I S P I N V S L S Y 728
 2033: GGACCGAAAGCAGGCTTGTCCAGGAGGAAACACGAACTCAACGGNAACACAGCTTCACCTGTCAAGTCTGTCTTGTCTGACTTCCGATTCGATTCAGATTCAGATCTCATCTCCCATCAACCTCCCTCCATGAGTT 2182
 729: S L W E E E E G T P R D P R A Q G R D I P P I L K P S P H L E T K E I P F E K N C G E D K T C E A D L 778
 2183: ATTCTCTCTGGGAGGAAGAAGGGACCCAGGGGAGCCAGGGGCGAGGGGAGGACATCCCGCCATCTGAAACCCCTCACCACTTGGAGACCAGGAGATTCCTTTTGAGAAGAACTGGGAGAGGACAAGACTTGTGAGGAGACC 2332
 779: K L A F S D M R S K I L H L T P S A S L S V R L T L R N T A E D A Y W V Q V T L S F P Q G L S F R K 828
 2333: TGAAGCTGGCTTCTCCGACATGAGATCCAAAATCTGCATCTGACCCTCCGCCAGCCTCTCTGTGAGGCTGACATGAGGAAACACAGCAAGATGCTTACTGGGTCAGGTACCCCTGAGCTCCCCAGGGACTCTCATTCCGCA 2482
 829: V E A L K P H S H V P V G C E E L P E E A I L Q S R A L S C N V S S P I F G A D S M V D I Q V M F N 878
 2483: AAGTGGAGGCGCTCAAGCCACAGCATGTACCTGTGGCTGTGAGGACTTCCTGAGGAGCCACTGACAGGAGGGCCCTCTCTGCAACGTGAGCTCTCCCATCTCGAGCAGACAGCATGGTTGATACCAGGTGATGTTTA 2632
 879: T L Q K G S W G D L I K L H A N V S C D N E N S S L L E D N S A T A S I P W V Q V T L S F P Q G L S Q E 928
 2633: ATACGCTGAGAAAGCTCCTGGGAGATTTGATCAAGTCGACGCCAATGTAGCTGCGACAACTGAGAACTCAAGCTCTCTGAGGAGCACTCCGCCACCGCCAGCATCCTGTGATGATCCATCAACCTCCATCCACAGGACCAG 2782
 929: N S T L Y I N F T P K S P K I H H V K H I Y Q V R I Q P S N Y D N V P P L E A L V R V P Q V H S E E 978
 2783: AAACTCCACACTGTATATCAACTTCAACCCCAAGAGTCCCAAGATCCACATGTCAGACATCTACAGGTGAGGATCCAGCCTTCTAATCATGACAACTGGCCCACTGGAGGCTTGGTTAGGGTACCACAGGTGCACAGCAGG 2932
 979: L I T H R W S I Q M E P P V N C S S R N L E S P S D V A E P G S F G T E F R C P I D F R Q E I L V Q 1028
 2933: AGCTCATCCCCACAGGTGGAGCATACAGATGGAGCCTCCAGTCAACTGCAGCTCCAGAAATGAGAGACTGAGAGTGTGAGCTGAGCTGGCTCGTTGGAAGTGAATTCGCTCCGCAATCGACTTCAGGCAAGATTTGTTGCTC 3082
 1029: V N G T V E L R G T I K A S S M L S L S S L S I S F N S S K H F H L Y G S N A S M A Q V V M K V D 1078
 3083: AAGTGAACGGGACGTTGAGTGGAGGGGACGATCAAGGCTCCTCCATGTTAGCTTCTCTAGCTCCTCTCCATCTCTTCAACAGCAGCAAGCACTTTCACCTCTATGGAGCAACGCCTCCATGGCCAGGCTGTGATGAGGTTG 3232
 1079: L V Y E K K M L Y L Y V L S G I A T G G G L L L L I F I A L L Y K V G F F K K R N L K E K M E A N V D A S 1128
 3233: ACCTGTATATGAGAAAAGTCTATCTTACGTCTGAGTGTGAGTGGGGTGTGTGTCTCCTCTCCTGATTTTCATAGCTCTGTACAAAGCTTGGTCTTCAAACCGNAACCTGAAGGAGAAGATGGAGGCAAAATGTAGTGTCT 3382
 1129: S E I P A E D A G Q P E L E K E F K D P G C L E P L L Q K K D E D E S G G D * 1165
 3383: CCAGTGAATCCCTGACAGAAATGCTGGGCGAGAGTGGAGAAAGATTCAGGACCCAGGCTGCCTGGAGCCCTCCAGAAAGGATGAGGATGAAAGTGGTGGAGATGAGGTGC 3503

Figure 6 : Séquences nucléotidique et protéique du CD11a caprin

Le peptide signal potentiel et la région transmembranaire sont soulignés. Les deux séquences obtenues diffèrent par la présence/absence d'une glutamine en position 743 (#).

fonctionnelles. En effet, (i) les résidus se trouvant dans la membrane doivent posséder plutôt un caractère hydrophobe pour permettre la liposolubilité, ce qui est confirmé par la présence de plusieurs résidus leucine et (ii) la signalisation bidirectionnelle impliquant les intégrines (*inside-out* et *outside-in*) est accomplie par la transmission de l'information à travers la membrane plasmique (Kim *et al.*, 2003). Par contre, la faible conservation de la portion cytoplasmique pourrait suggérer qu'elle n'est pas requise pour un fonctionnement adéquat du LFA-1, en accord avec l'absence d'effet de la troncature du domaine cytoplasmique du CD11a sur la liaison d'ICAM-1, alors que celle-ci est nettement réduite par la troncature du domaine cytoplasmique du CD18 (Hibbs *et al.*, 1991). Le résidu Glu332 situé dans le *linker* suivant le *I domain* et connu pour être important pour la communication avec le β_2 *I-like domain*, la margination, l'extension de l'intégrine et l'activation par Mn^{2+} ou encore l'adhésion ferme (Salas *et al.*, 2004) est strictement conservé.

La protéine mature contient 21 résidus cystéyles strictement conservés dans les autres espèces (excepté les CD11a caprin et de rat qui en possèdent respectivement deux et un en moins), supposant un rôle dans le maintien de la structure globale de la protéine. Les versions bovine, murine, canine et de rat se distinguent respectivement par des résidus cystéyles supplémentaires dans le domaine cytoplasmique en position 1145 (numérotation bovine), dans le *I domain* en position 199 (numérotation murine), dans le *I domain* et la portion extracellulaire aux positions 200 et 361 (numérotation canine) et dans le *I domain* et la région extracellulaire aux positions 287, 877, 908 et 1250 (numérotation du rat).

Par ailleurs, un variant allélique avec une insertion d'un codon résultant en un résidu Glu additionnel en position 744 (domaine extracellulaire) a pu être observé à la fois chez l'Homme (GenBank NM_002209 et AY892236), le mouton (Fett *et al.*, 2005a), la chèvre (Fett *et al.*, 2005b) et le porc (Vanden Bergh *et al.*, 2005), suggérant un rôle biologique potentiel. Des études génomiques devraient permettre de savoir si nous avons affaire à deux allèles ou à un épissage alternatif.

Enfin, notons que le plus faible pourcentage d'identité inter-espèces est observé avec le CD11a du rat, dont la séquence dérive d'une annotation génomique. Le clonage et la caractérisation de l'ADN complémentaire du CD11a issu de leucocytes de rat donnera probablement un pourcentage d'identité plus important.

Tableau II: Pourcentages d'identité inter-espèces des blocs constitutifs du CD11a

Bloc	Hum vs.						
	Bov	Ovi	Cap	Por	Mur	Can	Rat
Globalité	77	77	77	76	71	78	58
Peptide signal potentiel	56	52	56	56	32	40	3
Région extracellulaire / globalité	78	78	78	78	73	80	63
Région extracellulaire / <i>I domain</i>	84	86	86	79	73	86	76
Région extracellulaire / MIDAS	100	100	100	85	85	100	85
Région extracellulaire / MLCP 1	88	88	88	77	77	88	66
Région extracellulaire / MLCP 2	77	77	77	77	77	100	88
Région extracellulaire / MLCP 3	88	88	88	88	66	77	77
Région transmembranaire	91	95	95	91	75	75	83
Queue cytoplasmique	56	56	58	51	59	60	59

Abréviations : Hum, Bov, Ovi, Cap, Por, Mur, Can et Rat: CD11a humain, bovin, ovin, caprin, murin, canin et de rat, respectivement. MLCP : motif de liaison des cations potentiel.

5.2.3. Comparaison entre ruminants et non-ruminants

Le relevé des positions systématiquement occupées par un résidu « A » chez les ruminants et « B » chez l'homme, la souris et le rat a conduit à l'identification de 58 mutations qui pourraient expliquer la spécificité de la leucotoxine pour les CD11a des ruminants (figure 7). Ces sites ont été classés sur base de leur impact présumé sur la structure tridimensionnelle suivant la table de score BLOSUM (BLOcks SUBstitution Matrix) 62 (Henikoff et Henikoff, 1992; 1993). Cette matrice assigne, pour chaque position d'un alignement, un score de probabilité déduit d'observations des fréquences avec lesquelles les substitutions se produisent dans les blocs conservés parmi des protéines apparentées (tableau III). Neufs sites sont localisés dans la queue cytoplasmique et les 49 autres dans la partie extracellulaire, dont trois dans le très conservé *I domain* et un dans le premier domaine de liaison des cations. Des analyses de prédiction de structures secondaires dans le voisinage de ces sites ne révèlent aucune information particulière puisque aucun changement n'est observé systématiquement chez les ruminants par rapport aux non ruminants. Par contre, nous avons tiré parti des séquences publiées (i) du segment extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ humaine avec et sans Mn^{2+} (PDB 1M1X, 1JV2 et 1L5G) (Xiong et al., 2001; 2002) et (ii) du *I domain* sans cation ou avec du Mn^{2+} ou du Mg^{2+} (PDB 1ZON, 1LFA, 1ZOP et 1ZOO) (Qu et Leahy, 1995; 1996) pour approcher la localisation des ces résidus : 39 d'entre eux ont ainsi pu être classés comme exposés, semi-exposés,

semi-enfouis ou enfouis sur base du code couleur « accessibilité » du programme Swiss-PdbViewer v.3.7., les 19 autres n'étant pas résolus dans la structure cristalline (tableau III). Dix-neuf résidus seraient exposés dont deux (positions 186 et 883) ne l'étant respectivement que dans (i) la structure du *I domain* obtenue avec Mn^{2+} ou sans cation fixé et (ii) dans le segment extracellulaire de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ humaine cristallisée avec Mn^{2+} .

Tableau III: Sites de mutation du CD11a potentiellement responsables de la mannheimiose

<u>Score</u>	<u>Position</u>	<u>Domaine</u>	<u>Accessibilité</u>	<u>AA chez les ruminants</u>	<u>AA chez les non-ruminants</u>
-4	1011	EC	ND	F	P
-3	497	EC	Enfoui	I	R
-3	1020	EC	ND	D	V
-3	1139	CT	ND	P	L
-2	866	EC	Exposé	G	K
-2	974	EC	Enfoui	V	P
-2	1010	EC	ND	S	L
-2	1130	CT	ND	E	G
-2	1142	CT	ND	E	G
-1	65	EC	ND	M	T
-1	451	EC	Exposé	I	T
-1	511	EC	Enfoui	T	P
-1	659	EC	Exposé	T	Q
-1	740	EC	ND	P	Q
-1	784	EC	Exposé	D	P
-1	785	EC	Enfoui	M	A
-1	817	EC	Enfoui	T	D
-1	868	EC	Exposé	D	G
-1	1126	CT	ND	D	G
-1	1128	CT	ND	S	P
-1	1140	CT	ND	E	A
0	84	EC	ND	S	G
0	129	EC	ND	I	F
0	360	EC	Enfoui	G	A
0	478	EC	Enfoui	A	G
0	663	EC	Enfoui	H	R
0	801	EC	Enfoui	R	E

0	841	EC	Exposé	G	S
0	882	EC	Exposé	K	N
0	883	EC	Exposé/enfoui	G	S
0	940	EC	Exposé	S	G
0	945	EC	Exposé	H	Q
0	1127	CT	ND	A	V
1	104	EC	ND	N	S
1	186	I	Exposé/enfoui	S	T
1	286	I	Exposé	N	H
1	468	CBM1	Exposé	R	Q
1	561	EC	Exposé	R	Q
1	571	EC	Exposé	M	V
1	727	EC	Enfoui	S	N
1	781	EC	Exposé	A	S
1	816	EC	Enfoui	V	L
1	849	EC	ND	A	S
1	1129	CT	ND	S	N
1	1156	CT	ND	K	E
2	131	EC	ND	E	Q
2	210	I	Exposé	R	K
2	496	EC	Enfoui	K	R
2	502	EC	Enfoui	Q	E
2	510	EC	Exposé	E	D
2	752	EC	Exposé	K	R
2	873	EC	Enfoui	I	L
2	917	EC	Exposé	M	L
3	482	EC	Enfoui	Y	F
3	653	EC	Enfoui	V	I
3	728	EC	Enfoui	Y	F
3	889	EC	Enfoui	I	V
3	986	EC	Enfoui	I	V

La position est donnée par rapport à la numérotation du CD11a caprin. Le score réfère à la valeur obtenue dans la table BLOSUM 62 et le classement est effectué selon l'impact présumé sur la structure (la valeur la plus basse traduit l'impact le plus important). CT, CBM1, EC, ID, ND et AA : queue cytoplasmique, premier motif de liaison des cations, région extracellulaire, *I domain*, non déterminable et acide aminé, respectivement.

5.3. La sous-unité CD18

5.3.1. *Description*

Les séquences des ADNs complémentaires des CD18 ovin (GenBank AY484425 et AY484426) et caprin (GenBank AY452481) contiennent ~ 3300 pb avec un cadre de lecture ouvert de 2310 pb codant pour 770 acides aminés, suivi de ~ 600 pb dans l'UTR-3' (figures 9 et 10). Deux allèles ont été identifiés pour le CD18 ovin, différant par huit substitutions silencieuses (C57T, A87G, T138C, C261T, T312C, T429C, G489A et A525G). L'ADN complémentaire du CD18 bovin (GenBank M81233) quant à lui contient 2307 pb codant pour 769 acides aminés. Les CD18 bovin, ovin et caprin contiennent tous trois un peptide signal potentiel de 22 résidus, un domaine extracellulaire de 679 (678 pour le bovin) résidus (23-700/701), une région transmembranaire de 23 résidus (701/702-723/724) et une courte queue cytoplasmique de 46 résidus (figures 9 et 10). En partant de l'extrémité N-terminale, la région extracellulaire contient successivement un analogue du domaine plexine sémaphorine intégrine (PSI), comprenant des répétitions riches en cystéines (résidus 23-74) (Bork *et al.*, 1999), un domaine « inséré » (*I-like domain*) de 240 résidus (124-363) (Huang *et al.*, 2000) et une région C-terminale riche en cystéines, constituée de quatre domaines *epidermal growth factor* (EGF) (résidus 449-496, 497-540, 541-581 et 582-617). Un site d'adhésion dépendant des ions métalliques (MIDAS pour *metal ion-dependent adhesion site*) constitué du motif DXSXS (Goodman et Bajt, 1996) est prédit dans le *I-like domain* (résidus 134-138). Globalement, les trois protéines contiennent 56 cystéines et cinq sites de N-glycosylation potentiels (Asn-X-Thr/Ser), tous localisés dans la région extracellulaire (figure 11).

1:		<u>M L P Q R P Q L L L L A G L L S L Q S V L S Q</u>	23
-81:	AGCCTGGTGAAGAGCAGAGCTGAAGCCCCTGCCAGTCCAGCTGGGACACCCCCTGCCGTGGTCTCCAGGGCATCCAGGGGAC	<u>ATGCTGCCCCAGCGCCCCAGCTGCTGCTCCTAGCGGGCCTGCTCTCCCTCCAGTCCGCTCTGCTCCAG</u>	69
24:	E C T K Y K V S T C R D C I E S G P G C A W C Q K L N F T G Q G E P D S T R C D T R A Q L L S K G C		73
70:	GAGTGCACCAAGTACAAGTCAGCACCTGCCGGGACTGCATCGAGTGGGCCCCGGCTGTGCTGGTGTGAGAACTGA	<u>ACTTACAGGGCAAGGGGAGCCGACTCCACTCGCTGTGATACAGGGCGCAGCTGCTGTGCAAGGGCTGC</u>	219
74:	P A D D I M E P K S L A E T R Q S Q A G K Q K Q L S P E E V T L Y L R P G Q A A A F N V T F Q R A K		123
220:	CCAGCTGATGACATCATGGAACCAAGAGCCTCGCTGAGACCCGGCAGACCAGGGGGCAAACAGAAGCAGTGTCC	<u>CCAGAGGAAGTACTCTTACCTGAGACCAGGTGAGGAGCTGCGTTCAACGTGACCTTCCAGAGGGCCAAG</u>	369
124:	G Y P I D L Y Y L M D L S Y S M V D D L A N V K K L G G D L L R A L N D I T E S G R I G F G S F V D		173
370:	GGTACCCCATCGACCTGTACTATCTGATGGATCTCTCTACTCCATGGTGGACGACCTTGCCAACGTCAAGAAGT	<u>TGGGGGTGACCTGCTCCGGGCCCTCAATGACATCACCGAGTGGGGCCGATGGTTTCGGGTCTCTCGTGGAC</u>	519
174:	K T V L P F V N T H P E K L R N P C P N K E K E C Q P P F A F R H V L K L T D N S K Q F E T E V G K		223
520:	AAGACAGTGTCCCTTCGTCAACACGCACCCCGAGAAGCTGAGGAACCCCTGCCCAACAAGGAGAAGGAGTGCCAG	<u>CGCCGCTTCGCCCTTCCAGGCAGTGTGAAGCTCACGACAACCTCAACAGTTCGAGACAGAAGTCGGGAAG</u>	669
224:	Q L I S G N L D A P E G G L D A M M Q V A A C P E E I G W R N V T R L L V F A T D D G F H F A G D G		273
670:	CAGTGATCTCGGGAACTTGGACGCCCTGAGGGTGGGCTGGACGCCATGATGCAAGTGGCCGCTGCCCGAGGAAAT	<u>TGGCTGGCGCAATGTACCAGGCTGCTGGTGTTCGCCACAGACGATGGGTTCCACTTTCGGGGCGATGGA</u>	819
274:	K L G A I L T P N D G R C H L E D N L Y K S S N E F D Y P S V G Q L A H K L A E S N I Q P I F A V T		323
820:	AAGTGGGTGCCATCTCACCCCAACGACGGCCGCTGCCACCTGGAAGACAACCTGTACAAAAGCAGCAACGAAT	<u>TGACTACCATCGGTGGCCAGCTGGCACACAACCTGGCAGAAAGCAACATCCAGCCATCTTCGGGTAAAC</u>	969
324:	K K M V K T Y E K L T E I I P K S A V G E L S E D S K N V V E L I K S A Y N K L S S R V F L D H N T		373
970:	AAGAAGTGGTGAACAGTACGAGAAGCTGACGAAATCATCCCCAAGTGTGAGTGGGGAGCTGTCTGAAGATT	<u>TCCAAGAAGTGGTGGAGCTTATCAAGAGTGCCTACAATAACTGTCTCCAGAGTATCTCGATCACAACACC</u>	1119
374:	L P D T L K V A Y D S F C S N G V S Q V D Q P R G D C D G V Q I N V P I T F Q V K V T A T E C I Q E		423
1120:	CTCCCTGACACCCCTGAAAGTCGCCCTACGACTCCTTCTGCGAGTAAAGGGTGTGCGAGGTGGACCAGCCAGAG	<u>GGGACTGCGACGGCGTCCAGATCAACGTCCCGATCACCTTCCAGGTGAAGTTCACAGCCAGGAGTGCATCCAGGAG</u>	1269
424:	Q S F T I R A L G F T D T V T V R V L P Q C E C Q C R E A S R D R S V C G G R G S M E C G V C R C D		473
1270:	CAGTCTTACCATTCCGGGCGCTGGGCTTACGGACACGGTGAACCGTGGGGTCTTCCCAGTGGAGTGCAATGCC	<u>GGGAAGCCAGCAGGGACCCGAGCGTCTGCGGTGGCAGAGGCTCGATGGAGTGGCGCTTGCAGGTGCGAC</u>	1419
474:	A G Y I G K N C E C Q T H G R S S Q E L E G S C R K D N S S I I C S G L G D C I C G Q C V C H T S D		523
1420:	GCCGGCTACATCGGGAAGAACTGCGAGTGCCAGACGCACGGCCGGAGCAGCCAGGAGCTGGAGGGCAGCTGCC	<u>CGCAAGGACAACAGCTCCATCATCTGCTCGGGCTGGGGACTGCATCTGCGGGCAGTGGCTGTCCACAGCAGC</u>	1569
524:	V P N K K I Y G Q F C E C D N V N C E R Y D G Q V C G G D K R G L C F C G T C R C N D Q H E G S A C		573
1570:	GTGCCAACAAAGAAGTCTACGGCCAGTCTGCGAGTGCACACGTCAACTGCGAGCGCTACGACGGCAAGTCTG	<u>CGGGGCGACAAGAGGGGCTCTGCTTCTGCGGCACCTGCAGGTGCAACGACCAGCATGAGGGCTCGGCTGC</u>	1719
574:	Q C L K S T Q G C L N L D G V E C S G R G R C R C N V C Q C D P G Y Q P P L C I D C P G C P V P C A		623
1720:	CAGTGCCTCAAGTCCACTCAGGGTGCCTAACCTGGACGGCGTGCAGTGCAGCGCGCGCGGATGCCGCTGCA	<u>ACCTGTGCCAGTGCAGCCCCGGCTACAGCCGCCCTGTGCATCGACTGCCGGGCTGCCCGTGCCTCGCT</u>	1869
624:	G F A P C T E C L K F D K G P F A K N C S A A C G Q T K L L S S P V P G G R K C K E R D S E G C W M		673
1870:	GGCTTCGCCCTGCACCGAGTGCCTGAAGTTCGACAAGGTCCCTTCGCCAAGAACTGCAGCGCAGCGTGGGGC	<u>AGACGAAGTGTGCTCCAGCCGGTGCCTGGCGCCGCAAGTGAAGGACGTGACTCCGAGGGCTGTGGATG</u>	2019
674:	T Y T L V Q R D G R N R Y D V H V D D M L E C V K G P N	<u>I A A I V G G T V G G V V L V G I L L L A I</u>	723
2020:	ACCTACACCTTGGTGCAGCGCAGGGCGGAACAGATACGACGTGCACGTGGACGACATGCTCGAGTGTGTGA	<u>AGGGCCCCAACATCGCTGCCATCGTGGGGGACCCTGGGGGAGTTGTGCTCGTGGGATCTCTGCTGGCCATC</u>	2169
724:	<u>W</u> K A L T H L S D L R E Y H R F E K E K L K S Q W N N D N P L F K S A T T T V M N P K F A E S *		770
2170:	TGGAAGGCCCTGACACACCTGAGCGACCTCAGGAGTACCATCGCTTCGAGAAGGAGAAGCTCAAGTCCAGT	<u>GGAACAACGATAACCCCTCTTTCAAGAGTCCACCACGACATGAACCCTAAGTTTCCGAGAGTTAGGGGTGC</u>	2319
2320:	CTGGTGAAGACAAGGCCCTTCTGCACACCCAGACGGGAACATGCCCTCTCTCGTCCCCCTCCAGC		2384

Figure 9 : Séquences nucléotidique et protéique du CD18 ovin. Le peptide signal potentiel et la région transmembranaire sont soulignés. Le motif AG_(n)AC est souligné deux fois.

