

# THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

## Résumé

---

- Orientation :** Santé et Productions Animales
- Titre de la thèse en français :** Dissection moléculaire de l'interaction leucotoxine- $\beta$ 2-intégrine LFA-1 (CD11a/CD18), responsable de la spécificité d'espèce de *Mannheimia haemolytica* envers les ruminants
- Titre de la thèse en anglais :** Molecular dissection of the leukotoxin- $\beta$ 2-integrin LFA-1 (CD11a/CD18) interaction, responsible for the *Mannheimia haemolytica* species-specificity towards ruminants
- Candidat :** Laurent ZECCHINON
- Promoteur :** Professeur Daniel DESMECHT
- Département et Service :** Département de morphologie et pathologie, service de pathologie spéciale, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique
- Date de la défense publique :** 6 septembre 2007
- Composition du Jury :** Prof. Joachim FREY, Prof. Freddy COIGNOUL, Prof. Michel GEORGES, Prof. Jean-Marie GODEAU (comité de thèse), Prof. Jacques MAINIL, Prof. Frédéric ROLLIN, Dr. Annick LINDEN (comité de thèse), Dr. Hein IMBERECHTS et Prof. Fabrice BUREAU

### DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Les pneumonies bactériennes constituent un problème majeur dans l'élevage et l'engraissement des bovins, avec des répercussions très élevées