1:		<u>M L P Q R P Q L L L L L A G L L A L Q S V L S Q</u>	23
-81:	AGCCTGGTGAAGAGCAGAGCCGAAGCCCTGCCAGTCCAGCTGGGACACCCCTGCCGTGGTCTCCAGGGCATCCAGGGGACATGCTGCCCCAGCGCCCCAGCTGCTGCTCTAGCAGGCTGCTCGCCCTCCAGTCTGTCTCTGCCAG		69
24:	E C T K Y K V S T C R D C I E S G P G C A W C Q K L N F T G Q G E P D S T R C D T R A Q L L S K G C		73
70:	GAGTGCACCAAGTACAAAGTACAGCACCTGCCGGGACTGCATCGAGTCGGGCCCGGCTGTGCCTGGTGCCAGAACTGAATTCACAGGGCAAGGGGAGCCGACTCCACTCGCTGTGATACACGGGCGCAGCTGCTGTAAGGGCTGC		219
74:	P A D D I M E P K S L A E T R Q S Q A G K Q K Q L S P E E V T L Y L R P G Q A A A F N V T F Q R A K		123
220:	CCAGCTGATGACATCATGGAACCCAAAGAGCCTCGCTGAGACCCGGCAGAGCCAGGCGGGCAACAGAAGCAGCTGTCCCCAGAGGAAGTGACTCTCTACCTTAGACCAGGTGAGCAGCTGCGTTCAATGTGACCTCCAGAGGGCCAAAG		369
124:	G Y P I D L Y Y L M D L S Y S M V D D L A N V K K L G G D L L R A L N D I T E S G R I G F G S F V D		173
370:	GGTACCCCATCGACTGTACTATCTGATGGATCTCTCCTACTCCATGGTGGACGACCTCGCCAACTCAAGAAGCTGGGGGGTGCCTGCTCGGGCCCTCAATGACATCACCAGTCGGGCCCATCGGGTTCCGGTCTTCGTGGAC		519
174:	K T V L P F V N T H P E K L R N P C P N K E K Q C Q P P F A F R H V L K L T D N S K Q F E T E V G K		223
520:	AAGACAGTGTCCCTTCGTCAACACGCACCTGAGAAGCTGAGGAACCCCTGCCCAACAAGGAGAAGCAGTGCCAGCCCCGTTCGCTTCAGGCAGCTGTTGAAGCTCACCAGCAACTCCAACAGTTCGAGACAGAAGTCGGGAAG		669
224:	Q L I S G N L D A P E G G L D A M M Q V A A C P E E I G W R N V T R L L V F A T D D G F H F A G D G		273
670:	CAGCTGATTCGGGGAAGTGGACGCCCCGTGAGGGTGGACTGGACGCCATGATGCAAGTGGCCGCTGCCCGAGGAAATCGGCTGGCGCAATGTACCAGGCTGCTGGTGTTCGCCACAGATGATGGGTTCCACTTTGCGGGCGATGGA		819
274:	K L G A I L T P N D G R C H L E D N L Y K S S N E F D Y P S V G Q L A H K L A E S N I Q P I F A V T		323
820:	AAGCTGGGTGCCATCCTCACCCTAACGACGGCCGCTGCCACCTGGAAGACAACCTGTACAAAAGCAGCAACGAATTTGACTACCCATCGTGGGCCAGCTGGCACACAACAGTGGCAGAAAGCAACATCCAGCCCATCTTCGGGTAAACC		969
324:	K K M V K T Y E K L T E I I P K S A V G E L S E D S K N V V E L I K S A Y N K L S S R V F L D H N T		373
970:	AAGAAGATGGTGAAGGACTGACAGAAGCTGACAGAATCATCCCAAGTCTCGAGTCGGGAGCTGTCTGAAGATTCCAAGAAGCTGGTGGAGCTTATCAAGAGTGCCTACAATAAAGTGTCTCCAGAGTATTCTGGATCACAAACACC		1119
374:	L P D T L K V A Y D S F C S N G V S Q V D Q P R G D C D G V Q I N V P I T F Q V K V T A T E C I Q E		423
1120:	CTCCCTGACACCCTGAAAGTCGCTACGACTCCTTCTGCGAGTAACGGGGTGTACAGGTGGACCAGCCAGAGGGGACTGTGACGGCGTCCAGATCAACGTCCCAGTACCCTTCCAGGTGAAGTTCACAGCCACCCAGTGCATCCAGGAG		1269
424:	Q S F T I R A L G F T D T V T V R V L P Q C E C Q C R D A S R D R S V C G G R G S M E C G V C R C D		473
1270:	CAGTCTTACCATCCGGCGCTGGGCTTCACGGACACGGTGACCGTGCGGGTCTTCCCCAGTGCAGTGCCAAATGCCGGGACGCCAGCAGGACCAGCAGCTGCGGTGGCAGAGGCTCGATGGAGTGCAGCGTGTGCAGGTGCGGAG		1419
474:	A G Y I G K N C E C Q T H G R S S Q E L E G S C R K D N S S I I C S G L G D C I C G Q C V C H T S D		523
1420:	GCCGGCTACATCGGGAAGACTGCGAGTGCCAGAGCGACGGCCGGAGCAGCAGGAGCTGGAGGGCAGCTGCCGCAAGGACAACAGCTCCATCATCTGCTCGGGCTAGGGGACTGCATCTCGGGCAGTGCCTGTGCCACACGAGCGAG		1569
524:	V P N K K I Y G Q F C E C D N V N C E R Y D G Q V C G G E K R G L C F C G T C R C N E Q H E G S A C		573
1570:	GTGCCCAACAAGAAGATCTACGGCCAGTTCTGCGAGTGCGACAACGTCAACTGCGAGCGCTACGACGGCCAAGTCTCGGGGGGAGAAAGGGGGCTCTGCTTCTCGGCCACTGCAGGTGCAACGAGCAGCATGAGGGCTCGCGGTGC		1719
574:	Q C L K S T Q G C L N L D G V E C S G R G R C R C N V C Q C D P G Y Q P P L C I D C P G C P V P C A		623
1720:	CAGTGCCTCAAGTCCACTCAGGGTGCCTCAACCTGGACGGCGTGCAGTGACGGGCCGGGGCGATGCCGTGCAACGTGTGCGAGTGCAGCCCGGCTACCAGCCGCCCTGTGCATCGACTGCCCGGGTGCCTCGCTGCGCT		1869
624:	G F A P C T E C L K F D K G P F A K N C S A A C G Q T K L L S S P V P G G R K C K E R D S E G C W M		673
1870:	GGCTTCGCCCCCTGCACCAGTGCCTGAAGTTCGACAAGGGCCCCTTCGCCAAGAAGTGCAGCGCAGCTGCGGGCAGACGAAGCTGCTGTCCAGCCCGGTGCCGGCGCCGCAAGTGCAAGGAGCGGACTCCGAGGGTGTGGATG		2019
674:	T Y T L V Q R D G R N R Y D V H V D D M L E C V K G P N I A A I V G G T V G G V V L V G I L L L V I		723
2020:	ACCTACACCCTGGTGCAGCGACGGGCGAACAGATACGAGCTGCAGTGGACGACATGCTCGAGTGTGTGAAGGGCCCCAATCGCTGCCATCGTGGGGGGACCGTGGGGGGAGTTGTGCTCGTGGGCATCCTCCTGCTGTGCATC		2169
724:	<u>W</u> K A L T H L S D L R E Y H R F E K E K L K S Q W N N D N P L F K S A T T T V M N P K F A E S *		770
2170:	TGAAGGCCCTGACACACTGAGCGACCTCAGGGAGTACCATCGCTTCGAGAAGGAGAAGCTCAAGTCCCAGTGAACAACGATAACCCCTTTTCAAGAGTGCACCACGACAGTGCATGAACCTAAGTTTCCGAGAGTTAGGGGTGC		2319
2320:	CTGGTGAAGACAAGGCCCTTCTGCACCACCCAGACGGGAGCAGCCCTCTCCTCATCCCTCCAGCAGGCTGACCGTGACCTTGCTGCTTAGTGGACGCAGCTGATG		2425

Figure 10 : Séquences nucléotidique et protéique du CD18 caprin. Le peptide signal potentiel et la région transmembranaire sont soulignés. Le motif AG_(n)AC est souligné deux fois.

5.3.2. Comparaison générale entre espèces

Globalement, l'organisation générale des CD18 est conservée (figure 11). La comparaison de séquences entre le CD18 humain (Kishimoto *et al.*, 1987; Weitzman *et al.*, 1991) et ses homologues bovin (Shuster *et al.*, 1992a), de buffle (GenPept AAW29104), ovin (Zecchinon *et al.*, 2004b), caprin (Zecchinon *et al.*, 2004a), porcine (Lee *et al.*, 1996), du mouton *Bighorn* (Liu *et al.*, 2006), murin (Wilson *et al.*, 1989), canin (Kijas *et al.*, 1999), de rat (GenBank XM_228072), de poulet (Bilsland et Springer, 1994), de carpe (GenBank AB031070) et de poisson-chat (Qian *et al.*, 1999) conduit globalement à 83, 83, 83, 83, 83, 82, 81, 80, 77, 63, 49 et 48 % d'identité, respectivement, avec l'identité la plus élevée pour le *MIDAS-like motif* (100 %), le *I-like domain* (> 60 %) et la portion cytoplasmique (> 64 % si on ne tient pas compte des poissons) et l'identité la plus faible pour le peptide signal (tableau IV). La très haute conservation inter-espèces du *MIDAS-like motif* et du *I-like domain* est en accord avec l'implication de ces régions dans les activités fonctionnelles des β_2 -intégrines, comme le démontre l'inhibition de la liaison du LFA-1 aux ICAMs-1 à -3 par des anticorps monoclonaux ciblant le *I-like domain* (Bajt *et al.*, 1995; Hogg *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000). Le haut degré de conservation de la portion cytoplasmique, avec de nombreux résidus Ser, Thr et Tyr, est compatible avec le rôle important que la phosphorylation de ces résidus joue dans la régulation de l'adhésion (Chatila *et al.*, 1989) et avec l'observation que la troncature du domaine cytoplasmique du CD18 diminue significativement la liaison du LFA-1 à ICAM-1 (Hibbs *et al.*, 1991).

La protéine mature contient 56 (58 pour le rat) résidus cystéyles conservés dans la région extracellulaire avec un rôle supposé dans le maintien de la structure globale de la protéine. Deux résidus supplémentaires sont présents dans le *I domain* du CD18 de rat. Quatre à six sites de N-glycosylation potentielle (Asn-X-Thr/Ser) sont observés dans la région extracellulaire, à l'exception de la carpe et du poisson-chat qui en possèdent un dans la portion cytoplasmique.

Tableau IV: Pourcentages d'identité inter-espèces des blocs constitutifs du CD18

	Hum vs.											
	Bov	Buf	Ovi	Cap	Por	Big	Mur	Can	Rat	Chic	Car	Caf
Globalité	83	83	83	83	83	82	81	80	77	63	49	48
Peptide signal potentiel	63	63	68	63	59	68	60	30	13	16	29	25
Région extracellulaire / globalité	83	82	82	82	83	82	81	81	78	64	49	48
Région extracellulaire / domaine PSI	76	76	78	78	75	76	80	78	76	61	48	55
Région extracellulaire / <i>I-like domain</i>	94	94	94	93	95	94	94	94	86	78	64	63
Région extracellulaire / <i>MIDAS-like motif</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Région extracellulaire / domaine EGF 1	81	79	79	81	75	77	81	77	83	54	37	26
Région extracellulaire / domaine EGF 2	81	81	81	81	81	81	79	72	77	79	50	52
Région extracellulaire / domaine EGF 3	70	70	70	70	70	70	73	65	70	58	46	48
Région extracellulaire / domaine EGF 4	77	77	75	75	72	75	63	66	75	61	44	38
Région transmembranaire	86	86	82	86	82	82	82	82	82	65	60	60
Queue cytoplasmique	95	95	95	95	91	95	95	89	93	64	52	52

Abréviations: Hum, Bov, Buf, Ovi, Cap, Por, Big, Mur, Can, Rat, Chic, Car et Caf : CD18 humain, bovin, du buffle, ovin, caprin, porcine, du *Bighorn sheep*, murin, canin, de rat, de poulet, de carpe et de poisson-chat, respectivement ; EGF : *epidermal growth factor* ; MIDAS : *metal ion dependent adhesion site* ; PSI : plexin semaphorin integrin.

5.3.3. Comparaison entre ruminants et non-ruminants

Le relevé des positions systématiquement occupées par un résidu « A » chez les ruminants et « B » chez l'homme, la souris et le chien a conduit à l'identification de 16 mutations qui pourraient expliquer la spécificité de la leucotoxine pour les CD18 des ruminants (figure 11). Ces sites ont été classés (tableau V) sur base de leur impact présumé sur la structure tridimensionnelle suivant la table de score BLOSUM (BLOcks SUBstitution Matrix) 62 (Henikoff et Henikoff, 1992; 1993). Un site est localisé dans la région transmembranaire et les 15 autres dans la partie extracellulaire, dont quatre dans le *I-like domain* et deux, un et un dans les domaines EGF 1, 2 et 3, respectivement. Des analyses de prédiction de structures secondaires dans le voisinage de ces sites ne révèlent aucune information particulière puisque aucun changement n'est observé systématiquement chez les ruminants par rapport aux non ruminants. Par contre, nous avons tiré parti des séquences publiées (i) du segment extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ humaine avec et sans Mn^{2+} (PDB 1M1X, 1JV2 et 1L5G) (Xiong et al., 2001 ; 2002) et (ii) des répétitions riches en cystéines de la sous-unité β_2 (CD18) humaine (PDB 1L3Y) (Beglova et al., 2002) pour approcher la localisation des ces résidus (figure 12) : 12 d'entre eux ont ainsi pu être classés comme exposés, semi-exposés, semi-enfouis ou enfouis sur base du code couleur « accessibilité » du programme Swiss-PdbViewer v.3.7., les quatre autres n'étant pas résolus dans la structure cristalline (tableau V). Quatre résidus seraient exposés (mutants 4, 5, 11 et 15, respectivement positions 140, 215, 561 et 692) et trois seraient semi-exposés (mutants 1, 2 et 3, respectivement positions 80, 90 et 102), dont un (mutant 1, position 80) qui serait plus exposé dans la forme activée.

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

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

<u>Score</u>	<u>Mutant</u>	<u>Position</u>	<u>Domaine</u>	<u>Accessibilité</u>	<u>AA chez les ruminants</u>	<u>AA chez les non-ruminants</u>
-2	12	620	EX	semi-enfoui	V	S
-1	7	295	ID	enfoui	S	R
-1	11	561	EGF 3	exposé	T	K
-1	15	692	EX	exposé	M	S
-1 (ou 0)	17	736	CT	ND	H	K (ou R)
0	2	90	EX	semi-exposé	S	D
0	5	215	ID	exposé	K	N
0	13	629	EX	enfoui	T	A
1	3	102	EX	semi-exposé	E	K
1	4	140	ID	exposé	V	L
2	1	80	EX	semi-exposé (FNA) exposé (FA)	E	D
2	6	218	ID	enfoui	E	Q
2	8	462	EGF 1	ND	R	K
3	9	469	EGF 1	ND	V	I
3	10	533	EGF 2	ND	F	Y
3	14	687	EX	enfoui	V	I
3	16	715	TR	ND	V	I

La position est donnée par rapport à la numérotation du CD18 bovin. Le score réfère à la valeur obtenue dans la table BLOSUM 62 et le classement est effectué selon l'impact présumé sur la structure (la valeur la plus basse traduit l'impact le plus important). CT, EGF, EX, FA, FNA, ID, ND, TR et AA : queue cytoplasmique, *epidermal growth factor*, partie extracellulaire, forme activée, forme non activée, *I-like domain*, non déterminable, région transmembranaire et acide aminé, respectivement.

5.4.2. Rôles du CD11a et du CD18

A l'aube de ce projet, l'identification de la sous-unité du LFA-1 responsable de la spécificité d'espèce qu'exhibe *Mannheimia haemolytica* vis-à-vis des ruminants était fortement controversée, le CD18 (Wang *et al.*, 1998; Ambagala *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1999) et le CD11a (Jeyaseelan *et al.*, 2000) ayant chacun leurs partisans. Aujourd'hui, plusieurs données nouvelles semblent nous éclairer un peu plus sur cette « liaison dangereuse ».

Ainsi, le professeur Srikumaran et son équipe ont permis une avancée significative en faveur de l'hypothèse du rôle primordial du CD18. Ils ont tout d'abord mis en évidence par immunomarquage et séquençage N-terminal que la leucotoxine se fixe sur les différentes β_2 -intégrines contenues dans des lysats de neutrophiles bovins et qu'une préincubation de ces neutrophiles avec un anticorps monoclonal spécifique du CD18 réduisait les effets cytotoxiques (Ambagala *et al.*, 1999). Ils ont ensuite élégamment démontré que le CD18 était, selon leurs propres termes, nécessaire et suffisant pour médier la cytolyse de leucocytes en rendant une lignée murine, réputée résistante à la leucotoxine, sensible à cette dernière en la transfectant de manière stable avec l'ADNc du CD18 bovin qui se retrouvait exprimé en surface, associé au CD11a murin (Deshpande *et al.*, 2002). Ils ont par ailleurs, tout récemment, réitéré l'expérience avec le CD18 ovin (*Ovis aries* et *ovis canadensis*) et obtenu des résultats similaires (Dassanayake *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007). De plus, ils observent une forte corrélation entre le degré d'expression en surface du CD18 bovin (PMNs bovins>lymphocytes bovins~lignée transfectée) et le degré de cytolyse de ces cellules (les PMNs expriment toutes les β_2 -intégrines alors que les lymphocytes et la lignée transfectée n'expriment que le LFA-1 bovin et murin/bovin, respectivement).

De son côté, l'équipe du professeur Maheswaran a montré que si la leucotoxine se liait à la fois au CD18 de LFA-1 et Mac-1 (Thumbikat *et al.*, 2005) ainsi qu'au LFA-1 porcine (Jeyaseelan *et al.*, 2000), les événements postérieurs à la liaison comme l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire et la phosphorylation de la queue cytoplasmique du CD18 n'étaient observés qu'avec le LFA-1 bovin (Jeyaseelan *et al.*, 2000; 2001; Thumbikat *et al.*, 2005), ce qui est apparemment en contradiction avec l'explication de la plus haute sensibilité des PMNs due à l'expression de toutes les β_2 -intégrines. D'autre part, des expérimentations avec des inhibiteurs du *I domain* du CD11a et des anticorps dirigés contre le *I-like domain* du CD18 donnent à penser que la leucotoxine se lie au CD18 (mais pas au niveau du *I-like domain* bien que celui-ci jouerait un rôle critique dans la signalisation induite par la leucotoxine conduisant à l'activation) et qu'à hautes concentrations en toxine, cette liaison serait suffisante pour provoquer l'oligomérisation toxinique, la formation de pores, un influx de calcium et des dommages cellulaires menant à la cytolyse via toutes les β_2 -intégrines (Thumbikat *et al.*, 2005). La leucotoxine interagirait également avec le *I domain* du CD11a, mais ni avec le CD11b ou le CD11c (Jeyaseelan *et al.*, 2000), pour initier une cascade de signalisation conduisant à l'activation cellulaire (Yoo *et al.*, 1995) et à l'apoptose (Stevens et Czuprynski, 1996), événements qui

prendraient toute leur ampleur lorsque la leucotoxine se trouverait en plus faibles concentrations (Thumbikat *et al.*, 2005). Par ailleurs, la cotransfection des CD11a et CD18 bovins de la lignée lymphoblastique d'origine humaine K-562 n'exprimant naturellement aucune β_2 -intégrine conduit à l'expression en surface de l'hétérodimère bovin, à la liaison de la leucotoxine sur le LFA-1 ainsi que sur le CD11a et le CD18 seuls (par déplétion de lysats cellulaires par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps spécifiques), à la phosphorylation de la tyrosine de la queue cytoplasmique du CD18, à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et à la cytolyse (Dileepan *et al.*, 2005b). Enfin, la cotransfection de cette même lignée avec les ADNcs des CD11a bovin et CD18 humain conduit à l'expression en surface de l'hétérodimère mais ni à la fixation de la leucotoxine, ni forcément à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ou un effet cytotoxique (Dileepan *et al.*, 2005a).

En résumé, ces données dans leur ensemble suggèrent (i) que la leucotoxine doit nécessairement se fixer sur la sous-unité CD18 des β_2 -intégrines des ruminants et du porc à un domaine autre que le *I-like domain*, (ii) qu'à haute concentration en toxine, cette liaison serait suffisante pour induire la formation de pores et la nécrose et (iii) qu'à plus faibles concentrations en toxine, la liaison avec le CD11a des ruminants (via le *I domain*) ou de la souris permettrait, de par une interaction avec le *I-like domain* du CD18, le déclenchement des cascades d'activation cellulaire conduisant à l'apoptose. Dès lors, diminuer voire supprimer l'impact de la mannheimiose en spéculant bovine revient à identifier le site de liaison précis de la leucotoxine sur le CD18, de manière à ouvrir la voie à la sélection d'animaux naturellement résistants et à augmenter la productivité et le bien-être animal tout en réduisant les apports massifs d'antibiotiques (et par conséquent leurs effets néfastes en terme de pression de sélection favorisant l'émergence de souches multirésistantes).

5.4.3. Dans l'intimité de la liaison entre la leucotoxine et le CD18

Afin d'identifier le site précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18, les équipes concurrentes des professeurs Srikumaran et Maheswaran ont décidé de mettre en œuvre l'ingénierie de lignées cellulaires stables exprimant des LFA-1 chimériques mais selon deux principes opposés ; soit rendre sensible une lignée cellulaire qui ne l'est pas en intégrant des fragments du CD18 bovin dans un LFA-1 murin (Gopinath *et al.*, 2005), soit rendre résistante une lignée sensible en intégrant des fragments du CD18 humain dans un LFA-1 bovin (Dileepan *et al.*, 2005a). Les résultats obtenus récemment semblent contradictoires puisque le site de liaison de la leucotoxine entraînant les effets biologiques est annoncé soit dans les 291 premiers résidus du CD18 (Gopinath *et al.*, 2005), c'est-à-dire dans la portion extracellulaire contenant le domaine *PSI* (*plexin-semaphorin-integrin*), le site d'adhésion dépendant des ions métalliques (*MIDAS*, *metal ion-dependent adhesion site*) et une partie du *I-like domain*, sur lequel la toxine n'était pas sensée se lier selon des expérimentations réalisées par l'équipe concurrente avec des anticorps dirigés contre ce domaine (Thumbikat *et al.*, 2005), soit entre

les résidus 500 et 600 de la portion extracellulaire du CD18, correspondant aux domaines *EGF* (*epidermal growth factor*) -2 à 4 (Dileepan *et al.*, 2005a).

En tenant compte de nos résultats issus des comparaisons des CD18 ruminants versus non ruminants (Zecchinon *et al.*, 2004a), nous trouvons six sites situés dans les 291 premiers résidus (mutants 1 à 6, tableau VI) et deux sites entre les résidus 500 et 600 (mutants 10 et 11, tableau VII). Pour rappel, nous avons identifié, sur base de l'estimation de l'accessibilité des résidus, les mutants 1 à 3 (portion extracellulaire), 4 et 5 (*I-like domain*), 11 (domaine EGF 3) et 15 (portion extracellulaire proche de la région transmembranaire) comme présentant la plus forte probabilité d'interaction avec la leucotoxine.

Tableau VI: Sites de mutation du CD18 situés dans les 291 premiers résidus

<u>Score</u>	<u>Mutant</u>	<u>Position</u>	<u>Domaine</u>	<u>Accessibilité</u>	<u>AA chez les ruminants</u>	<u>AA chez les non-ruminants</u>
0	2	90	EX	semi-exposé	S	D
0	5	215	ID	exposé	K	N
	3	102	EX	semi-exposé	E	K
1	4	140	ID	exposé	V	L
2	1	80	EX	semi-exposé (FNA) exposé (FA)	E	D
2	6	218	ID	enfoui	E	Q

La position est donnée par rapport à la numérotation du CD18 bovin. Le score réfère à la valeur obtenue dans la table BLOSUM 62 et le classement est effectué selon l'impact présumé sur la structure (la valeur la plus basse traduit l'impact le plus important). EX, ID et AA : partie extracellulaire, *I-like domain* et acide aminé, respectivement.

Tableau VII: Sites de mutation du CD18 repris entre les résidus 500 et 600.

<u>Score</u>	<u>Mutant</u>	<u>Position</u>	<u>Domaine</u>	<u>Accessibilité</u>	<u>AA chez les ruminants</u>	<u>AA chez les non-ruminants</u>
-1	11	561	EGF 3	exposé	T	K
3	10	533	EGF 2	ND	F	Y

La position est donnée par rapport à la numérotation du CD18 bovin. Le score réfère à la valeur obtenue dans la table BLOSUM 62 et le classement est effectué selon l'impact présumé sur la structure (la valeur la plus basse traduit l'impact le plus important). EGF, ND et AA : *epidermal growth factor*, non déterminable et acide aminé, respectivement.

Que pouvons-nous tirer comme conclusions de ces différentes données ?

Tout d'abord, chacune des approches a ses inconvénients puisque le remplacement d'un domaine conférant ou abolissant la liaison de la toxine ne signifie pas automatiquement que celle-ci s'y lie ou non. En effet, la modification de tel domaine peut entraîner des modifications de structure (par exemple lors du repliement de la protéine) qui, indirectement, modifient le site de liaison. Ainsi, si le *I domain* du CD11a se replie avant l'association avec le CD18, il n'en est pas de même pour le β -*propeller* qui reste non replié dans les 12 heures suivant la synthèse du CD11a seul, suggérant que le *I domain* et le β -*propeller* se replient indépendamment l'un de l'autre et que le second arbore une interface avec le CD18 (Huang et Springer, 1997). Des résultats similaires sont d'ailleurs observés avec le CD11b (Lu *et al.*, 1998). D'autres expériences suggèrent que le *I domain* n'est pas essentiel pour le repliement, la formation et l'expression en surface de l'hétérodimère, mais bien pour la liaison d'ICAM-1 à -3 sur LFA-1 alors que iC3b et le facteur X peuvent se lier au CD11b en son absence (Yalamanchili *et al.*, 2000). Le repliement du *I-like domain* mais pas de ses régions flanquantes nécessite quant à lui l'association avec le CD11a (Huang *et al.*, 1997).

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

Enfin, signalons que notre approche se veut plus « chirurgicale » puisque nous nous sommes attachés à relever les sites individuels pour lesquels un résidu « A » était systématiquement conservé chez les ruminants alors qu'il était systématiquement remplacé par un résidu « B » chez l'Homme, la souris et le chien. Les expériences (i) d'inhibition de cytotoxicité par peptides dérivés de ces sites relevés chez les CD18 des ruminants et (ii) de transfection d'une lignée cellulaire réputée insensible à la leucotoxine par certains des 17 mutants du CD18 bovin mis en évidence seront décrites dans la septième partie de cet ouvrage.

6. Production et validation fonctionnelle de la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica*

6.1. Matériel et méthodes

6.1.1. Schéma général

Pour mener à bien nos études de l'interaction intime entre la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* et le récepteur LFA-1 des ruminants, nous devons bien évidemment disposer d'une leucotoxine produite et purifiée en quantités suffisantes mais aussi et surtout fonctionnellement active, c'est-à-dire capable d'induire une toxicité spécifique aux leucocytes des ruminants.

Nous avons donc successivement (i) porté notre choix sur une souche de *Mannheimia haemolytica* « performante », (ii) maîtrisé ses conditions de culture (choix du milieu et de la température de culture, de la vitesse d'agitation, du temps de récolte) de manière à maximiser une production de leucotoxine correspondant à nos attentes en termes de quantité et de pureté, (iii) mis au point un protocole de purification adéquat, (iv) identifié, par *SDS-PAGE* et *western blot*, la protéine purifiée comme étant la leucotoxine, (v) vérifié la spécificité de la toxicité de la préparation vis-à-vis de diverses lignées cellulaires supposées sensibles et insensibles et enfin, (vi) confirmé, par une expérimentation d'inhibition à l'aide d'un anticorps spécifique, que la toxicité observée était bien imputable à la leucotoxine.

6.1.2. Culture bactérienne

Globalement, la procédure a consisté en trois phases successives : (i) revivification de la souche de référence congelée, (ii) amplification de celle-ci en milieu liquide et (iii) récolte du surnageant de culture.

La phase de revivification a consisté en l'étalement du contenu d'ampoules-stock conservées à -80°C contenant la souche SH1217 de *Mannheimia haemolytica* (sérotypage A1, ref. BAA-409), isolée d'un bovidé et conservée par l'*American Type Culture Collection* (ATCC, USA), sur gélose dite « Columbia » enrichie de sang de mouton à raison de 5% (Becton Dickinson, USA) et en une mise en croissance à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Pour l'amplification en milieu liquide, quatre colonies de la souche d'intérêt, prélevées sur la gélose Columbia, sontensemencées séparément dans 5 ml de milieu liquide dit «BHI» (*Brain Heart Infusion broth*, bouillon d'infusion de cœur et cerveau, Oxoid, Angleterre), agitées à 200 rpm et maintenues à 37°C pendant ~6 heures (pré-amplification) avant inoculation dans 200-300 ml de BHI pour amplification dans les mêmes conditions de culture pendant ~18 heures. Le nombre de bactéries présentes est ensuite estimé par turbidimétrie ou plus précisément par la valeur de la densité optique (DO) à 620 nm. Les cellules sont ensuite culotées par 15 minutes de centrifugation à 1000 g et 25°C

puis resuspendues (après élimination du surnageant) dans 1 à 2 l de BHI à une DO_{620nm} de ~ 0.25 , en présence d'inhibiteurs de protéases *Complete EDTA-free* (Roche Diagnostics, USA) et ce, pour 2 à 3 h de culture sous agitation (200 rpm) à 37°C jusqu'à obtention d'une DO_{620nm} approximative de 1.

Le bouillon de culture est alors récolté et soumis à une centrifugation d'une vingtaine de minutes à 10000 g et 4°C. Le surnageant contenant la leucotoxine est ensuite filtré sur 0.45 puis sur 0.22 μm (Nalgene, USA).

Par ailleurs, nous avons également évalué la croissance bactérienne en milieu RPMI 1640 + L-glutamine (Invitrogen, Belgique) et en milieu tryptone composé comme suit : 20 g/l de tryptone (Sigma, Belgique), 1 g/l de glucose (Sigma, Belgique), 5 g/l de NaCl (VWR International, Belgique), 2.5 g/l d'extrait de levure (Becton Dickinson, USA) et 2.5 g/l de Na_2HPO_4 (VWR International, Belgique), tamponné à pH 7.4.

6.1.3. Purification

Ce surnageant est ensuite directement supplémenté par 20 % (114 g/l) de sulfate ammonique (Sigma-Aldrich, USA) et laissé sous agitation magnétique lente à 4°C pendant 30 minutes avant d'être mis en présence de 25 ml de *phenyl-sepharose 6 Fast Flow High Sub* (GE Healthcare, USA), préalablement lavée à l'eau distillée, pendant 30 minutes à 4°C. La fraction non adsorbée est récoltée après deux passages sur fritté puis concentrée par précipitation à 20-60 % de sulfate ammonique (262 g/l) sous agitation magnétique lente à 4°C pendant 30 minutes. Le culot résultant d'une centrifugation d'une vingtaine de minutes à 10000 g et 4°C est remis en solution dans ~ 25 ml (en partant d'un litre de culture) de tampon phosphate salin (PBS) de la composition suivante : 5 mM Na_2HPO_4 (Sigma, USA), 1.5 mM KH_2PO_4 (VWR International, USA) et 130 mM NaCl (VWR International, USA). La solution est ensuite dialysée en tubes de 50 kDa de seuil de rétention (Spectra/Por®CE, VWR International, USA) contre deux fois 10 l de ce même PBS durant une vingtaine d'heures à 4°C, puis aliquotée et conservée à -20°C. La *phenyl-sepharose 6 Fast Flow High Sub* est régénérée selon les spécifications du fournisseur.

6.1.4. Mise en évidence par électrophorèse

La production de LKT a été évaluée en termes de quantité et de pureté par examen du profil électrophorétique des échantillons sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (*SDS-PAGE*). Nous avons utilisé des gels NuPage 4-12 % dans un tampon MOPS, conformément aux instructions du fabricant (Invitrogen, USA). Les échantillons sont, si nécessaire, concentrés par la procédure suivante : ajout d' $1/10^{\text{ème}}$ du volume initial de déoxycholate de sodium 0.15 % (p/v) pendant 5 minutes à température ambiante puis ajout d' $1/10^{\text{ème}}$ du volume initial d'acide trichloroacétique 72 % (p/v) pendant 5 minutes à température ambiante avant centrifugation pendant 20 minutes à 10000 g. Le culot est alors resuspendu dans un mélange de 16 μl de Tris 1M et 4 μl de tampon de chargement (300 mM Tris pH 6.8, 50 % (v/v) glycérol, 12.5 % (p/v) dodécylsulfate de sodium (SDS), 25 % (p/v) β -

mercaptoéthanol, 0.05 % de bleu de bromophénol). Le volume total de 20 µl est chauffé pendant 10 min à 70°C puis chargé sur le gel. Celui-ci est placé dans la chambre d'électrophorèse contenant la solution tampon (MOPS) fournie par le fabricant et soumis à une différence de potentiel de 200 V durant 50 min. Le gel est ensuite coloré au *Simply Blue Safe Stain* (Invitrogen, USA) puis décoloré à l'eau distillée. Un cocktail de protéines de référence (*Seeblue[®] plus2 prestained standard*, Invitrogen, USA) a toujours été traité en même temps que chaque série d'échantillons, de manière à générer sur chaque gel une série de bandes de poids moléculaires connus.

6.1.5. *Identification par Western blot*

Après migration sur gel NuPage 4-12% comme décrit ci-dessus, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF pendant 1 heure à 30 V suivant les instructions du fournisseur (Invitrogen, USA). La membrane est saturée dans du PBS (Invitrogen, USA) contenant 3 % d'albumine sérique bovine (Sigma, USA) pendant une nuit à 4°C. Elle est ensuite lavée sous agitation par du PBS + 0.05 % de Tween 20 (Sigma, USA), incubée 1 heure à 37°C avec l'anticorps monoclonal anti-leucotoxine MM601 (aimablement fourni par Mme T. Ambagala, Nebraska, USA) dilué 10000 fois dans du PBS + 1 % BSA, lavée sous agitation par du PBS + 0.05 % de Tween 20, incubée 1 heure à 37°C avec un antisérum polyclonal anti-immunoglobulines de souris couplé à la peroxydase du raifort (*HRP, horseradish peroxydase*) (P0260, DAKO, USA) dilué 1500 fois dans du PBS + 1 % BSA, lavée sous agitation par du PBS + 0.05 % de Tween 20 puis révélée à l'aide du système AEC (DAKO, USA).

6.1.6. *Test de viabilité cellulaire (MTS)*

L'activité cytotoxique est estimée indirectement à l'aide du *CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, Belgique), une méthode colorimétrique d'évaluation de l'activité métabolique cellulaire. Brièvement, l'échantillon à tester est incubé 30 minutes à 4°C en présence ou non de 10 µg/ml de polymyxine B (Sigma, USA), un inhibiteur de l'action des lipopolysaccharides, puis dilué de deux en deux dans du milieu RPMI 1640 + L-glutamine supplémenté par 10 % de sérum fœtal bovin, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1.3 µg/ml de fungizone. Cinquante microlitres d'échantillon sont déposés en triple exemplaires dans une plaque 96 puits en compagnie de 50 µl de cellules en suspension dans le même milieu à une densité de 2×10^6 cellules/ml. Après 30 minutes d'incubation à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO₂, 20 µl du mélange MTS sont ajoutés pendant trois heures dans les mêmes conditions. La lecture est ensuite réalisée à 490 nm avec une référence à 660 nm.

Les différentes lignées utilisées, à savoir les BL3 (lignée lymphoblastique d'origine bovine, ATCC CRL-8037), les Raji (lignée lymphoblastique d'origine humaine, ATCC CCL-86) et les HL-60 (lignée myéloblastique d'origine humaine, ATCC CCL-240), sont cultivées en milieu RPMI 1640 + L-glutamine supplémenté par 10 % de sérum fœtal bovin, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de

streptomycine et 1.3 µg/ml de fungizone selon les spécifications de l'ATCC. Tous les réactifs de culture cellulaire proviennent de la société Invitrogen, USA.

6.1.7. Test de compétition avec l'anticorps anti-LKT MM601

La responsabilité de la leucotoxine dans l'induction de la toxicité a été évaluée par un test de viabilité cellulaire (voir paragraphe précédent) adapté comme suit : l'échantillon de leucotoxine est dilué 16 fois (ce qui correspond à la plus haute dilution de leucotoxine capable d'induire la cytotoxicité maximale) en milieu D-MEM supplémenté par 10 % de sérum fœtal bovin, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1.3 µg/ml de fungizone (tous les réactifs de culture cellulaire proviennent de la société Invitrogen, Belgique). Vingt-cinq microlitres de cet échantillon sont ensuite déposés en triple exemplaires dans une plaque 96 puits en compagnie de 25 µl de dilutions en série de deux en deux (1/1000 initial) de l'anticorps monoclonal MM601 réputé inhibiteur de l'activité de la leucotoxine (Gentry et Srikumaran, 1991; Deshpande *et al.*, 2002) et de 50 µl de BL-3 en suspension dans le milieu D-MEM supplémenté à une densité de 2×10^6 cellules/ml. Après 30 minutes d'incubation à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO₂, 20 µl du mélange MTS sont ajoutés pendant trois heures dans les mêmes conditions. La lecture est ensuite réalisée à 490 nm avec une référence à 660 nm.

6.2. Production et purification de la leucotoxine

6.2.1. *Choix de la souche et des conditions de culture*

Dans un premier temps, nous avons évalué (i) plusieurs souches de *Mannheimia haemolytica*, (ii) plusieurs milieux de culture (le BHI ou *Brain Heart Infusion broth*, le milieu RPMI 1640 avec 2 mM L-glutamine et le tryptone) et (iii) plusieurs densités initiales de l'inoculum (0.25, 0.5 et 1 à 620 nm).

Les souches provenaient du Service de Bactériologie de notre Faculté (d'origine ovine ou bovine) ou de l'ATCC (souche SH1217, sérotype A1 d'origine bovine), toutes conservées sous forme lyophilisée. Nos tentatives de revivification des lyophilisats n'ayant pas toutes réussi, et certaines souches démontrant d'emblée de meilleures caractéristiques de croissance, nous avons opté pour la souche caractérisée de l'ATCC, utilisée dans la littérature (Fedorova et Highlander, 1997; Sun *et al.*, 1999; Highlander *et al.*, 2000; McKerral et Lo, 2002) et capable de déclencher une mannheimiose sévère par inoculation intra-trachéale chez des veaux au sein de notre Faculté (Wallemacq *et al.*, accepté pour publication.).

Sur base de plusieurs expérimentations, nous avons opté pour le milieu BHI et une densité optique initiale de l'inoculum avoisinant 0.25 à 620 nm (données non présentées).

6.2.2. *Mise au point du protocole de purification*

Lorsque les conditions idéales pour la croissance bactérienne en termes (i) de densité initiale de l'inoculum et (ii) de milieu de culture ont été déterminées, nos essais ont consisté à tester plusieurs stratégies de purification sur un surnageant de culture récolté lorsque la densité optique à 620 nm avoisinait 1, conformément à la littérature (Waurzyniak *et al.*, 1994; Clinkenbeard *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1999). Nous avons ainsi évalué (i) une précipitation à 0-40 % et 0-60 % en sulfate ammonique, (ii) une chromatographie sur DEAE sépharose (GeHealthcare, Belgique), (iii) la concentration par centrifugation sur Vivaspin 20 de seuil de rétention de 100 kDa (VWR International, Belgique) et (iv) la purification sur *phenyl-sépharose 6 Fast Flow High Sub* (GeHealthcare, USA) décrite au point 6.1.3.

Globalement, seule cette dernière nous a permis d'obtenir une leucotoxine en quantité et qualité adéquates à nos objectifs.

6.2.3. Analyse du profil électrophorétique des fractions obtenues

La figure 13 nous présente les profils électrophorétiques obtenus dans les conditions décrites aux points 6.1.2 et 6.1.3. Les pistes 1 et 2 représentent la production protéique dans le milieu RPMI 1640 et dans le BHI, respectivement, plaçant pour une corrélation entre la croissance bactérienne et la production protéique moindres. Nous observons deux bandes majoritaires aux alentours de 100 kDa et plusieurs bandes de taille inférieure. Un passage sur *phenyl-sépharose 6 fast flow* nous permet d'éliminer la principale bande contaminante (celle du dessus), comme constaté sur les pistes 3 (le non adsorbé concentré à 60% de sulfate ammonique) et 4 (le non adsorbé concentré sur Vivaspin 100 kDa). Ces deux dernières fractions contiennent une protéine de haute pureté avoisinant 100 kDa. D'autres expérimentations ont malheureusement infirmé le résultat obtenu sur Vivaspin, technique par ailleurs très contraignante en raison de la lenteur de concentration.

Le fractionnement à différents pourcentages de sulfate ammonique, de même que l'échangeuse d'ions de type DEAE, ne nous ont pas offert de résultats satisfaisants (données non présentées).

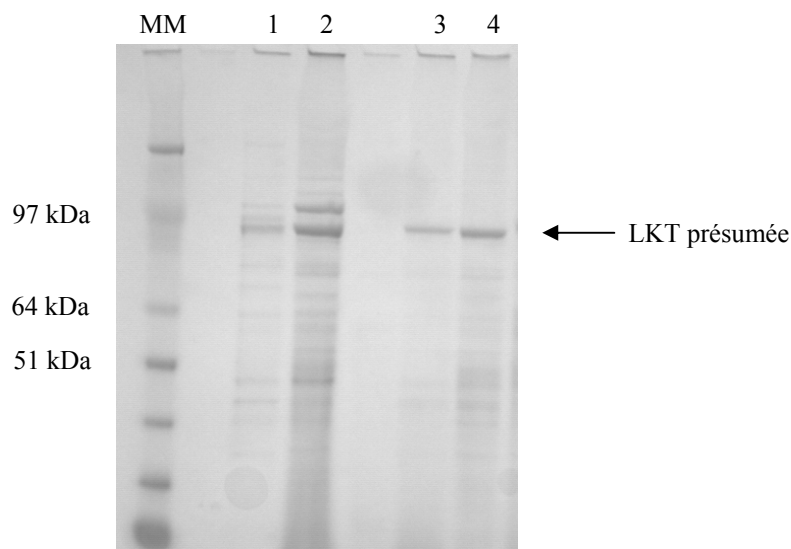


Figure 13 : Profil électrophorétique en conditions réductrices et dénaturantes de surnageants d'une culture de la souche SH1217 de *Mannheimia haemolytica* et des fractions issues d'une purification sur phényl-sépharose. La piste de gauche présente le profil du marqueur de masse moléculaire (MM). Les autres pistes présentent respectivement le surnageant de culture en RPMI (1), le surnageant de culture en BHI (2), la fraction non adsorbée de la phényl sépharose, précipitée au sulfate ammonique (3) ou concentrée sur Vivaspin 100000 (4). Les échantillons ont été concentrés 160 fois par rapport au surnageant initial.

6.2.4. Identification de la leucotoxine par Western blot

L'échantillon présenté à la piste 4 de la figure 13 a également été, après électrophorèse en conditions réductrices et dénaturantes, transféré sur membrane de PVDF puis mis en présence successivement de l'anticorps monoclonal anti-leucotoxine MM601 (Gentry et Srikumaran, 1991; Deshpande *et al.*, 2002) et d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (*horseradish peroxidase*, HRP) avant révélation via la transformation d'un substrat de cette enzyme (AEC, 3-amino-9-éthylcarbazole) en produit coloré. Nous constatons de la sorte (i) que la bande supposée est bien la leucotoxine et (ii) que celle-ci est partiellement dégradée (figure 14).

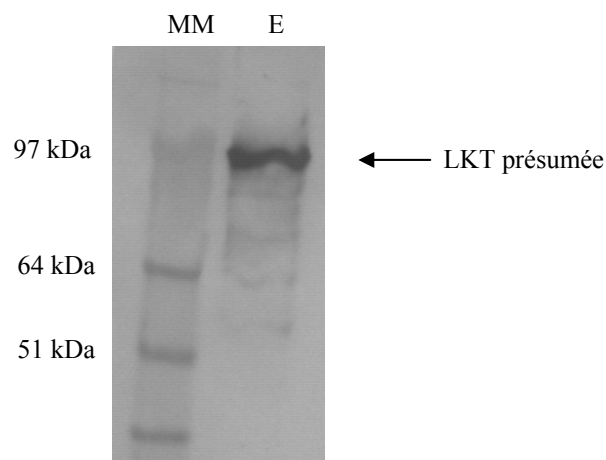


Figure 14 : Identification de la leucotoxine par *western blot*. La piste de gauche présente le profil du marqueur de masse moléculaire (MM) et celle de droite le profil de la fraction non adsorbée de la phényl-sépharose précipitée au sulfate ammonique (E), concentrée 160 fois par rapport au surnageant initial.

6.5. Conclusion

Au terme de cette partie du travail, nous pouvons prétendre maîtriser (i) les conditions de culture de *Mannheimia haemolytica*, (ii) la production, la purification et la validation d'une leucotoxine épurée des LPS et (iii) la mise en œuvre de tests de mortalité (marquage à l'iodure de propidium) et viabilité (MTS) cellulaires spécifiques.

7. Vers la caractérisation du site de liaison de la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica*

7.1. Matériel et méthodes

7.1.1. Schéma général

L'évaluation de la sensibilité à la leucotoxine des 18 variants du CD18 potentiellement responsables de la spécificité d'espèce de *Mannheimia haemolytica* envers les ruminants est réalisée différemment suivant le positionnement de ces sites. Ainsi, ceux de la portion extracellulaire seront étudiés par la mise en œuvre d'une compétition, vis-à-vis de la liaison à la leucotoxine, entre les cellules sensibles (BL-3) et des peptides dérivés du CD18 au niveau des dits sites. L'effet cytotoxique sera mesuré par le test de viabilité cellulaire MTS. Les variants transmembranaire et cytoplasmiques seront quant à eux évalués via transfection transitoire, en couple avec le CD11a bovin, de la lignée lymphoblastique humaine K-562 n'exprimant aucune β_2 -intégrine. L'expression des récepteurs LFA-1 mutants sera analysée par immunomarquage et passage en cytométrie en flux alors que l'effet toxique sera mesuré par un test de mortalité cellulaire (marquage à l'iodure de propidium), toujours par analyse en cytométrie en flux.

7.1.2. Choix des peptides synthétiques

Treize peptides (figure 18) ont été dessinés sur base de la séquence du CD18 bovin au voisinage des sites définis (en gras et souligné) dans sa portion extracellulaire. Deux d'entre eux (le 56 et le 1415) contiennent deux sites (respectivement les sites 5 et 6, et 14 et 15). Ils ont été synthétisés par la firme Eurogentec (Belgique) avec une pureté supérieure à 95%. Les peptides fournis lyophilisés sont remis en suspension avec de l'eau distillée à une concentration de 4.6×10^{-6} moles/ml avant aliquotage et conservation à -20°C .

Pep 1	H2N-DDIME <u>E</u> PKSLA-COOH
Pep 2	H2N-AETRDS <u>S</u> QAGSRK-COOH
Pep 3	H2N-KQLSPQ <u>E</u> VTLY-COOH
Pep 4	H2N-SYSM <u>V</u> DDLVN-COOH
Pep 56	H2N-TDNS <u>K</u> QF <u>E</u> TEVGK-COOH
Pep 7	H2N-EDNLYK <u>S</u> SNEFD-COOH
Pep 8	H2N-RDGSICG <u>R</u> GSME-COOH
Pep 9	H2N-ECG <u>V</u> CRCDAG-COOH
Pep 10	H2N-KIYGQ <u>F</u> CECDN-COOH
Pep 11	H2N-FCG <u>T</u> CRCDNQ-COOH
Pep 12	H2N-GCP <u>V</u> PCAGFA-COOH
Pep 13	H2N-GFAPC <u>T</u> ECLK-COOH
Pep 1415	H2N-RYD <u>V</u> HVDD <u>M</u> LEC-COOH

7.1.3. Test de compétition par mesure de la viabilité cellulaire

L'activité cytotoxique est estimée indirectement à l'aide du *CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Prolifération Assay* (Promega, Belgique), une méthode colorimétrique d'évaluation de l'activité métabolique cellulaire. Le protocole est dérivé de celui présenté au point 6.1.6. Brièvement, la leucotoxine purifiée est diluée, dans du RPMI 1640 + L-glutamine supplémenté par 10% de sérum fœtal bovin, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1.3 µg/ml de fungizone (le milieu de culture des BL-3, une lignée lymphoblastique d'origine bovine, ATCC n°CRL-8037), de manière à obtenir, deux fois concentrée, la plus haute dilution présentant l'effet cytotoxique maximal, en présence de 10 µg/ml de polymyxine B (Sigma, USA), un inhibiteur de l'action des lipopolysaccharides. Vingt-cinq microlitres de cette solution sont déposés en triple exemplaires dans une plaque 96 puits en présence de 25 microlitres de peptides en dilution dans ce même RPMI 1640 supplémenté [gamme de 10 en 10, partant d'un excès de peptides par rapport à une estimation par dosage µBCA (Pierce, USA) de la quantité de leucotoxine ajoutée d'un facteur 1000 à un facteur 0.0001], incubés 30 minutes à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO₂ puis mis en présence de 50 µl de cellules BL-3 en suspension dans le même milieu à une densité de 2x10⁶ cellules/ml. Après 30 minutes d'une nouvelle incubation à 37°C, 20 µl du mélange MTS sont ajoutés pendant trois heures dans les mêmes conditions. La lecture est ensuite réalisée à 490 nm avec une référence à 660 nm. Les dilutions de leucotoxine et de peptides sont filtrées sur 0.22 µm avant chaque expérimentation. Tous les réactifs de culture cellulaire proviennent de la société Invitrogen, Belgique.

7.1.4. Mutagenèse dirigée du CD18 bovin

La réaction de mutagenèse dirigée est effectuée par *PCR* en utilisant comme matrice le vecteur pcDNA4 (Invitrogen, Belgique, figure 19) contenant l'ADN complémentaire du CD18 bovin (pcDNA4-BoCD18) et comme amorces deux oligonucléotides de 30 à 40 bases dessinés suivant les recommandations de la firme Stratagène, à savoir (i) les deux amorces contiennent la mutation d'intérêt et sont partiellement complémentaires, (ii) elles contiennent chacune 10 à 15 bases de séquence correcte, (iii) leur température de fusion (*T_m, melting temperature*) doit être supérieure ou égale à 78°C, (iv) elles doivent se terminer par un ou plusieurs C ou G et avoir un pourcentage minimal de GC de 40 % et (v) elles doivent être purifiées par *fast polynucleotide liquid chromatography (FPLC)* ou par *polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)*.

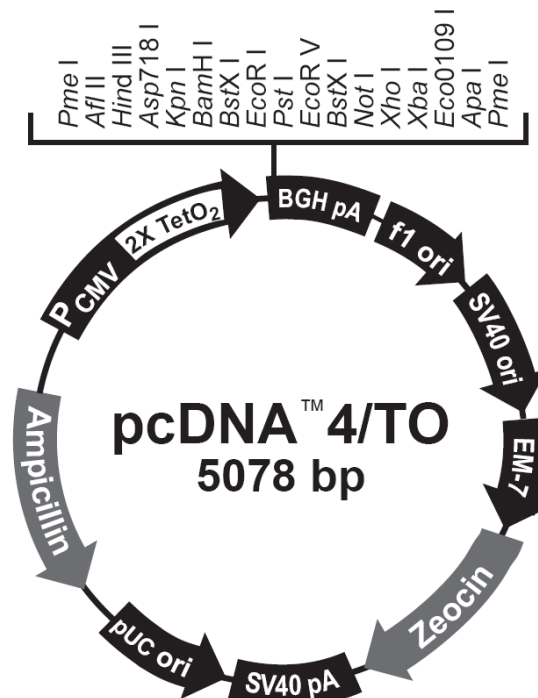
Les conditions de *PCR* sont les suivantes : 50 ng de matrice pcDNA4-BoCD18 sont dilués dans un mélange réactionnel composé de 9 µl de LB liquide (Sigma-Aldrich, Belgique), 5 µl de dNTPs 2 mM (Fermentas, Belgique), 5 µl de tampon Thermopol (New England Biolabs, United Kingdom), 0.5 µl de MgSO₄ 100 mM (New England Biolabs, United Kingdom), 2.5 µl de DMSO (diméthylsulfoxyde), 2 µl de chaque amorce (chacune à une concentration de 10 µM), 0.5 µl de

polymérase Vent (2 u/μl) (New England Biolabs, United Kingdom), le tout amené à 50 μl avec de l'eau mQ.

Les paramètres de l'amplification sont 3 min à 94°C, 18 cycles incluant (i) 1 min à 94°C, (ii) 1 min à 63°C et (iii) 8 min à 72°C, suivis d'une extension finale de 60 min à 72°C. Le produit de *PCR* est ensuite digéré à la DpnI (New England Biolabs, United Kingdom) pendant 1 heure à 37°C avant mise en œuvre des procédures décrites aux points 5.1.4 et 5.1.5.

Les amorces utilisées sont :

BoCD18 mut 16 sens	5'-GTCGTGCTCATCGGCATCCTCCTGCTGGTCATCTGG-3'
BoCD18 mut 16 rev	5'-GATGCCGATGAGCACGACGCCCCCCACGGTGCCC-3'
BoCD18 mut 17 sens	5'-GGGAGTACARRCGCTTTGAGAAGGAGAAGCTCAAGTCCC-3'
BoCD18 mut 17 rev	5'-CTTCTCAAAGCGYYTGTACTCCCTGAGGTCGCTCAG-3'



**Comments for pcDNA™ 4/TO
5078 nucleotides**

CMV promoter: bases 232-958

TATA box: bases 804-810

Tetracycline operator (2X TetO₂) sequences: bases 820-859

CMV forward priming site: bases 769-789

Multiple cloning site: bases 967-1077

BGH reverse priming site: bases 1089-1106

BGH polyadenylation sequence: bases 1095-1319

f1 origin: bases 1365-1793

SV40 promoter and origin: bases 1803-2143

EM-7 promoter: bases 2183-2249

Zeocin™ resistance gene: bases 2250-2624

SV40 early polyadenylation sequence: bases 2754-2884

pUC origin: bases 3267-3937

bla promoter: bases 4937-5041 (complementary strand)

Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 4082-4942 (complementary strand)

Figure 19 : Carte du vecteur pcDNA™ 4/TO

7.1.5. Obtention de l'ADN complémentaire du CD18 humain

Les cellules myéloblastiques d'origine humaine Raji (ATCC CCL-86), cultivées en milieu RPMI 1640 + L-glutamine supplémenté par 10% de sérum fœtal bovin, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1.3 µg/ml de fungizone selon les spécifications de l'ATCC (tous les réactifs de culture cellulaire proviennent de la société Invitrogen, USA), sont stimulées, à une densité de 10^7 cellules/ml, par ajout de 25 ng/ml de *phorbol myristate acetate* (PMA) dans le milieu de culture pendant 15 minutes à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Le PMA est un mimétique du diacylglycérol connu comme stimulateur de l'expression des β₂-intégrines. L'ARN total de ces cellules est extrait comme décrit au point 5.1.3 et l'ADN complémentaire est obtenu selon les méthodes décrites aux points 5.1.4 à 5.1.6. Brièvement, l'ARN total est soumis à une transcription inverse en utilisant le kit Improm II (Promega, Belgique) et l'ADN complémentaire résultant à une PCR à l'aide d'amorces dessinées suivant la séquence publiée du CD18 humain (GenBank NM_000211):

Dans l'UTR-5' : **5'-CAGGGCAGACTGGTAGCAAA-3'**
 Dans l'UTR-3' : **5'-CACGCACCTAACCTCACCAA-3'**

Les conditions de PCR sont les suivantes : 25 pg d'ADNc sont dilués dans un mélange réactionnel composé de 5 µl de dNTP 2 mM, 5 µl de tampon A, 5 µl de tampon B, 1 µl d'élongase (Invitrogen, Belgique), 2 µl de chaque amorce (chacune à une concentration de 10 µM), le tout amené à 50 µl avec de l'eau.

Les paramètres de l'amplification sont 2 min 30 à 94°C, 35 cycles incluant (i) 30 s à 94°C, (ii) 45 s à 50°C et (iii) 2 min 30 à 68°C, suivis d'une extension finale de 10 min à 68°C.

Quatorze amorces (sept dans le sens direct et autant dans le sens indirect) se sont avérées nécessaires afin de couvrir l'entièreté du CD18 humain :

M13 forward : **5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'**
 M13 reverse : **5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'**
 HuCD18 sens 1 : **5'-CTGAACTTCACAGGGCCGGG-3'**
 HuCD18 sens 2 : **5'-CATTGGCTTCGGGTCCTTC-3'**
 HuCD18 sens 3 : **5'-TCACCTGGAGGACAACCTGT-3'**
 HuCD18 sens 4 : **5'-AGGAGCAGTCGTTTGTTCATC-3'**
 HuCD18 sens 5 : **5'-CAACTGTGAGCGCTACAAC-3'**
 HuCD18 sens 6 : **5'-GCTGCTGGGTGGCCTACACG-3'**
 HuCD18 rev 1 : **5'-TAAAGCGTCACTTTTTGTGG-3'**
 HuCD18 rev 2 : **5'-CTGCTTCCCGACCTCGGTCT-3'**
 HuCD18 rev 3 : **5'-AATGAGATGGACCACATTGC-3'**
 HuCD18 rev 4 : **5'-ACAGTTTTTCCCAATGTAGC-3'**

HuCD18 rev 5 :	5'-CAGCCCTCAGTGGTCCTCTC-3'
HuCD18 rev 6 :	5'-CAGATGACCAGCAGGAGAAT-3'
HuCD18 rev 7 :	5'-ATGGTGGATCCTGGGACTCT-3'
HuCD18 rev 8 :	5'-CCGCTCAGCACGTAGAGATA-3'

La séquence du CD18 humain obtenue correspond à celle publiée (GenBank NM_000211) et a été insérée dans le vecteur pcDNA4 (Invitrogen, Belgique).

7.1.6. Double-transfection transitoire de la lignée lymphoblastique K-562 en vue de l'expression de récepteurs LFA-1 bovins mutés

La double-transfection est réalisée à l'aide du *Cell Line Nucleofector™ Kit V* optimisé pour les cellules lymphoblastiques humaines K-562 (ATCC n°CCL-243) selon les instructions du fournisseur (amaxa, Allemagne). Brièvement, les cellules K-562, cultivées en milieu D-MEM supplémenté par 10% de sérum fœtal bovin, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1.3 µg/ml de fungizone sont passées à une densité de 10⁵ cellules/ml deux jours avant la nucléofection, de manière à obtenir 4-6 x 10⁵ cellules/ml le jour désiré. Un million de cellules sont placées dans un tube de 15 ml par condition et centrifugées 10 min à 300 g. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 1 ml de PBS avant une nouvelle centrifugation de 10 min à 300 g. Le surnageant est éliminé complètement à la micropipette avant ajout de 2.5 µg de chacun des deux plasmides (dissous dans 1-5 µl d'eau ou de TE) préalablement purifiés à l'aide du *E.Z.N.A. Endo-Free Plasmid Mini Kit II* (Omega Bio-tek, Allemagne) et ajout de 100 µl de Nucleofector™ Solution V. Chaque échantillon est transféré, après mélange, dans une cuvette certifiée amaxa puis soumis au programme T-16 du *Nucleofector™ II* (amaxa, Allemagne). Dès que celui-ci est terminé, la cuvette est retirée pour y ajouter 500 µl de RPMI 1640 + 2 mM L-glutamine supplémenté par 10 % de sérum fœtal bovin, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1.3 µg/ml de fungizone préchauffé à 37°C avant transfert de la solution dans un nouveau tube de 15 ml et incubation 10 minutes à 37°C. Le tout est alors transféré dans une plaque 6 puits en présence de 1.5 ml de D-MEM supplémenté par 10% de sérum fœtal bovin, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1.3 µg/ml de fungizone préchauffé à 37°C pour une incubation de 24 h à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO₂. Les cellules sont ensuite lavées et récupérées par 7 ml de PBS avant mise en suspension dans du RPMI 1640 + 2 mM L-glutamine supplémenté par 10 % de sérum fœtal bovin, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1.3 µg/ml de fungizone à une densité de 2 x 10⁶ cellules/ml. Tous les réactifs de culture cellulaire proviennent de la société Invitrogen, Belgique.

7.1.7. Immunomarquage des lignées transfectées

Environ 2-3 x 10⁵ cellules d'intérêt sont resuspendues dans 1 ml de PBS (Invitrogen, Belgique) + 1 % BSA (*Bovine serumalbumin*, Sigma, USA), incubées 20 minutes sur glace et mises en présence de 1 µl d'anticorps monoclonaux anti-CD11a bovin/humain (555382, BD Biosciences, USA)

et/ou anti-CD18 bovin (BAQ30A, VMRD, USA) pendant 20 minutes sur glace. Après centrifugation de 10 minutes à 300 g, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec du PBS + 1 % BSA avant une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 300 g. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 1 ml de PBS + 1 % de BSA contenant 1 µl d'anticorps secondaire couplé à l'alexa 488 (A11001, Molecular probes, USA) pour incubation de 20 minutes sur glace. Après centrifugation de 10 minutes à 300 g, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 ml de PBS. L'opération est répétée et le culot est resuspendu dans 500 µl de PBS contenant 2.5 µg/ml d'iodure de propidium (Dako, Danemark) puis incubé pendant au minimum dix minutes sur glace et à l'obscurité avant analyse en cytométrie en flux (FACSCanto™, BD Biosciences, USA) en FL1 (excitation à 488 nm et émission à 530/30 nm) pour le marquage à l'Alexa 488 et en FL3 (excitation à 488 nm et émission à 670 nm et plus) pour le marquage à l'iodure de propidium, avec sélection de 10000 évènements.

7.1.8. *Test de mortalité cellulaire*

L'activité cytotoxique est estimée directement à l'aide du principe d'identification des cellules vivantes ou mortes via l'incorporation sélective de l'iodure de propidium, un intercalant fluorescent rouge qui se fixe de manière irréversible sur l'ADN mais qui, de par sa nature hydrophile, ne pénètre uniquement que dans les cellules dont les membranes sont dégradées.

Cinquante microlitres de cellules d'intérêt en suspension à une densité de 2×10^6 cellules/ml dans le milieu de culture (D-MEM ou RPMI 1640 + 2 mM L-glutamine supplémenté par 10 % de sérum fœtal bovin, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1.3 µg/ml de fungizone, tous de la société Invitrogen, Belgique) sont mis en présence de 50 µl de leucotoxine en dilution ou de milieu de culture (témoin négatif) ou de 10 % de paraformaldéhyde (témoin positif) pendant 30 minutes à 37°C (4°C pour le paraformaldéhyde) et sous une atmosphère de 5 % de CO₂, lavées par 1 ml de PBS (DPBS) glacial (Invitrogen, Belgique) et centrifugées à 200 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé délicatement et le culot resuspendu dans 500 µl de DPBS contenant 2.5 µg/ml d'iodure de propidium (Dako, Danemark) puis incubé pendant au minimum dix minutes sur glace et à l'obscurité avant analyse en cytométrie en flux (FACSCanto™, BD Biosciences, USA) en FL3 (excitation à 488 nm et émission à 670 nm et plus) avec sélection de 10000 évènements.

7.2. Tentative d'inhibition de l'activité cytotoxique de la leucotoxine par compétition avec des peptides synthétiques

Nous avons tenté d'inhiber l'effet cytotoxique de la leucotoxine sur la lignée lymphoblastique bovine BL-3 par le biais d'une compétition, pour la liaison à la leucotoxine, entre ces cellules BL-3 et un mélange des 13 peptides décrits au point 7.1.2 et dessinés à partir de la séquence du CD18 bovin. Ces peptides reprennent les 15 sites potentiellement responsables de la spécificité d'espèce de *Mannheimia haemolytica* envers les ruminants. Nous n'observons à la figure 20 aucun effet

7.4. Conclusion

Nous avons utilisé deux approches différentes pour évaluer l'impact des mutations répertoriées aux sites du CD18 bovin où un résidu A conservé chez les ruminants était systématiquement remplacé par un résidu B chez les non-ruminants.

En ce qui concerne les 15 sites de la région extracellulaire, nous avons mis en place une expérience de compétition en incubant la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* et les cellules lymphoblastiques bovines BL-3 en présence de peptides dérivés de la séquence du CD18 bovin au voisinage des dits sites. Ces peptides, en mélange équimolaire ou individuellement, n'ont donné lieu à aucune inhibition de l'activité leucotoxique.

En ce qui concerne le site de la région transmembranaire (mutant 16, V₇₁₅I) et celui de la portion cytoplasmique (mutant 17, variants H₇₃₆K et H₇₃₆R), nous nous sommes livrés à des expérimentations de transfection transitoire de la lignée lymphoblastique humaine K-562. Celle-ci est en effet connue pour n'exprimer naturellement aucune β_2 -intégrine mais pour avoir l'aptitude, après transfection des sous-unités CD11a et CD18 bovines, d'acquérir la sensibilité à la leucotoxine (Dileepan *et al.*, 2005b). Nous avons validé notre méthodologie en réitérant cette expérience (contrôle positif) alors que la co-transfection des sous-unités CD11a bovine et CD18 humaine ne conférait aux K-562 aucune sensibilité à la LKT (contrôle négatif), ce qui correspond également à des résultats publiés récemment par une équipe concurrente (Dileepan *et al.*, 2005a). Les mutations V₇₁₅I (mutant 16), H₇₃₆K et H₇₃₆R (variants du mutant 17) du CD18 n'ont montré aucun impact sur la sensibilité à la leucotoxine puisque les cellules K-562 co-transfectées avec le LFA-1 bovin muté à ces sites présentent globalement le même profil qu'avec le LFA-1 bovin original. Ces résultats ont été confirmés indépendamment par les équipes des professeurs Maheswaran et Srikumaran qui, en mettant en œuvre l'ingénierie de lignées cellulaires stables afin respectivement de rendre résistante une lignée sensible en intégrant des fragments du CD18 humain dans un LFA-1 bovin (Dileepan *et al.*, 2005a) ou de rendre sensible une lignée cellulaire qui ne l'est pas en intégrant des fragments du CD18 bovin dans un LFA-1 murin (Gopinath *et al.*, 2005), excluent toute contribution des régions transmembranaire et cytoplasmique du CD18 dans la spécificité d'espèce de la leucotoxine envers les leucocytes des ruminants.

8. Articles originaux

- 8.1. The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA : molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins
T. Fett, L. Zecchinon, E. Baise, D. Desmecht. *Gene* 325: 97-101 (2004).
- 8.2. Cloning and characterisation of the primary structure of the sheep lymphocyte function-associated antigen-1 α subunit
T. Fett, L. Zecchinon, E. Baise, D. Desmecht. *Molecular Immunology* 42 (12): 1503-1508 (2005).
- 8.3. Molecular characterisation of the caprine (*Capra hircus*) lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit-encoding cDNA
T. Fett, L. Zecchinon, E. Baise, D. Desmecht. *BMC Veterinary Research* 1: 4 (2005).
- 8.4. Molecular cloning and characterisation of the CD18 partner in ovine (*Ovis aries*) β_2 -integrins
T. Fett, L. Zecchinon, E. Baise, D. Desmecht. *Gene* 334: 47-52 (2004).
- 8.5. Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*
T. Fett, L. Zecchinon, E. Baise, D. Desmecht. *Molecular Membrane Biology* 21: 289-295 (2004).

Troisième partie

DISCUSSION & PERSPECTIVES

9. Spécificité du LFA-1 des ruminants

Les caractères de résistance innée aux maladies ont été, depuis des millénaires, largement disséminés dans les populations animales grâce à la sélection naturelle, ne favorisant la survie que d'individus résistants à telle ou telle maladie. La domestication a, quant à elle, fait intervenir un élément neuf, à savoir la sélection artificielle de caractères relatifs aux productions. Concomitamment, les conditions d'élevage ont évolué vers un système concentrationnaire où l'extrême densité des populations animales a fourni aux agents pathogènes une niche infiniment plus propice à la contagion. Le résultat est que les populations animales n'ont jamais été soumises à des pressions d'infection plus intenses que celles qui prévalent aujourd'hui, tout en comptant progressivement moins d'individus résistants, à mesure que la pression de sélection s'exerce unilatéralement en faveur des productions. Une des conséquences en est le recours à l'administration massive d'antibiotiques, avec les répercussions que l'on connaît sur l'émergence de souches multi-résistantes (Ferber, 2000 ; Angulo *et al.*, 2004 ; Molbak, 2004).

De ce qui précède, il ressort que la priorité de la recherche dans une discipline comme la pathologie vétérinaire est d'identifier des critères permettant de restaurer une pression de sélection favorable à la dissémination la plus large possible de traits de résistance aux maladies. Mener une telle action va dans le sens d'un renforcement de l'autonomie et du profit des éleveurs, rendus moins dépendants des substances médicamenteuses, des retards de croissance et des saisies à l'abattage mais rencontre également le souci du consommateur de disposer d'une alimentation pécuniairement abordable, saine et sans résidus.

Dans ce contexte, l'importance de la β_2 -intégrine LFA-1 prend toute son ampleur dans la manheimiose, la pathologie la plus dévastatrice en élevage bovin, puisqu'il a été clairement démontré que celle-ci doit sa spécificité restreinte aux ruminants à une interaction tout aussi spécifique entre la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* et le LFA-1 de ces derniers (Ambagala *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1999 ; Jeyaseelan *et al.*, 2000 ; Deshpande *et al.*, 2002 ; Jeyaseelan *et al.*, 2002 ; Dileepan *et al.*, 2005b ; Zecchinon *et al.*, 2005).

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 ainsi permis de comparer le LFA-1 des ruminants à certains de ses homologues non ruminants pour aboutir à la conclusion que globalement, tous ces récepteurs présentent la même organisation générale. On retrouve en effet chez chacun d'eux les mêmes motifs structuraux caractéristiques, à savoir un peptide signal potentiel, une large portion 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.

10. Le domaine sous-jacent à la virulence de la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica*

A l'aube de ce projet, l'identification de la sous-unité du LFA-1 responsable de la spécificité d'espèce qu'exhibe *Mannheimia haemolytica* vis-à-vis des ruminants était fortement controversée, le CD18 (Wang *et al.*, 1998; Ambagala *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1999) et le CD11a (Jeyaseelan *et al.*, 2000) ayant chacun leurs partisans. Aujourd'hui, si la fixation de la leucotoxine au CD11a semble nécessaire, nous savons que l'interface de liaison impliqué n'est pas propre aux ruminants comme le prouve l'induction, par la leucotoxine, de cytotoxicité chez des lignées exprimant les hétérodimères chimériques CD11a murin/CD18 bovin (Deshpande *et al.*, 2002) et CD11a humain/CD18 bovin (données personnelles non présentées). A contrario, il a été clairement établi que le motif moléculaire spécifique nécessaire à l'induction de cytolysse par la leucotoxine était porté par le CD18 (Deshpande *et al.*, 2002 ; Dileepan *et al.*, 2005a; Dileepan *et al.*, 2005b).

Deux équipes concurrentes ont tablé sur l'ingénierie de lignées cellulaires stables exprimant des LFA-1 chimériques humain/bovin (Dileepan *et al.*, 2005a) ou murin/bovin (Gopinath *et al.*, 2005) afin d'identifier le site précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18 et ce, pour aboutir à des résultats apparemment contradictoires puisque celui-ci est annoncé soit dans les 291 premiers résidus du CD18 (Gopinath *et al.*, 2005), c'est-à-dire dans la portion extracellulaire contenant le domaine *PSI* (*plexin-semaphorin-integrin*) et une partie du *I-like domain* dont le site d'adhésion dépendant des ions métalliques (*MIDAS*, *metal ion-dependent adhesion site*), soit entre les résidus 500 et 600 de la portion extracellulaire du CD18, correspondant aux domaines *EGF* (*epidermal growth factor*) -2 à 4 (Dileepan *et al.*, 2005a). De notre côté, nous avons opté pour une approche plus « chirurgicale » découlant de la mise en évidence des 17 sites de divergence lors de la comparaison des CD18 des ruminants par rapport à certains de leurs homologues non ruminants (Zecchinon *et al.*, 2004a) et consistant à ingénierer les CD18 bovins mutants correspondants. Nous avons ainsi déjà pu évaluer les sites des domaines transmembranaires et cytoplasmiques pour aboutir à la conclusion qu'ils n'étaient pas responsables de la spécificité d'espèce de *M. haemolytica*, comme cela a été confirmé indépendamment par d'autres (Dileepan *et al.*, 2005a ; Gopinath *et al.*, 2005). En ce qui concerne les 15 sites de la région extracellulaire, nous avons mis en place une expérience de compétition en

incubant la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* et les cellules lymphoblastiques bovines BL-3 en présence de peptides dérivés de la séquence du CD18 bovin au voisinage des dits sites. Ces peptides, en mélange équimolaire ou individuellement, n'ont donné lieu à aucune inhibition de l'activité leucotoxique. Nous pouvons exclure un problème de solubilité (aucun précipité n'était visible) ou de quantité insuffisante des peptides dans le milieu réactionnel, puisque nous avons dosé la leucotoxine, calculé le nombre de moles de celle-ci et ajouté les peptides dans une gamme allant d'un excès molaire de 1000 fois à 0.0001 fois sans noter la moindre variation. Par contre, rien ne nous indique que les peptides sélectionnés ont adopté une conformation similaire à celle qui est la leur dans la protéine complète.

11. Perspectives à court terme

L'étude par double-transfection transitoire de la lignée lymphoblastique humaine K-562 des 15 LFA-1 mutants correspondant aux sites mis en évidence au niveau du domaine extracellulaire du CD18 constituera la prochaine étape de notre projet. Il est toutefois possible que plusieurs sites voire plusieurs domaines soient nécessaires à l'induction spécifique de toxicité. Nous nous proposons dès lors de construire des chimères en remplaçant uniquement des régions bien définies du CD18 comme le domaine *PSI*, le *I-like domain* ou les domaines *EGFs* par leur correspondant humain, de manière à perturber le moins possible la structure tridimensionnelle de l'intégrine résultante, contrairement à nos concurrents qui ont divisé le CD18 de manière plus aléatoire (Gopinath *et al.*, 2005). Enfin, une fois le motif moléculaire du CD18 responsable de la spécificité d'espèce de *M. haemolytica* identifié par ingénierie génétique du mutant ou de la chimère correspondant, nous devons nous assurer que ce (cette) dernier(e) conserve son aptitude à effectuer la margination et la diapédèse. Il est en effet connu que des animaux *BLAD* (acronyme désignant la maladie génétique baptisée *bovine leukocyte adhesion deficiency*) n'exprimant pas le récepteur LFA-1 souffrent d'un déficit fonctionnel de leurs neutrophiles qui ralentit voire abolit leur capacité à s'extraire du torrent sanguin par diapédèse, ce qui cause l'apparition récurrente de maladies (Shuster *et al.*, 1992b; Cox *et al.*, 1997).

12. Perspectives à long terme

12.1. Inventaire de la variation génétique spontanée du CD18

L'identification du motif précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18 permettra la mise en œuvre (i) d'un inventaire de la variation génétique spontanée présente dans les races viandeuses Blanc Bleu Belge et internationales au niveau dudit motif et (ii) d'un service de génotypage. Le but au terme du projet sera d'éliminer certains taureaux d'insémination artificielle et/ou de proposer une tactique

d'accouplement préférentielle permettant de disséminer le plus rapidement possible un trait de résistance innée à la mannheimiose au sein des populations bovines belge et internationale. Si à première vue, il semble peu probable que la variation intra *Bos taurus* soit supérieure à la variation inter-ruminants, l'exemple du mouflon canadien (*Bighorn sheep, Ovis canadensis*) dont les polymorphonucléaires sont quatre à huit fois plus sensibles à la leucotoxine que ceux du mouton domestique (*Ovis aries*) (Silflow et Foreyt, 1994), alors que leurs CD18 présentent 99 % d'identité (Liu *et al.*, 2006), nous donne à penser que cette piste vaut néanmoins la peine d'être explorée.

12.2. Chimiothérapie

Cibler et inhiber l'interaction spécifique entre la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* et la sous-unité CD18 des ruminants constitue une stratégie de choix pour lutter contre la mannheimiose sans recourir systématiquement à l'administration massive d'antibiotiques. Nous pouvons nous inspirer des nombreuses recherches menées sur le récepteur LFA-1, qui de par sa contribution active aux interactions moléculaires complexes responsables de nombreuses fonctions normales et pathologiques du système immunitaire, se retrouve à l'origine de nombreuses maladies d'étiologies diverses (génétique, bactérienne, virale, néoplasique, allergique et auto-immune), avec des impacts divers sur les santés humaine et animale (Zecchinon *et al.*, 2006b). De l'étude intensive de son interaction avec son principal ligand CD54 ou ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) furent en effet développés, à but thérapeutique, des anticorps, des peptides, des peptidomimétiques et des petites molécules inhibitrices (Zecchinon *et al.*, 2006a).

12.2.1. *Anticorps*

Etant donné que l'interaction LFA-1/ICAM-1 est essentielle pour l'activation et la migration des leucocytes vers les tissus cibles, il a été montré que l'administration d'anticorps dirigés contre LFA-1 ou ICAM-1 peuvent par exemple prévenir ou diminuer l'impact du diabète insulino-dépendant (Moriyama *et al.*, 1996; Barouch *et al.*, 2000), de l'arthrite rhumatoïde (Schulze-Koops *et al.*, 1995; Kavanaugh *et al.*, 1996), de l'asthme (Iwamoto et Nakao, 1995), du psoriasis (Papp *et al.*, 2001; Gottlieb *et al.*, 2002; Cather et Menter, 2003; Pietrzak *et al.*, 2003) et du rejet d'organe (Isobe *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1999; Nicolls *et al.*, 2000; Anderson et Siahhan, 2003). Dans le traitement de l'asthme, un effet synergique a même été observé puisqu'un effet plus marqué d'inhibition de recrutement d'éosinophiles et de production d'immunoglobulines E est obtenu avec des anticorps monoclonaux dirigés contre le LFA-1 et ICAM-1 par rapport à un traitement avec l'anti-LFA-1 seul, ce qui peut s'expliquer par la redondance des paires d'adhésion puisque LFA-1 a au moins six ligands (ICAM-1 à -5 et JAM-A) alors qu'ICAM-1 lie aussi Mac-1 (Iwamoto et Nakao, 1995; Zecchinon *et al.*, 2006a).

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

12.2.2. Peptides

Plusieurs peptides inhibiteurs dessinés à partir du CD11a et du CD18 ont été étudiés chez l'Homme, comme LAB (CD11a₂₃₇₋₂₆₁) et ses dérivés cycliques cLAB.L (CD11a₂₃₇₋₂₄₆), cLAB.C (CD11a₂₄₄₋₂₅₃) et cLAB.R (CD11a₂₅₁₋₂₆₁) qui découlent du *I domain* du CD11a (Tibbetts *et al.*, 1999; Tibbetts *et al.*, 2000), LAB.2 (CD11a₄₄₁₋₄₆₅) et son dérivé cyclique cLAB.2L (CD11a₄₄₁₋₄₅₀) qui proviennent de la région de liaison des cations divalents du CD11a (Jois *et al.*, 1999; Tibbetts *et al.*, 1999) ou encore LBE (CD18₁₁₂₋₁₃₇) et ses dérivés cycliques cLBE.L (CD18₁₁₂₋₁₂₂) et cLBE.C (CD18₁₂₀₋₁₂₉) qui émanent du *I-like domain* du CD18 (Tibbetts *et al.*, 2000).

Chez les ruminants, l'identification du site de liaison précis de la leucotoxine sur le CD18 pourrait nous permettre, si les résidus impliqués constituent un (des) motif (s) linéaire (s), d'envisager une approche thérapeutique basée sur l'administration de ce ou ces peptide (s) en vue d'une inhibition, par compétition, de la liaison de la leucotoxine sur le CD18 (le peptide fonctionnera à la manière d'un leurre pour la LKT) et donc d'une inhibition de la virulence de *Mannheimia haemolytica in vivo*. Nous pouvons par ailleurs espérer (mais les expérimentations adéquates devront être réalisées) n'agir que sur cette liaison et pas sur les interactions entre le LFA-1 et ses ligands « naturels » (ICAM-1 à -5 et JAM-A). A défaut de l'identification précise du motif concerné, il est toutefois possible d'effectuer un criblage d'une banque de peptides par *phage display*, comme ce fut le cas pour le nonapeptide cyclique IPO1 qui, bien que ne présentant aucune homologie de séquence avec les sous-unités de LFA-1, s'avère être un antagoniste de l'agrégation cellulaire dépendante d'ICAM-1 (Shannon *et al.*, 2001). Sur base de divers exemples de la littérature, il semble que nous devrions procéder à la cyclisation du ou des peptides identifiés ; en effet, la fragmentation d'un peptide dérivé du domaine 1 d'ICAM-1, baptisé ICAM₁₋₂₁, en peptides cycliques chevauchants cIBL (ICAM₁₋₁₀), cIBC (ICAM₆₋₁₅) et cIBR (ICAM₁₂₋₂₁), conduit à une inhibition de l'adhésion homotypique et hétérotypique des cellules T, aussi bien que de la réaction mixte lymphocytaire, plus efficace que celles induites par leur « parent », suggérant que la restriction conformationnelle imposée par la cyclisation des peptides crée une structure plus rigide qui empêche l'adoption par le peptide de conformations non productives et

permet une meilleure liaison au LFA-1 pour bloquer son interaction avec ICAM-1 (Jois *et al.*, 1997; Gursoy *et al.*, 1999; Gursoy et Siahaan, 1999; Tibbetts *et al.*, 2000).

Une peptidothérapie au niveau des mécanismes de signalisation du LFA-1 a déjà permis l'obtention de résultats en terme de blocage de l'influx de calcium, de l'activation LFA-1-dépendante de la calcium-calmoduline kinase et de là l'activation et la dégranulation des cellules *natural killer* après contact avec les cellules dendritiques, via un peptide dérivé du domaine C-terminal de la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1) (Zocchi *et al.*, 1998; Poggi *et al.*, 2002). Cette approche ne nous semble pourtant pas pertinente dans le contexte qui nous occupe, notre objectif étant d'inhiber l'interaction spécifique leucotoxine-CD18 sans perturber le fonctionnement habituel du LFA-1 et des leucocytes.

12.2.3. Peptidomimétiques

Les peptides endogènes proviennent d'une biosynthèse qui a pour objectif de répondre à un besoin local et momentané dans un endroit précis de l'organisme et sont donc, après avoir rempli leur fonction, dégradés en leurs aminoacides constitutifs ou dérivés qui vont être éliminés ou recyclés selon les besoins (Guery, 2003). Mais ces qualités propres aux peptides endogènes se révèlent être des défauts majeurs lors de l'emploi de ces produits comme agents thérapeutiques. Ceux-ci souffrent ainsi de nombreuses limitations, en particulier, (i) une faible biodisponibilité par voie orale due à une mauvaise absorption concomitante à leur poids moléculaire élevé et à l'absence de systèmes transporteurs spécifiques, (ii) une faible stabilité métabolique face à la protéolyse par les peptidases et protéases au niveau gastro-intestinal et sérique et (iii) une élimination rapide par voie hépatique et rénale donnant une durée d'action particulièrement brève (Horwell, 1996; Rubin-Carrez, sans date).

Notons qu'il est toutefois possible, lors d'une administration par voie orale, de protéger les peptides des attaques acides et enzymatiques en les encapsulant dans des nanoparticules de moins d'un micron (10^{-6} m) de diamètre qui vont relarguer les peptides dans des régions par deçà l'environnement acide de l'estomac (Brayden, 2003). L'insertion de peptides dans des polymères de sucres comme les microparticules de chitosan ou les gels de zinc et pectine s'avère de même une approche des plus prometteuses de délivrance orale (Brayden, 2003). Certains ont également essayé de coupler les peptides à des groupements chimiques protecteurs, les rendant temporairement pharmacologiquement inactifs jusqu'à activation *in vivo* afin d'exercer leur effet thérapeutique (Albert, 1958; Han et Amidon, 2000).

Néanmoins, l'industrie pharmaceutique s'est intéressée rapidement au problème de conversion des peptides endogènes en molécules de synthèse, dans l'espoir d'ouvrir la voie à la transformation d'une source prolifique de pistes moléculaires (neuropeptides, substrats enzymatiques, interférons, cytokines...) en médicaments potentiels (Rubin-Carrez, sans date). Est ainsi apparu le concept de dérivés peptidomimétiques (Gante, 1994), des mimes pseudo-peptidiques ou non peptidiques de peptides biologiquement actifs, adaptés à l'usage thérapeutique (Guery, 2003). Le passage le plus

direct du peptide au peptidomimétique repose souvent sur l'isostérie des fonctions, ce qui suggère des similitudes d'un point de vue stérique mais aussi électronique afin d'obtenir des interactions physico-chimiques de même type avec une cible donnée. Compte-tenu de la mauvaise biodisponibilité des peptides ainsi que de leur grande instabilité métabolique face aux peptidases, la stratégie classique consiste (i) à atténuer progressivement le caractère peptidique, en substituant par exemple aux liaisons peptidiques classiques des isostères d'amide résistants à l'action de ces peptidases et (ii) à modifier la balance hydrophile/lipophile de ces peptides et augmenter leur coefficient de partition en introduisant des groupements aromatiques/lipophiles et en diminuant le nombre de liaisons-hydrogènes/interactions-hydrophiles potentielles (par méthylation des fonctions amides par exemple). En effet, pour faire pénétrer un composé dans l'environnement lipidique des membranes épithéliales, il faut le soustraire au milieu aqueux de la lumière intestinale et donc le désolvater (Rubin-Carrez, sans date). Par contre, le remplacement d'une fonction par un isostère ne présage pas du caractère agoniste ou antagoniste du nouveau ligand conçu ; il est seulement admis qu'un des moyens de passer d'un agoniste à un antagoniste consiste à limiter la flexibilité conformationnelle du ligand agoniste en réalisant des analogues semi-rigides (Guery, 2003).

Le développement de peptidomimétiques permettrait par ailleurs d'apporter une solution à l'identification d'un motif de liaison non linéaire, comme l'atteste le développement d'inhibiteurs peptidomimétiques de l'interaction ICAM-1/LFA-1, résultant du transfert d'un épitope non linéaire, identifié au niveau du domaine 1 d'ICAM-1 comme étant essentiel pour l'interaction avec LFA-1 et comprenant les résidus Glu34, Lys39, Met64, Tyr66, Asn68 et Gln73 (Fisher *et al.*, 1997; Casasnovas *et al.*, 1998), à une trame moléculaire non peptidique (*small-molecule framework*), supposée surmonter les limitations pharmaceutiques de peptides et en particulier leur délivrance inefficace par voie orale (Gadek *et al.*, 2002). Les antagonistes se lient au LFA-1, inhibent la liaison d'ICAM-1 aux leucocytes aussi bien que la réaction mixte lymphocytaire et exhibent, par comparaison à un anticorps anti-LFA-1, des effets anti-inflammatoires significatifs *in vivo*. La réalisation d'études de relation structure-activité conduisirent au développement de deux molécules plus puissantes (Burdick *et al.*, 2003; Burdick *et al.*, 2004).

La mise au point et l'optimisation d'un peptide ou d'un peptidomimétique passe par (i) la détermination du fragment minimal actif du peptide (c'est à dire la séquence minimale permettant de conserver l'affinité pour la cible), (ii) l'identification des groupements fonctionnels importants de ce fragment minimal actif par l'étude des relations structure-affinité dans une série d'analogues peptidiques où chaque position est substituée par différents acides aminés, naturels ou non, dans le but de déterminer la combinaison de résidus induisant l'activité maximale et (iii) l'introduction de contraintes structurales sous forme d'acides aminés contraints, d'analogues rigides ou de cyclisations qui vont forcer la molécule à adopter préférentiellement la conformation bioactive (les peptides linéaires étant très flexibles, ils peuvent adopter une multitude de conformations en équilibre dynamique en solution dont toutes ne sont pas bioactives (Rubin-Carrez, sans date). L'ensemble des

conformations d'une molécule donnée peut être étudié par des méthodes théoriques telle que la dynamique moléculaire ou par des méthodes expérimentales comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou encore, cerise sur le gâteau, la cristallographie par diffraction des rayons X. En effet, en résolvant la structure du complexe entre le ligand peptidique et sa cible macromoléculaire, on accède non seulement à la conformation bioactive du peptide mais également à la structure tridimensionnelle de la protéine et à l'ensemble des interactions qui s'établissent entre la protéine et son ligand. Pour le modélisateur s'offre alors la possibilité de franchir le pas entre conception indirecte (fondée sur la seule observation des ligands et l'élaboration d'une image fantôme de la cible) et conception directe (fondée sur la connaissance structurale de la cible et de ses sites d'interactions effectifs et potentiels, et sur la quête d'une complémentarité optimale entre les deux partenaires d'interaction).

En combinant le modèle de conformation bioactive aux relations structure-affinité, le chercheur est à même de proposer des hypothèses de pharmacophore résumant la nature (centre chargé, hydrophile ou lipophile...) et l'agencement tridimensionnel des éléments fonctionnels indispensables à la reconnaissance moléculaire du ligand par sa cible protéique. Ce pharmacophore est, par définition, commun à toutes les molécules actives (affines pour la cible) et absent dans les molécules inactives (non affines pour la cible). A cette étape, on améliore éventuellement les modèles de pharmacophore par confrontation avec d'autres séries chimiques décrites dans la littérature (Rubin-Carrez, sans date). Enfin, les efforts dans le domaine de la conception de ligands *de novo* (sans autre point de départ que la structure tridimensionnelle de la cible macromoléculaire) se sont intensifiés ces dernières années, sans toutefois parvenir à atteindre l'objectif, encore mythique, de concevoir des ligands totalement originaux à partir des seules contraintes provenant de l'analyse structurale de la cible (Rubin-Carrez, sans date).

12.2.4. Inhibiteurs allostériques

Deux classes mécanistiques distinctes de petites molécules inhibitrices du LFA-1, dénommées antagonistes allostériques αI et $\alpha/\beta I$ -like, ont récemment été développées. Les premiers se lient en-dessous de l'hélice C-terminale du *I domain* du CD11a, stabilisant celui-ci dans la conformation fermée inactive alors que les antagonistes allostériques $\alpha/\beta I$ -like se lient au site d'adhésion dépendant des ions métalliques (*MIDAS*) du *I-like domain* du CD18 et perturbent de manière conformationnelle la transmission du signal entre celui-ci et le *I domain*, laissant ce dernier dans la forme inactive. Les deux classes d'antagonistes ont donc des effets opposés sur la conformation de l'intégrine ; les antagonistes allostériques αI stabilisent la conformation fermée alors que les antagonistes allostériques $\alpha/\beta I$ -like induisent la conformation étendue avec le *I domain* inactif. Ces petites molécules antagonistes mettent ainsi en lumière l'importance des liaisons structurelles intra- et inter-domaines de l'intégrine pour la transmission de signaux conformationnels et la régulation de la conformation globale (Shimaoka et Springer, 2004).

Il nous semble assez difficile d'obtenir, par cette voie, des résultats spécifiques de la mannheimiose puisqu'une action au niveau de la conformation de l'intégrine aura automatiquement des répercussions sur ses fonctions « physiologiques ».

12.3. Transgénèse

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

12.3.1. *La transgénèse animale*

La transgénèse animale fit ses débuts en 1980 et permet le transfert stable d'une information génétique connue dans un génome donné de manière plus précise que la sélection conventionnelle. Ses applications peuvent être divisées en trois grandes catégories : (i) l'obtention d'informations sur la fonction et la régulation des gènes, que ce soit dans un contexte normal ou pathologique, (ii) l'obtention de produits de haute valeur destinés à la thérapie humaine comme des protéines recombinantes à vocation pharmaceutique et des xéno-organes pour humains et (iii) l'amélioration des produits animaux de consommation (Houdebine, 2005b), tels ces poissons transgéniques de diverses espèces (saumon, truite, tilapia, carpe...) qui contiennent plusieurs copies du gène de l'hormone de croissance et qui présentent une croissance plus rapide (Muir, 2004). Les Nations-Unies recommandent même l'implémentation de l'approche transgénique pour améliorer la santé des pays en voie de développement, bien que cette exhortation ne concerne principalement pour l'instant que les cultures (Acharya *et al.*, 2003).

La lutte contre les pathologies animales apparaît également comme un secteur prioritaire puisque la sélection d'animaux transgéniques plus résistants pourrait théoriquement permettre (i) de réduire l'usage de médicaments dont les antibiotiques, (ii) d'accroître le bien-être animal, (iii) de faciliter le travail de l'éleveur, (iv) de diminuer les coûts via l'amélioration du rendement en élevage et (v) d'amoinrir la fréquence de transmission des maladies de l'animal à l'Homme (Houdebine, 2005b). Ainsi, par exemple, (i) des bovins chez qui les gènes PrP ont été inactivés par recombinaison homologue (Kuroiwa *et al.*, 2004) sont résistants à la propagation du prion *in vitro*, tout en étant à 20 mois, normaux des points de vue clinique, physiologique, histopathologique, immunologique et reproductif (Richt *et al.*, 2007) et (ii) divers animaux secrètent dans leur lait des molécules exhibant des propriétés antibactériennes (Zuelke, 1998; Mitra *et al.*, 2003; Donovan *et al.*, 2005; Wall *et al.*, 2005; Maga *et al.*, 2006) ou antivirales (Castilla *et al.*, 1998a; Castilla *et al.*, 1998b; Sola *et al.*, 1998), supposées protéger à la fois les consommateurs et les glandes mammaires contre les infections (Soler *et al.*, 2006).

Un gain au niveau environnemental peut aussi être obtenu par la transgénèse comme le démontrent des porcs exprimant la phytase d'*Escherichia coli* dans leur salive en excréant 75% de phosphate minéral en moins, conduisant ainsi à une réduction significative de la pollution (Golovan *et al.*, 2001).

12.3.2. Aspects techniques

Du point de vue pratique, la transgénèse doit aussi faire face à différents défis : la sélection du gène à ajouter, substituer ou neutraliser, la construction de vecteurs permettant une expression fiable du transgène, le transfert et l'intégration de celui-ci et enfin, l'interprétation des données. Par ailleurs, le transfert de gènes reste peu efficace dans certaines espèces et peut induire des effets secondaires imprévisibles dus à l'interférence du transgène avec le génome de l'hôte au niveau du site d'insertion ou par l'interaction de l'ARN ou de la protéine correspondante avec les mécanismes cellulaires (Houdebine, 2005b; 2007).

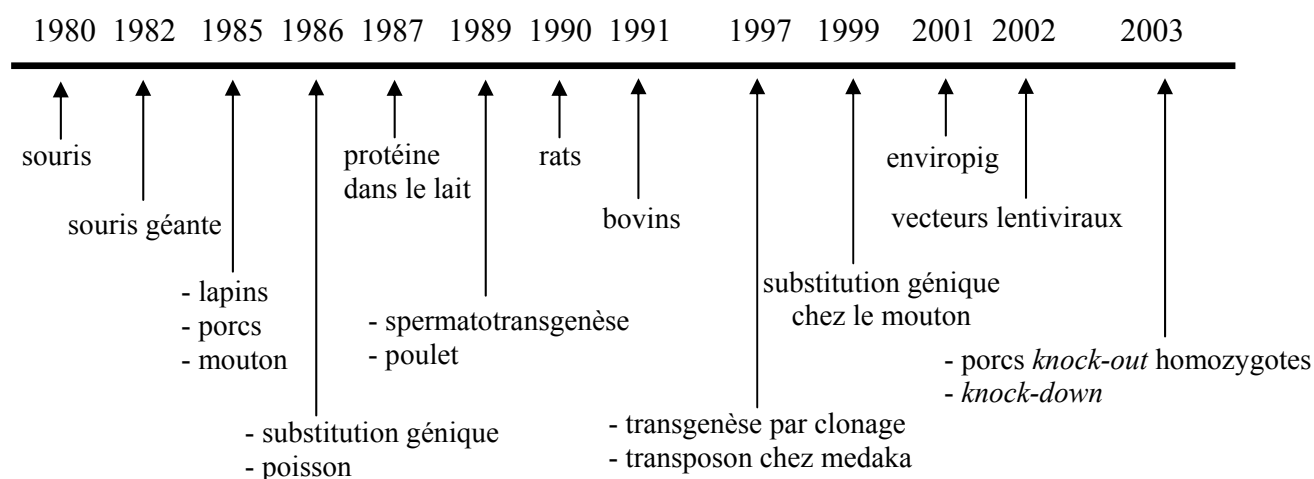


Figure 25 : Les étapes clés de la transgénèse animale (d'après Houdebine, 2005a)

Microinjection

Afin de générer des lignées d'animaux transgéniques arborant le gène étranger dans toutes les cellules, l'ADN d'intérêt doit être présent dans l'embryon dès le stade unicellulaire. La méthode la plus commune consiste à introduire l'ADN linéaire dans le *pronucleus* de l'embryon unicellulaire par microinjection, technique qui a pour la première fois été couronnée de succès en 1980 (figure 25). Actuellement, seulement 1 à 3 % des embryons de souris manipulés deviennent des animaux transgéniques, rendement qui peut être significativement amélioré en utilisant certaines souches comme les FVB/N. De nombreux facteurs comme la réponse des donneuses d'ovules à la superovulation, le taux de fertilisation, la survie de l'œuf après l'injection, l'aptitude des embryons à

s'implanter et se développer jusqu'à terme, la concentration et la pureté de l'ADN injecté, contribuent à l'efficacité de la production d'animaux transgéniques (Auerbach *et al.*, 2003). Pour des raisons inconnues, ce rendement est encore plus faible chez d'autres espèces comme le lapin, le rat, les oiseaux, le porc et les ruminants (Soler *et al.*, 2006) et ce, plus à cause du processus d'intégration que par la microinjection en tant que telle puisque, dans la plupart des cas, l'ADN est intégré dans le génome de l'hôte de manière imprévisible ou tout du moins incontrôlée, sans pour autant être totalement aléatoire puisqu'il semble que les gènes étrangers s'intègrent plus fréquemment dans les régions ouvertes de chromatine, qui sont celles où se trouvent les gènes actifs. Cette intégration peut donc inactiver un gène de l'hôte en interrompant sa région codante ou ses éléments régulateurs (Houdebine, 2005a; 2005b). Il est ainsi admis que 7 à 20 % des souris transgéniques obtenues par microinjection présentent des mutations insertionnelles qui inactivent des gènes de l'hôte (Van Reenen *et al.*, 2001). Néanmoins, la technique a permis de générer des bovins (Krimpenfort *et al.*, 1991), ovins (Wright *et al.*, 1991), caprins (Ebert *et al.*, 1991) et porcs (Velandar *et al.*, 1992) transgéniques à des fins commerciales de production de thérapeutiques humaines à haute valeur ajoutée (Robl *et al.*, 2007), même si le transfert d'ADN dans des cellules somatiques, bien que laborieux, s'avère plus efficace que la microinjection classique pour obtenir des ruminants (Schnieke *et al.*, 1997; Cibelli *et al.*, 1998; McCreath *et al.*, 2000) et des porcs (Dai *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2002) transgéniques.

Spermatotransgénèse

Chez certaines espèces dont les bovins, il est possible d'utiliser la spermatotransgénèse, c'est-à-dire l'incubation du sperme (après dégradation préalable de la membrane des spermatozoïdes) avec des fragments d'ADN d'intérêt aussi longs que 200 kb (Moreira *et al.*, 2004) avant fertilisation par injection intracytoplasmique (*ICSI, intracytoplasmic sperm injection*). Ce transfert de gènes dans les gamètes, bien que difficilement reproductible à cause de la présence de DNase I à la surface des spermatozoïdes (Whitelaw *et al.*, 2004; Houdebine, 2005b), a pu être utilisé efficacement chez le crapaud sud-africain *Xenopus laevis* (Marsh-Armstrong *et al.*, 1999), le rat (Kato *et al.*, 2004), la souris (Moreira *et al.*, 2004), le porc (Lavitrano *et al.*, 2002; Lavitrano *et al.*, 2003; Lavitrano *et al.*, 2006; Manzini *et al.*, 2006) et le lapin (Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003). Le rendement de la spermatotransgénèse a été amélioré par la *LB-SMGT (linker based-sperm mediated gene transfer)*, une technique permettant à l'ADN exogène d'être spécifiquement lié au sperme en utilisant un anticorps monoclonal se liant (i) à la surface des spermatozoïdes de diverses espèces (porcine, murine, galline, bovine, ovine, caprine et humaine) via la reconnaissance d'un antigène spécifique et (ii) à l'ADN grâce à une interaction de type ionique (Chang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). L'ADN étranger peut également être transféré directement dans les spermatides en injectant le complexe ADN-transfectant dans les tubules séminifères, bien que le rendement observé soit plutôt modeste (Celebi *et al.*, 2002). Les spermatides peuvent aussi être récoltés, transfectés *in vitro* (ajout ou substitution de gènes) puis réimplantés dans un testicule receveur (Honaramooz *et al.*, 2003; Whitelaw *et al.*, 2004; Houdebine, 2005b).

Intégration ciblée des transgènes (*targeted gene integration*)

Pour notre application, une intégration ciblée des transgènes serait souhaitable, ce qui est possible par recombinaison homologue chez des cellules souches embryonnaires (ou cellules pluripotentes) (Capecchi, 1989), comme le démontre la génération d'environ 5000 souris *knock-out* différentes (Soler *et al.*, 2006), ou par la méthode de clonage par transfert de noyau, qui consiste à ajouter un gène étranger ou remplacer un gène endogène par recombinaison homologue dans des cellules somatiques fœtales et à utiliser leur noyau pour générer des animaux clonés transgéniques (Houdebine, 2005a ; 2007). Cette dernière possède plusieurs avantages, à savoir (i) un meilleur rendement de transgénèse chez les ruminants, (ii) le fait que les animaux ne sont pas mosaïques pour le transgène et (iii) la possibilité d'étudier l'intégrité du transgène dans les cellules utilisées pour le transfert de gène (Soler *et al.*, 2006). Son usage le plus fréquent consiste en le remplacement d'un gène actif par une version inactive de celui-ci (*knock-out*) ou par un autre gène actif (*knock-in*), permettant l'évaluation de l'activité biologique de différents allèles à leur position « naturelle » du génome ou l'intégration d'un gène étranger à un site donné (Houdebine, 2005b). Le taux de recombinaison homologue est cependant plutôt faible (de 0.1 à 1%) chez les vertébrés et en particulier en ce qui concerne les cellules somatiques, ce qui impose une sélection des cellules dans lesquelles l'intégration ciblée a eu lieu (Houdebine, 2005a ; Houdebine et Renard, 2005 ; Houdebine, 2007).

Conception de vecteurs

Etant donné que les régions géniques transcrites et non transcrites contiennent de nombreux signaux pour la transcription ainsi que pour la maturation, le transfert vers le cytoplasme, la stabilité et la traduction de l'ARN messager, la construction de gène reste empirique et conduit souvent à l'ajout ou la suppression de signaux inconnus, limitant les chances du transgène d'être exprimé efficacement (Houdebine, 2005a; 2005b; Soler *et al.*, 2006). Un certain nombre de règles ont cependant été définies pour tenter d'optimiser l'expression d'un transgène (Houdebine, 2002) : (i) celui-ci doit contenir au moins un intron comportant des signaux favorisant la maturation du pré-ARN messager et le transfert de la forme mature dans le cytoplasme, (ii) il ne doit pas renfermer trop de régions riches en GC et particulièrement de motifs CpG au niveau du promoteur¹, (iii) le transgène doit préférentiellement être intégré en faible nombre de copies, (iv) les codons doivent être adaptés à l'organisme dans lequel le transgène est introduit (ce que permet de manière pas trop onéreuse la synthèse chimique de gènes ou d'ADNs complémentaires) et (v) la région non traduite en 5' (*untranslated region* ou *UTR*) doit contenir aussi peu de structures secondaires que possible. Les premières expériences menées au début des années 80 ont révélé que les transgènes étaient souvent faiblement exprimés et sous le contrôle partiel d'activateurs de l'hôte présents au voisinage des sites d'intégration. Des séquences éloignées, connues sous le nom de *locus control region* (*LCR*) ou

¹ Ces structures sont reconnues comme éléments étrangers par les cellules, probablement au début du développement embryonnaire, et leurs C sont méthylés, inactivant le promoteur de manière ou non irréversible et potentiellement transmissible à la progéniture.

insulateurs, sont ainsi nécessaires pour que les gènes soient exprimés de manière appropriée. Ils contiennent plusieurs sortes d'éléments : (i) de puissants activateurs qui sont souvent cellule-spécifiques, (ii) des bloqueurs d'activateurs qui empêchent les régulateurs d'un *locus* d'interagir avec les gènes d'un *locus* voisin et (iii) des « ouvreurs de chromatine » qui induisent des modifications locales post-traductionnelles des histones, permettant ainsi à la machinerie transcriptionnelle d'atteindre les gènes qui doivent être exprimés (Taboit-Dameron *et al.*, 1999; Houdebine, 2005a; 2005b; Houdebine, 2007).

Les vecteurs rétroviraux, qui furent les premiers utilisés en transgénèse et en thérapie génique humaine (Chan *et al.*, 2001), présentent néanmoins quelques inconvénients comme (i) l'induction de l'extinction du transgène par la machinerie de répression génétique de l'hôte, recrutée par les séquences promotrices et activatrices des *LTRs* (*long terminal repeats*) virales, et l'hyperméthylation subséquente des séquences promotrices virales (Jahner et Jaenisch, 1985), (ii) la limitation de la taille du gène véhiculé à 8-9 kb à cause de la petite taille du virus, (iii) l'interférence des *LTRs* avec les promoteurs mammaliens, entraînant la suppression ou l'inadéquation de l'expression des gènes de l'hôte et (iv) la production d'animaux mosaïques chez qui la transmission du transgène via la lignée germinale est assez faible, à cause du retard d'intégration du transgène induit par la nécessité du virus de rompre l'enveloppe nucléaire durant la mitose (Soler *et al.*, 2006; Robl *et al.*, 2007). Une amélioration significative a pu être obtenue grâce aux vecteurs lentiviraux (Fassler, 2004 ; Pfeifer, 2004), possédant la capacité de traverser la membrane nucléaire et d'atteindre le génome de l'hôte, quelle que soit la phase du cycle cellulaire, incluant donc les cellules embryonnaires et quiescentes, ce qui en fait la méthode la plus efficace de production d'animaux transgéniques. Par ailleurs, l'enveloppe du *Vesicular Somatitis Virus* (*VSV*) peut être ajoutée aux particules lentivirales pour permettre une concentration des virions par ultracentrifugation et par là un haut taux d'infection de théoriquement tous les types cellulaires, l'enveloppe du *VSV* ne reconnaissant pas de récepteurs particuliers mais les phospholipides de membrane (Lois *et al.*, 2002). Cet outil a grandement facilité la génération de souris (Lois *et al.*, 2002), de poulet (McGrew *et al.*, 2004), de bovin (Hofmann *et al.*, 2004 ; Whitelaw, 2004) et de porc (Hofmann *et al.*, 2003; Whitelaw *et al.*, 2004) transgéniques. Chez les animaux de rente, l'efficacité globale de transgénèse est jusqu'à 50 fois plus élevée avec les vecteurs lentiviraux qu'avec la microinjection d'ADN dans le *pronucleus*. Cependant, pour des raisons inconnues, les vecteurs lentiviraux doivent, pour obtenir le meilleur rendement, être injectés dans les embryons chez le porc mais dans les oocytes chez la vache. La taille du gène véhiculé est par ailleurs également limitée à environ 10 kb (Robl *et al.*, 2007).

12.3.3. Inconvénients de la transgénèse

Il résulte de ce qui précède que la transgénèse animale (figure 25) est une technologie qui prend de plus en plus d'importance, grâce notamment (i) aux récentes avancées techniques et (ii) aux découvertes de gènes d'intérêt facilitées par le séquençage des génomes des animaux d'élevage. De

plus, la taille de l'ADN étranger n'est plus un problème puisqu'il est maintenant possible d'insérer des vecteurs microchromosomiques stables porteurs de Mbps d'ADN, contenant un centromère, deux télomères et des origines de réplifications (Kuroiwa *et al.*, 2002).

Néanmoins, au-delà des problèmes éthiques posés (notamment la manipulation des embryons), si la reproduction par clonage supprime certains des problèmes qui accompagnent la reproduction sexuée (notamment en terme de sélection d'animaux « naturellement » plus résistants à certaines pathologies), elle en engendre d'autres (Houdebine et Renard, 2005 ; Houdebine, 2005b; 2007; Robl *et al.*, 2007) : (i) le patrimoine génétique des cellules donneuses de noyau n'est pas strictement connu, (ii) le statut génétique des clones ne l'est pas d'avantage, (iii) la reprogrammation du génome des cellules donneuses de noyau par le cytoplasme de l'ovocyte est fréquemment incomplète, (iv) les animaux obtenus par clonage, bien qu'essentiellement génétiquement identiques à leurs géniteurs, sont souvent épigénétiquement modifiés sans que l'on puisse en prévoir les effets, (v) le clonage peut être, si l'on n'y prend garde, réducteur de biodiversité et accentuer les effets indésirables de la sélection moderne qui repose sur un nombre de plus en plus restreint de géniteurs, (vi) l'introduction d'un gène dans un génome animal peut réactiver un transposon ou un génome rétroviral intégré et induire ainsi une multiplication du transposon ou la production de particules virales infectieuses potentiellement pathogènes et (vii) les effets directs et indirects des transgènes ne peuvent être tous prévisibles (ce qui quelque part fait leur charme pour les généticiens) et il n'est pas exclu que les animaux transgéniques deviennent plus sensibles à certaines maladies, le système immunitaire des clones étant souvent imparfaitement fonctionnel (Ellis, 2004). Par contre, certaines anomalies observées peuvent être abolies par la reproduction sexuée, celle-ci étant capable d'éliminer les gamètes anormaux et de parfaire la reprogrammation des génomes. Ainsi, les télomères anormalement courts chez certains clones retrouvent une longueur normale chez tous les descendants (Shiels et Jardine, 2003). Par ailleurs, le coût des animaux transgéniques de rente reste élevé, du fait que (i) la dissémination des traits d'intérêt porté par un transgène n'est pas aussi simple et rapide que pour les plantes et que (ii) les transgènes doivent être source d'un très haut profit potentiel pour être utilisables.

Des mesures de confinement spécifiques sont ainsi nécessaires pour permettre l'élevage de ces animaux dans des conditions de sécurité élevée et éviter tout risque de dissémination involontaire dans la chaîne alimentaire humaine, l'alimentation du bétail ou l'environnement, même si la transmissibilité à l'Homme de certaines toxines ou la dissémination incontrôlée du transgène semblent moins probables que ce qui est observé chez les végétaux (Houdebine et Renard, 2005). Il faudra toutefois faire preuve de grande prudence, notamment avec les poissons transgéniques qui pourraient coloniser des biotopes comme les océans (Muir, 2004 ; Houdebine, 2005b). De même, des tests permettent d'évaluer la toxicité, l'allergénicité et l'infectiosité des animaux obtenus par clonage ou transgénèse, risques auxquels n'échappent d'ailleurs pas les animaux issus de la sélection classique. Jusqu'à ce jour, la littérature scientifique ne relate aucun effet négatif, que ce soit en termes de composition globale du lait ou de la viande, de digestibilité, de toxicité et d'alimentarité, d'allergénicité, de

mutagénicité ou de présence de particules rétrovirales. On veillera toutefois à éviter que l'ADN étranger ne contienne des séquences qui ne sont pas directement utiles à l'action attendue, comme par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques (Houdebine et Renard, 2005).

13. Conclusion finale

Une des priorités de la recherche dans une discipline comme la pathologie vétérinaire est l'étude des maladies qui touchent les animaux de rente, comme les pneumonies bactériennes qui constituent un problème majeur dans l'élevage et l'engraissement des bovins, avec des répercussions très élevées en termes de morbidité et de mortalité. Plus précisément, 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.

Au cours de ce travail, nous avons mis en place tous les outils nécessaires à l'identification du motif précis du récepteur responsable de cette spécificité d'espèce, à savoir (i) nous avons produit une leucotoxine pure et active, (ii) nous avons cloné et séquencé les sous-unités CD11a et CD18 des ruminants pour les comparer à leurs homologues non ruminants en vue d'identifier les positions systématiques qui les différencient et (iii) nous avons mis en œuvre les premières évaluations des sites de divergence relevés sur le CD18, étant apparu au cours du projet que celui-ci portait la spécificité de l'effet cytotoxique de la LKT. Pour la portion extracellulaire, nous avons tenté d'inhiber l'effet de la leucotoxine sur la lignée lymphoblastique bovine BL-3 par l'ajout de peptides dérivés de cette séquence et, pour les régions transmembranaire et cytoplasmique, nous avons transfecté 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. Nous avons ainsi pu exclure toute implication de ces deux derniers sites.

A court terme, (i) nous évaluerons par transfection transitoire les 15 sites répertoriés dans la région extracellulaire du CD18, (ii) nous testerons des LFA-1 bovins chimériques dont certains domaines spécifiques du CD18 auront été remplacés par leur correspondant humain et (iii) nous vérifierons le maintien de la capacité de margination et de diapédèse du ou des mutants/chimères sélectionnés. A plus long terme, l'identification du motif précis de liaison de la leucotoxine sur le CD18, à supposer que ce motif ne soit pas trop important en nombre de résidus, permettra la mise en œuvre (i) d'un inventaire de la variation génétique spontanée présente dans les races viandeuses Blanc Bleu Belge et internationales au niveau dudit motif et (ii) d'un service de géotypage. Le but au terme du projet sera d'éliminer certains taureaux d'insémination artificielle et/ou de proposer une tactique

d'accouplement préférentielle ou de transgénèse permettant de disséminer le plus rapidement possible un trait de résistance innée à la mannheimiose au sein des populations bovines belge et internationale. Nous pourrions également envisager d'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.

Bref, que du plaisir en perspective...

Quatrième partie

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acharya T., Daar A. S. and Singer P. A. (2003). Biotechnology and the UN's Millennium Development Goals. *Nat Biotechnol* 21 (12): 1434-6.
- Albert A. (1958). Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* 182 (4633): 421-2.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 (3): 403-10.
- Ambagala T. C., Ambagala A. P. and Srikumaran S. (1999). The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to beta(2) integrins on bovine leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 179 (1): 161-7.
- Anderson M. E. and Siahaan T. J. (2003). Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides* 24 (3): 487-501.
- Angen O., Muters R., Caugant D. A., Olsen J. E. and Bisgaard M. (1999). Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49: 67-86.
- Angulo F. J., Nargund V. N. and Chiller T. C. (2004). Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51 (8-9): 374-9.
- Auerbach A. B., Norinsky R., Ho W., Losos K., Guo Q., Chatterjee S. and Joyner A. L. (2003). Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production. *Transgenic Res* 12 (1): 59-69.
- Bajt M.L., Goodman T. and McGuire S.L. (1995). Beta 2 (CD18) mutations abolish ligand recognition by I domain integrins LFA-1 (alpha L beta 2, CD11a/CD18) and MAC-1 (alpha M beta 2, CD11b/CD18). *J Biol Chem* 270 (1): 94-8.
- Barouch F. C., Miyamoto K., Allport J. R., Fujita K., Bursell S. E., Aiello L. P., Lusinskas F. W. and Adamis A. P. (2000). Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (5): 1153-8.
- Berman A. E., Kozlova N. I. and Morozevich G. E. (2003). Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc)* 68 (12): 1284-99.
- Bilsland C. A. and Springer T. A. (1994). Cloning and expression of the chicken CD18 cDNA. *J Leukoc Biol* 55 (4): 501-6.
- Bingham D. P., Moore R. and Richards A. B. (1990). Comparison of DNA:DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella haemolytica* and related species. *Am J Vet Res* 51 (8): 1161-6.
- Bork P., Doerks T., Springer T. A. and Snel B. (1999). Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* 24 (7): 261-3.
- Brayden D. J. (2003). Novel drug delivery strategies in veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal* 56 (6): 310-316.
- Breider M. A., Walker R. D., Hopkins F. M., Schultz T. W. and Bowersock T. L. (1988). Pulmonary lesions induced by *Pasteurella haemolytica* in neutrophil sufficient and neutrophil deficient calves. *Can J Vet Res* 52 (2): 205-9.

Burdick D. J., Marsters J. C., Jr., Aliagas-Martin I., Stanley M., Beresini M., Clark K., McDowell R. S. and Gadek T. R. (2004). N-Benzoyl amino acids as ICAM/LFA-1 inhibitors. Part 2: structure-activity relationship of the benzoyl moiety. *Bioorg Med Chem Lett* 14 (9): 2055-9.

Burdick D. J., Paris K., Weese K., Stanley M., Beresini M., Clark K., McDowell R. S., Marsters J. C. and Gadek T. R. (2003). N-Benzoyl amino acids as LFA-1/ICAM inhibitors 1: amino acid structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem Lett* 13 (6): 1015-8.

Bureau F., Detilleux J., Dorts T., Uystepuyst C., Coghe J., Leroy P. L. and Lekeux P. (2001). Spirometric performance in Belgian Blue calves: I. Effects on economic losses due to the bovine respiratory disease complex. *J Anim Sci* 79 (5): 1301-4.

Capecchi M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244 (4910): 1288-92.

Casasnovas J. M., Stehle T., Liu J. H., Wang J. H. and Springer T. A. (1998). A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (8): 4134-9.

Castilla J., Pintado B., Sola I., Sanchez-Morgado J. M. and Enjuanes L. (1998a). Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk. *Nat Biotechnol* 16 (4): 349-54.

Castilla J., Sola I., Pintado B., Sanchez-Morgado J. M. and Enjuanes L. (1998b). Lactogenic immunity in transgenic mice producing recombinant antibodies neutralizing coronavirus. *Adv Exp Med Biol* 440: 675-86.

Cather J. C. and Menter A. (2003). Modulating T cell responses for the treatment of psoriasis: a focus on efalizumab. *Expert Opin Biol Ther* 3 (2): 361-70.

Celebi C., Auvray P., Benvegny T., Plusquellec D., Jegou B. and Guillaudeux T. (2002). Transient transmission of a transgene in mouse offspring following in vivo transfection of male germ cells. *Mol Reprod Dev* 62 (4): 477-82.

Chan A. W., Chong K. Y., Martinovich C., Simerly C. and Schatten G. (2001). Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 291 (5502): 309-12.

Chang K., Qian J., Jiang M., Liu Y. H., Wu M. C., Chen C. D., Lai C. K., Lo H. L., Hsiao C. T., Brown L., Bolen J., Jr., Huang H. I., Ho P. Y., Shih P. Y., Yao C. W., Lin W. J., Chen C. H., Wu F. Y., Lin Y. J., Xu J. and Wang K. (2002). Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol* 2: 5.

Chatila T. A., Geha R. S. and Arnaout M. A. (1989). Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules. *J Cell Biol* 109 (6): 3435-44.

Chromas [en ligne] (2004) Adresse URL: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>. Consulté le 01/04/04.

Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F. A. and Robl J. M. (1998). Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* 16 (7): 642-6.

Clinkenbeard K. D., Clinkenbeard P. A. and Waurzyniak B. J. (1995). Chaotropic agents cause disaggregation and enhanced activity of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet Microbiol* 45 (2-3): 201-9.

Combet C., Blanchet C., Geourjon C. and Deleage G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 25 (3): 147-50.

- Confer A. W., Panciera R. J., Clinkenbeard K. D. and Mosier D. A. (1990). Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*. *Can J Vet Res* 54 Suppl: S48-52.
- Cox E., Mast J., MacHugh N., Schwenger B. and Goddeeris B. M. (1997). Expression of beta 2 integrins on blood leukocytes of cows with or without bovine leukocyte adhesion deficiency. *Vet Immunol Immunopathol* 58 (3-4): 249-63.
- Dai Y., Vaught T. D., Boone J., Chen S. H., Phelps C. J., Ball S., Monahan J. A., Jobst P. M., McCreath K. J., Lamborn A. E., Cowell-Lucero J. L., Wells K. D., Colman A., Polejaeva I. A. and Ayares D. L. (2002). Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20 (3): 251-5.
- Dassanayake R. P., Shanthalingam S., Davis W. C. and Srikumaran S. (2007). *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of ovine (*Ovis aries*) leukocytes is mediated by CD18, the beta subunit of beta(2)-integrins. *Microb Pathog.* 42 (5-6): 167-73.
- Deshpande M. S., Ambagala T. C., Ambagala A. P., Kehrl M. E., Jr. and Srikumaran S. (2002). Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis. *Infect Immun* 70 (9): 5058-64.
- Dileepan T., Kannan M. S., Walcheck B., Thumbikat P. and Maheswaran S. K. (2005a). Mapping of the binding site for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin within bovine CD18. *Infect Immun* 73 (8): 5233-7.
- Dileepan T., Thumbikat P., Walcheck B., Kannan M. S. and Maheswaran S. K. (2005b). Recombinant expression of bovine LFA-1 and characterization of its role as a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Microb Pathog* 38 (5-6): 249-57.
- Donovan D. M., Kerr D. E. and Wall R. J. (2005). Engineering disease resistant cattle. *Transgenic Res* 14 (5): 563-7.
- Dungworth D. (1992). The respiratory system. *Pathology of domestic animals*. K. Jubb, P. Kennedy and N. Palmer. San Diego, Academic Press: 589-663.
- Dustin M. L. and Springer T. A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341 (6243): 619-24.
- Ebert K. M., Selgrath J. P., DiTullio P., Denman J., Smith T. E., Memon M. A., Schindler J. E., Monastersky G. M., Vitale J. A. and Gordon K. (1991). Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (NY)* 9 (9): 835-8.
- Edwards A. J. (1996). Respiratory diseases of feedlot cattle in the central USA. *Bov Prac* (30): 5-7.
- Ellis S. A. (2004). Immune status: normal expression of MHC class I in the placenta and what is expected in clones. *Cloning Stem Cells* 6 (2): 121-5.
- Fassler R. (2004). Lentiviral transgene vectors. *EMBO Rep* 5 (1): 28-9.
- Fedorova N. D. and Highlander S. K. (1997). Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin. *Infect Immun* 65 (7): 2593-8.
- Ferber D. (2000). Antibiotic resistance. Superbugs on the hoof? *Science* 288 (5467): 792-4.
- Ferech M., Coenen S., Malhotra-Kumar S., Dvorakova K., Hendrickx E., Suetens C. and Goossens H. (2006). European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. *J Antimicrob Chemother* 58 (2): 401-7.

Fett T., Zecchinon L., Baise E. and Desmecht D. (2004). The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA: molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene* 325: 97-101.

Fett T., Zecchinon L., Baise E. and Desmecht D. (2005a). Cloning and characterisation of the primary structure of the sheep lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit. *Mol Immunol* 42 (12): 1503-8.

Fett T., Zecchinon L. L., Baise E. A. and Desmecht D. J. (2005b). Molecular characterisation of the caprine (*Capra hircus*) lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit-encoding cDNA. *BMC Vet Res* 1: 4.

Fisher K. L., Lu J., Riddle L., Kim K. J., Presta L. G. and Bodary S. C. (1997). Identification of the binding site in intercellular adhesion molecule 1 for its receptor, leukocyte function-associated antigen 1. *Mol Biol Cell* 8 (3): 501-15.

Gadek T. R., Burdick D. J., McDowell R. S., Stanley M. S., Marsters J. C., Jr., Paris K. J., Oare D. A., Reynolds M. E., Ladner C., Zioncheck K. A., Lee W. P., Gribbling P., Dennis M. S., Skelton N. J., Tumas D. B., Clark K. R., Keating S. M., Beresini M. H., Tilley J. W., Presta L. G. and Bodary S. C. (2002). Generation of an LFA-1 antagonist by the transfer of the ICAM-1 immunoregulatory epitope to a small molecule. *Science* 295 (5557): 1086-9.

Gahmberg C. G. (1997). Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 9 (5): 643-50.

Gante J. (1994). Peptidomimetics-tailored enzyme inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* 33: 1699-1720.

Gardner B. A., Northcutt S. L., Dolezal H. G., Gill D. R., Ray F. K., Morgan J. B. and Shearhart C. W. (1996). Factors influencing profitability of feedlot steers. *Animal Science Research Report*, Oklahoma Ag Experiment Station, Oklahoma State University, Stillwater, OK: 164-172.

Garnier J., Gibrat J. F. and Robson B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* 266: 540-53.

Gentry M. J. and Srikumaran S. (1991). Neutralizing monoclonal antibodies to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin affinity-purify the toxin from crude culture supernatants. *Microb Pathog* 10 (5): 411-7.

Golovan S. P., Meidinger R. G., Ajakaiye A., Cottrill M., Wiederkehr M. Z., Barney D. J., Plante C., Pollard J. W., Fan M. Z., Hayes M. A., Laursen J., Hjorth J. P., Hacker R. R., Phillips J. P. and Forsberg C. W. (2001). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol* 19 (8): 741-5.

Goodman T. G. and Bajt M. L. (1996). Identifying the putative metal ion-dependent adhesion site in the beta2 (CD18) subunit required for alphaLbeta2 and alphaMbeta2 ligand interactions. *J Biol Chem* 271 (39): 23729-36.

Goossens H., Ferech M., Vander Stichele R. and Elseviers M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 365 (9459): 579-87.

Gopinath R. S., Ambagala T. C., Deshpande M. S., Donis R. O. and Srikumaran S. (2005). *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin binding domain lies within amino acids 1 to 291 of bovine CD18. *Infect Immun* 73 (9): 6179-82.

Gottlieb A. B., Krueger J. G., Wittkowski K., Dedrick R., Walicke P. A. and Garovoy M. (2002). Psoriasis as a model for T-cell-mediated disease: immunobiologic and clinical effects of treatment with multiple doses of efalizumab, an anti-CD11a antibody. *Arch Dermatol* 138 (5): 591-600.

- Griffin D. (1997). Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* (13): 367-377.
- Griffin D., L. B. and L. P. (2000). Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Calf News Magazine, Ltd, Colorado Springs, CO* 138 (8)(12): 19-21.
- Griffin D., Perino L. and Wittum T. (1995). Feedlot respiratory disease: cost, value of preventives and intervention. *Proc Am Assoc Bov Pract* (27): 157-160.
- Guery S. (2003). Conception et synthèse de dérivés de l'arginine: concepts et validation sur des récepteurs de neuropeptides. Chimie organique, pharmacochimie. Strasbourg, Université Louis Pasteur-Strasbourg I.
- Gursoy R. N., Jois D. S. and Siahaan T. J. (1999). Structural recognition of an ICAM-1 peptide by its receptor on the surface of T cells: conformational studies of cyclo (1, 12)-Pen-Pro-Arg-Gly-Gly-Ser-Val-Leu-Val-Thr-Gly-Cys-OH. *J Pept Res* 53 (4): 422-31.
- Gursoy R. N. and Siahaan T. J. (1999). Binding and internalization of an ICAM-1 peptide by the surface receptors of T cells. *J Pept Res* 53 (4): 414-21.
- Han H. K. and Amidon G. L. (2000). Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS PharmSci* 2 (1): E6.
- Henikoff S. and Henikoff J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (22): 10915-9.
- Henikoff S. and Henikoff J. G. (1993). Performance evaluation of amino acid substitution matrices. *Proteins* 17 (1): 49-61.
- Hibbs M. L., Xu H., Stacker S. A. and Springer T. A. (1991). Regulation of adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science* 251 (5001): 1611-3.
- Highlander S. K., Fedorova N. D., Dusek D. M., Panciera R., Alvarez L. E. and Rinehart C. (2000). Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect Immun* 68 (7): 3916-22.
- Hofmann A., Kessler B., Ewerling S., Weppert M., Vogg B., Ludwig H., Stojkovic M., Boelhaue M., Brem G., Wolf E. and Pfeifer A. (2003). Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep* 4 (11): 1054-60.
- Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M., Sebald H., Wenigerkind H., Brem G., Wolf E. and Pfeifer A. (2004). Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod* 71 (2): 405-9.
- Hogg N., Stewart M.P., Scarth S.L., Newton R., Shaw J.M., Law S.K. and Klein N. (1999). A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional beta2 integrins Mac-1 and LFA-1. *J Clin Invest* 103 (1): 97-106.
- Honaramooz A., Behboodi E., Blash S., Megee S. O. and Dobrinski I. (2003). Germ cell transplantation in goats. *Mol Reprod Dev* 64 (4): 422-8.
- Horwell D. C. (1996). Use of the chemical structure of peptides as the starting point to design nonpeptide agonists and antagonists at peptide receptors: examples with cholecystokinin and tachykinins. *Bioorg Med Chem* 4 (10): 1573-6.
- Houdebine L. M. (2002). Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Curr Opin Biotechnol* 13 (6): 625-9.

- Houdebine L. M. (2005a). Relations between animal transgenesis and reproduction. *Reprod Nutr Dev* 45 (3): 363-76.
- Houdebine L. M. (2005b). Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod Domest Anim* 40 (4): 269-81.
- Houdebine L. M. (2007). Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol* 360: 163-202.
- Houdebine L. M. and Renard J. P. (2005). [Confinement and consumption of cloned and transgenic animals]. *Rev Sci Tech* 24 (1): 265-74.
- Huang C., Lu C. and Springer T. A. (1997). Folding of the conserved domain but not of flanking regions in the integrin beta2 subunit requires association with the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (7): 3156-61.
- Huang C. and Springer T. A. (1997). Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (7): 3162-7.
- Huang C., Zang Q., Takagi J. and Springer T. A. (2000). Structural and functional studies with antibodies to the integrin beta 2 subunit. A model for the I-like domain. *J Biol Chem* 275 (28): 21514-24.
- Huang X., Shen W., Li Y., Zhou Z. and Tan J. (1999). Expression of ICAM-1 and LFA-1 molecules in relation to renal allograft rejection in rats. *Chin Med Sci J* 14 (3): 163-6.
- Huth J. R., Olejniczak E. T., Mendoza R., Liang H., Harris E. A., Lupher M. L., Jr., Wilson A. E., Fesik S. W. and Staunton D. E. (2000). NMR and mutagenesis evidence for an I domain allosteric site that regulates lymphocyte function-associated antigen 1 ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (10): 5231-6.
- Hynes R. O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48 (4): 549-54.
- Hynes R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 (1): 11-25.
- Isobe M., Suzuki J., Yamazaki S., Yazaki Y., Horie S., Okubo Y., Maemura K. and Sekiguchi M. (1997). Regulation by differential development of Th1 and Th2 cells in peripheral tolerance to cardiac allograft induced by blocking ICAM-1/LFA-1 adhesion. *Circulation* 96 (7): 2247-53.
- Iwamoto I. and Nakao A. (1995). Induction of Th2 cell tolerance to a soluble antigen by blockade of the LFA-1-dependent pathway prevents allergic inflammation. *Immunol Res* 14 (4): 263-70.
- Jahner D. and Jaenisch R. (1985). Chromosomal position and specific demethylation in enhancer sequences of germ line-transmitted retroviral genomes during mouse development. *Mol Cell Biol* 5 (9): 2212-20.
- Jensen L. J., Gupta R., Blom N., Devos D., Tamames J., Kesmir C., Nielsen H., Staerfeldt H. H., Rapacki K., Workman C., Andersen C. A., Knudsen S., Krogh A., Valencia A. and Brunak S. (2002). Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features. *J Mol Biol* 319 (5): 1257-65.
- Jensen R., Pierson R. E., Braddy P. M., Saari D. A., Lauerman L. H., England J. J., Keyvanfar H., Collier J. R., Horton D. P., McChesney A. E., Benitez A. and Christie R. M. (1976). Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc* 169 (5): 500-6.

- Jeyaseelan S., Hsuan S. L., Kannan M. S., Walcheck B., Wang J. F., Kehrli M. E., Lally E. T., Sieck G. C. and Maheswaran S. K. (2000). Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. *Infect Immun* 68 (1): 72-9.
- Jeyaseelan S., Kannan M. S., Briggs R. E., Thumbikat P. and Maheswaran S. K. (2001). *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects. *Infect Immun* 69 (10): 6131-9.
- Jeyaseelan S., Sreevatsan S. and Maheswaran S. K. (2002). Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim Health Res Rev* 3 (2): 69-82.
- Jois D. S., Pal D., Tibbetts S. A., Chan M. A., Benedict S. H. and Siahaan T. J. (1997). Inhibition of homotypic adhesion of T-cells: secondary structure of an ICAM-1-derived cyclic peptide. *J Pept Res* 49 (6): 517-26.
- Jois S. D., Tibbetts S. A., Chan M. A., Benedict S. H. and Siahaan T. J. (1999). A Ca²⁺ binding cyclic peptide derived from the alpha-subunit of LFA-1: inhibitor of ICAM-1/LFA-1-mediated T-cell adhesion. *J Pept Res* 53 (1): 18-29.
- Jones F. A. (1921). A study of *Bacillus bovisepiticus*. *J Exp Med* 34: 561-577.
- Kaehler K. L., Markham R. J., Muscoplat C. C. and Johnson D. W. (1980). Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. *Infect Immun* 30 (2): 615-6.
- Kato M., Ishikawa A., Kaneko R., Yagi T., Hochi S. and Hirabayashi M. (2004). Production of transgenic rats by ooplasmic injection of spermatogenic cells exposed to exogenous DNA: a preliminary study. *Mol Reprod Dev* 69 (2): 153-8.
- Kaufmann Y., Tseng E. and Springer T. A. (1991). Cloning of the murine lymphocyte function-associated molecule-1 alpha-subunit and its expression in COS cells. *J Immunol* 147 (1): 369-74.
- Kavanaugh A. F., Davis L. S., Jain R. I., Nichols L. A., Norris S. H. and Lipsky P. E. (1996). A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23 (8): 1338-44.
- Kelly A. P., Janzen, E.D. (1986). A review of morbidity and mortality rates and disease occurrence in North American feedlot cattle. *Can Vet J* (27): 496-500.
- Kijas J. M., Bauer T. R., Jr., Gafvert S., Marklund S., Trowald-Wigh G., Johannisson A., Hedhammar A., Binns M., Juneja R. K., Hickstein D. D. and Andersson L. (1999). A missense mutation in the beta-2 integrin gene (ITGB2) causes canine leukocyte adhesion deficiency. *Genomics* 61 (1): 101-7.
- Kim M., Carman C. V. and Springer T. A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 301 (5640): 1720-5.
- Kishimoto T. K., O'Connor K., Lee A., Roberts T. M. and Springer T. A. (1987). Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell* 48 (4): 681-90.
- Kitt T. (1885). *Über eine experimentelle, der Rinderseuche ähnliche Infektionskrankheit*. Sitzungsber Ges Morphol Physiol Muenchen: 140-168.
- Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., van der Schans A., van den Broek S., Kooiman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper F., Strijker R. and et al. (1991). Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Biotechnology (NY)* 9 (9): 844-7.

Kuroiwa Y., Kasinathan P., Choi Y. J., Naeem R., Tomizuka K., Sullivan E. J., Knott J. G., Duteau A., Goldsby R. A., Osborne B. A., Ishida I. and Robl J. M. (2002). Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nat Biotechnol* 20 (9): 889-94.

Kuroiwa Y., Kasinathan P., Matsushita H., Sathiyaselan J., Sullivan E. J., Kakitani M., Tomizuka K., Ishida I. and Robl J. M. (2004). Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat Genet* 36 (7): 775-80.

Lai L., Kolber-Simonds D., Park K. W., Cheong H. T., Greenstein J. L., Im G. S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Hawley R. J. and Prather R. S. (2002). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295 (5557): 1089-92.

Larson R. S., Corbi A. L., Berman L. and Springer T. (1989). Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J Cell Biol* 108 (2): 703-12.

Lavitrano M., Bacci M. L., Forni M., Lazzereschi D., Di Stefano C., Fioretti D., Giancotti P., Marfe G., Pucci L., Renzi L., Wang H., Stoppacciaro A., Stassi G., Sargiacomo M., Sinibaldi P., Turchi V., Giovannoni R., Della Casa G., Seren E. and Rossi G. (2002). Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (22): 14230-5.

Lavitrano M., Busnelli M., Cerrito M. G., Giovannoni R., Manzini S. and Vargiolu A. (2006). Sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev* 18 (1-2): 19-23.

Lavitrano M., Forni M., Bacci M. L., Di Stefano C., Varzi V., Wang H. and Seren E. (2003). Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev* 64 (3): 284-91.

Lee J. K., Schook L. B. and Rutherford M. S. (1996). Molecular cloning and characterization of the porcine CD18 leukocyte adhesion molecule. *Xenotransplantation* 3: 222-230.

Lee J. O., Rieu P., Arnaout M. A. and Liddington R. (1995). Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 80 (4): 631-8.

Lekeux P., Amory H., Desmecht D., Gustin P., Linden A. and Rollin F. (1994). Oxygen transport chain in double-musled blue Belgian cattle. *Br Vet J* 150 (5): 463-71.

Li J., Clinkenbeard K. D. and Ritchey J. W. (1999). Bovine CD18 identified as a species specific receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet Microbiol* 67 (2): 91-7.

Liu W., Brayton K. A., Davis W. C., Mansfield K., Lagerquist J., Foreyt W. and Srikumaran S. (2007). *Mannheimia (pasteurella) haemolytica* leukotoxin utilizes CD18 as its receptor on bighorn sheep leukocytes. *J Wildl Dis* 43(1): 75-81.

Liu W., Brayton K. A., Lagerquist J., Foreyt W. J. and Srikumaran S. (2006). Cloning and comparison of bighorn sheep CD18 with that of domestic sheep, goats, cattle, humans and mice. *Vet Immunol Immunopathol* 110 (1-2): 11-6.

Lois C., Hong E. J., Pease S., Brown E. J. and Baltimore D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295 (5556): 868-72.

Lopez A. (2001). Respiratory system, thoracic cavity and pleura. Thomson's Special Veterinary Pathology. M. McGavin, W. Carlton and J. Zachary. Saint-Louis Missouri, Mosby: 125-196.

- Lu C., Oxvig C. and Springer T. A. (1998). The structure of the beta-propeller domain and C-terminal region of the integrin alphaM subunit. Dependence on beta subunit association and prediction of domains. *J Biol Chem* 273 (24): 15138-47.
- Lum A.F., Green C.E., Lee G.R., Staunton D.E. and Simon S.I. (2002). Dynamic regulation of LFA-1 activation and neutrophil arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow. *J Biol Chem* 277 (23): 20660-70.
- Lupher M. L., Jr., Harris E. A., Beals C. R., Sui L. M., Liddington R. C. and Staunton D. E. (2001). Cellular activation of leukocyte function-associated antigen-1 and its affinity are regulated at the I domain allosteric site. *J Immunol* 167 (3): 1431-9.
- Maga E. A., Cullor J. S., Smith W., Anderson G. B. and Murray J. D. (2006). Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. *Foodborne Pathog Dis* 3 (4): 384-92.
- Manzini S., Vargiolu A., Stehle I. M., Bacci M. L., Cerrito M. G., Giovannoni R., Zannoni A., Bianco M. R., Forni M., Donini P., Papa M., Lipps H. J. and Lavitrano M. (2006). Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (47): 17672-7.
- Marsh-Armstrong N., Huang H., Berry D. L. and Brown D. D. (1999). Germ-line transmission of transgenes in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (25): 14389-93.
- Martin S. W., Meek A.H., Davis J.A., Curtis R.A. (1981). Factors associated with morbidity and mortality in feedlot cattle calves. The Bruce County Beef Project, year two. *Can J Comp Med* (45): 103-112.
- McCreath K. J., Howcroft J., Campbell K. H., Colman A., Schnieke A. E. and Kind A. J. (2000). Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405 (6790): 1066-9.
- McGrew M. J., Sherman A., Ellard F. M., Lillico S. G., Gilhooley H. J., Kingsman A. J., Mitrophanous K. A. and Sang H. (2004). Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 5 (7): 728-33.
- McKerral L. J. and Lo R. Y. (2002). Construction and characterization of an acapsular mutant of *Mannheimia haemolytica* A1. *Infect Immun* 70 (5): 2622-9.
- Mitra A., Hruska K. S., Wellnitz O., Kerr D. E., Capuco A. V. and Wall R. J. (2003). Expression of lysostaphin in milk of transgenic mice affects the growth of neonates. *Transgenic Res* 12 (5): 597-605.
- Molbak K. (2004). Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans-the public health consequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51 (8-9): 364-9.
- Moreira P. N., Giraldo P., Cozar P., Pozueta J., Jimenez A., Montoliu L. and Gutierrez-Adan A. (2004). Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 71 (6): 1943-7.
- Moriyama H., Yokono K., Amano K., Nagata M., Hasegawa Y., Okamoto N., Tsukamoto K., Miki M., Yoneda R., Yagi N., Tominaga Y., Kikutani H., Hioki K., Okumura K., Yagita H. and Kasuga M. (1996). Induction of tolerance in murine autoimmune diabetes by transient blockade of leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 pathway. *J Immunol* 157 (8): 3737-43.
- Muggli-Cockett N. E., Cundiff L. V. and Gregory K. E. (1992). Genetic analysis of bovine respiratory disease in beef calves during the first year of life. *J Anim Sci* 70 (7): 2013-9.
- Muir W. M. (2004). The threats and benefits of GM fish. *EMBO Rep* 5 (7): 654-9.

- Murphy G. L., Whitworth L. C., Clinkenbeard K. D. and Clinkenbeard P. A. (1995). Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 63 (8): 3209-12.
- Netprimer [en ligne] (2004) Adresse URL: <http://www.premierbiosoft.com/netprimer>. Consulté le 12/05/04.
- Newson I. E., Cross, F. (1932). Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep. *J Am Vet Med Assoc* 80: 711-719.
- Nicholas B., Karl B., Nicholas P. and Hugh B. J. [en ligne] (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Adresse URL: <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>. Consulté le 10/04/04.
- Nicolls M. R., Coulombe M., Yang H., Bolwerk A. and Gill R. G. (2000). Anti-LFA-1 therapy induces long-term islet allograft acceptance in the absence of IFN-gamma or IL-4. *J Immunol* 164 (7): 3627-34.
- Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. and von Heijne G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10 (1): 1-6.
- Papp K., Bissonnette R., Krueger J. G., Carey W., Gratton D., Gulliver W. P., Lui H., Lynde C. W., Magee A., Minier D., Ouellet J. P., Patel P., Shapiro J., Shear N. H., Kramer S., Walicke P., Bauer R., Dedrick R. L., Kim S. S., White M. and Garovoy M. R. (2001). The treatment of moderate to severe psoriasis with a new anti-CD11a monoclonal antibody. *J Am Acad Dermatol* 45 (5): 665-74.
- Perino L. J. (1992). Overview of the bovine respiratory disease complex. *Comp Cont Educ Prac Vet* (14): 53-56.
- Pfeifer A. (2004). Lentiviral transgenesis. *Transgenic Res* 13 (6): 513-22.
- Pietrzak A., Podhorecka M., Chodorowska G., Rolinski J. and Urban J. (2003). Efaluzimab in the treatment of psoriasis. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]* 58 (2): 174-8.
- Poggi A., Carosio R., Spaggiari G. M., Fortis C., Tambussi G., Dell'Antonio G., Dal Cin E., Rubartelli A. and Zocchi M. R. (2002). NK cell activation by dendritic cells is dependent on LFA-1-mediated induction of calcium-calmodulin kinase II: inhibition by HIV-1 Tat C-terminal domain. *J Immunol* 168 (1): 95-101.
- Qian Y., Ainsworth A. J. and Noya M. (1999). Identification of a beta 2 (CD18) molecule in a teleost species, *Ictalurus punctatus Rafinesque*. *Dev Comp Immunol* 23 (7-8): 571-83.
- Qu A. and Leahy D. J. (1995). Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, alpha L beta 2) integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (22): 10277-81.
- Qu A. and Leahy D. J. (1996). The role of the divalent cation in the structure of the I domain from the CD11a/CD18 integrin. *Structure* 4 (8): 931-42.
- Richt J. A., Kasinathan P., Hamir A. N., Castilla J., Sathiyaseelan T., Vargas F., Sathiyaseelan J., Wu H., Matsushita H., Koster J., Kato S., Ishida I., Soto C., Robl J. M. and Kuroiwa Y. (2007). Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* 25(1): 132-8.
- Robl J. M., Wang Z., Kasinathan P. and Kuroiwa Y. (2007). Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology* 67 (1): 127-33.
- Roth J. A. (1986). Immunosuppression and immunomodulation in bovine respiratory disease. *Bovine respiratory Disease, A symposium*. L. R.W. Texas A&M University, Texas A&M University Press, College Station: 143-192.

- Rothlein R. and Springer T. A. (1986). The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J Exp Med* 163 (5): 1132-49.
- Rozen S. and Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-86.
- Rubin-Carrez C. [en ligne] (sans date). Des peptidomimétiques peptidiques aux mimétiques non peptidiques : sur la voie du médicament. Adresse URL: <http://ist.inserm.fr/BASIS/elgis/fqmat/atelier/DDD/1235.doc>. Consulté le 17/04/07.
- Salas A., Shimaoka M., Kogan A. N., Harwood C., von Andrian U. H. and Springer T. A. (2004). Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity* 20 (4): 393-406.
- Schnieke A. E., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scott A. R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A. and Campbell K. H. (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278 (5346): 2130-3.
- Schulze-Koops H., Lipsky P. E., Kavanaugh A. F. and Davis L. S. (1995). Elevated Th1- or Th0-like cytokine mRNA in peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis. Modulation by treatment with anti-ICAM-1 correlates with clinical benefit. *J Immunol* 155 (10): 5029-37.
- Shannon J. P., Silva M. V., Brown D. C. and Larson R. S. (2001). Novel cyclic peptide inhibits intercellular adhesion molecule-1-mediated cell aggregation. *J Pept Res* 58 (2): 140-50.
- Shewen P. E. and Wilkie B. N. (1982). Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect Immun* 35 (1): 91-4.
- Shiels P. G. and Jardine A. G. (2003). Dolly, no longer the exception: telomeres and implications for transplantation. *Cloning Stem Cells* 5 (2): 157-60.
- Shimaoka M. and Springer T. A. (2004). Therapeutic antagonists and the conformational regulation of the beta2 integrins. *Curr Top Med Chem* 4 (14): 1485-95.
- Shuster D. E., Bosworth B. T. and Kehrl M. E., Jr. (1992a). Sequence of the bovine CD18-encoding cDNA: comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene* 114 (2): 267-71.
- Shuster D. E., Kehrl M. E., Jr., Ackermann M. R. and Gilbert R. O. (1992b). Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (19): 9225-9.
- Silflow R. M. and Foreyt W. J. (1994). Susceptibility of phagocytes from elk, deer, bighorn sheep, and domestic sheep to *Pasteurella haemolytica* cytotoxins. *J Wildl Dis* 30 (4): 529-35.
- Slocombe R. F., Malark J., Ingersoll R., Derksen F. J. and Robinson N. E. (1985). Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am J Vet Res* 46 (11): 2253-8.
- Smith G. R. (1961). The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions of sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* 81: 431-440.
- Sneath P. H. and Stevens M. (1990). *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 40 (2): 148-53.
- Sola I., Castilla J., Pintado B., Sanchez-Morgado J. M., Whitelaw C. B., Clark A. J. and Enjuanes L. (1998). Transgenic mice secreting coronavirus neutralizing antibodies into the milk. *J Virol* 72 (5): 3762-72.

- Soler E., Thepot D., Rival-Gervier S., Jolivet G. and Houdebine L. M. (2006). Preparation of recombinant proteins in milk to improve human and animal health. *Reprod Nutr Dev* 46 (5): 579-88.
- Speer N. C., Young C. and Roeber D. (2001). The importance of preventing bovine respiratory disease: a beef industry review. *Bov Prac* 35: 189-196.
- Springer T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346 (6283): 425-34.
- Stevens P. K. and Czuprynski C. J. (1996). *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis in vitro. *Infect Immun* 64 (7): 2687-94.
- Sun Y., Clinkenbeard K. D., Cudd L. A., Clarke C. R. and Clinkenbeard P. A. (1999). Correlation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin binding with susceptibility to intoxication of lymphoid cells from various species. *Infect Immun* 67 (12): 6264-9.
- Taboit-Dameron F., Malassagne B., Viglietta C., Puissant C., Leroux-Coyau M., Chereau C., Attal J., Weill B. and Houdebine L. M. (1999). Association of the 5'HS4 sequence of the chicken beta-globin locus control region with human EF1 alpha gene promoter induces ubiquitous and high expression of human CD55 and CD59 cDNAs in transgenic rabbits. *Transgenic Res* 8 (3): 223-35.
- Tatum F. M., Briggs R. E., Sreevatsan S. S., Zehr E. S., Ling Hsuan S., Whiteley L. O., Ames T. R. and Maheswaran S. K. (1998). Construction of an isogenic leukotoxin deletion mutant of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: characterization and virulence. *Microb Pathog* 24 (1): 37-46.
- The NCBI taxonomy browser [en ligne] (sans date). Adresse URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. Consulté le 31/08/04.
- Thumbikat P., Dileepan T., Kannan M. S. and Maheswaran S. K. (2005). Characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin interaction with bovine alveolar macrophage beta2 integrins. *Vet Res* 36 (5-6): 771-786.
- Tibbetts S. A., Chirathaworn C., Nakashima M., Jois D. S., Siahaan T. J., Chan M. A. and Benedict S. H. (1999). Peptides derived from ICAM-1 and LFA-1 modulate T cell adhesion and immune function in a mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 68 (5): 685-92.
- Tibbetts S. A., Seetharama Jois D., Siahaan T. J., Benedict S. H. and Chan M. A. (2000). Linear and cyclic LFA-1 and ICAM-1 peptides inhibit T cell adhesion and function. *Peptides* 21 (8): 1161-7.
- Van Reenen C. G., Meuwissen T. H., Hopster H., Oldenbroek K., Kruip T. H. and Blokhuis H. J. (2001). Transgenesis may affect farm animal welfare: a case for systematic risk assessment. *J Anim Sci* 79 (7): 1763-79.
- Vanden Bergh P. G., Fett T., Zecchinon L. L., Thomas A. V. and Desmecht D. J. (2005). The CD11a partner in *Sus scrofa* lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1): mRNA cloning, structure analysis and comparison with mammalian homologues. *BMC Vet Res* 1: 5.
- Velander W. H., Johnson J. L., Page R. L., Russell C. G., Subramanian A., Wilkins T. D., Gwazdauskas F. C., Pittius C. and Drohan W. N. (1992). High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (24): 12003-7.
- Vitte J., Pierres A., Benoliel A.M. and Bongrand P. (2004). Direct quantification of the modulation of interaction between cell- or surface-bound LFA-1 and ICAM-1. *J Leukoc Biol* 76 (3): 594-602.
- Vogel J. G. and Parrott C. (1994). Mortality survey in feedyards: the incidence of death from digestive, respiratory and other causes in feedyards on the Great plains. *Comp Cont Educ Prac Vet* (16): 227-234.

- Walker R. D., Hopkins F. M., Schultz T. W., McCracken M. D. and Moore R. N. (1985). Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res* 46 (12): 2429-33.
- Wall R. J., Powell A. M., Paape M. J., Kerr D. E., Bannerman D. D., Pursel V. G., Wells K. D., Talbot N. and Hawk H. W. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol* 23 (4): 445-51.
- Wallemacq H., Boutet P., Zecchinon L., Desmecht D., Bedoret D., Ramery E. and Lekeux P. (Accepté pour publication.). Evaluation de l'efficacité du carprofène lors de broncho-pneumonie expérimentale bovine à *Mannheimia haemolytica*. *Rev Med Vet*.
- Wang H. J., Lin A. X. and Chen Y. F. (2003). Association of rabbit sperm cells with exogenous DNA. *Anim Biotechnol* 14 (2): 155-65.
- Wang H. J., Lin A. X., Zhang Z. C. and Chen Y. F. (2001). Expression of porcine growth hormone gene in transgenic rabbits as reported by green fluorescent protein. *Anim Biotechnol* 12 (2): 101-10.
- Wang J. F., Kieba I. R., Korostoff J., Guo T. L., Yamaguchi N., Rozmiarek H., Billings P. C., Shenker B. J. and Lally E. T. (1998). Molecular and biochemical mechanisms of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced cell death. *Microb Pathog* 25 (6): 317-31.
- Waurzyniak B. J., Clinkenbeard K. D., Confer A. W. and Srikumaran S. (1994). Enhancement of *Pasteurella haemolytica* leukotoxic activity by bovine serum albumin. *Am J Vet Res* 55 (9): 1267-74.
- Weitzman J.B., Wells C.E., Wright A.H., Clark P.A. and Law S.K. (1991). The gene organisation of the human beta 2 integrin subunit (CD18). *FEBS Lett* 294 (1-2): 97-103.
- Weiss D. J., Bauer M. C., Whiteley L. O., Maheswaran S. K. and Ames T. R. (1991). Changes in blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. *Am J Vet Res* 52 (2): 337-44.
- Whitelaw C. B. (2004). Transgenic livestock made easy. *Trends Biotechnol* 22 (4): 157-9; discussion 159-60.
- Whitelaw C. B., Radcliffe P. A., Ritchie W. A., Carlisle A., Ellard F. M., Pena R. N., Rowe J., Clark A. J., King T. J. and Mitrophanous K. A. (2004). Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett* 571 (1-3): 233-6.
- Whiteley L. O., Maheswaran S. K., Weiss D. J., Ames T. R. and Kannan M. S. (1992). *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis. *J Vet Intern Med* 6 (1): 11-22.
- Wilson R. W., O'Brien W. E. and Beudet A. L. (1989). Nucleotide sequence of the cDNA from the mouse leukocyte adhesion protein CD18. *Nucleic Acids Res* 17 (13): 5397.
- Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I. and Colman A. (1991). High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)* 9 (9): 830-4.
- Yalamanchili P., Lu C., Oxvig C. and Springer T. A. (2000). Folding and function of I domain-deleted Mac-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* 275 (29): 21877-82.
- Yates W. D. (1982). A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med* 46 (3): 225-63.

Yoo H. S., Rajagopal B. S., Maheswaran S. K. and Ames T. R. (1995). Purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages. *Microb Pathog* 18 (4): 237-52.

Younan M. and Fodor L. (1995). Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res. Vet. Sci.* 58: 98.

Zecchinon L., Fett T., Baise E. and Desmecht D. (2004a). Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*. *Mol Membr Biol* 21 (5): 289-95.

Zecchinon L., Fett T., Baise E. and Desmecht D. (2004b). Molecular cloning and characterisation of the CD18 partner in ovine (*Ovis aries*) beta2-integrins. *Gene* 334: 47-52.

Zecchinon L., Fett T. and Desmecht D. (2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res* 36 (2): 133-156.

Zecchinon L., Fett T., Vanden Bergh P. and Desmecht D. (2006a). Bind another day: The LFA-1/ICAM-1 interaction as therapeutic target. *Clin Applied Immunol Rev* 6: 173-189.

Zecchinon L., Fett T., Vanden Bergh P. and Desmecht D. (2006b). LFA-1 and associated diseases: The dark side of a receptor. *Clin Applied Immunol Rev* 6: 201-216.

Zocchi M. R., Rubartelli A., Morgavi P. and Poggi A. (1998). HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels. *J Immunol* 161(6): 2938-43.

Zuelke K. A. (1998). Transgenic modification of cows milk for value-added processing. *Reprod Fertil Dev* 10(7-8): 671-6.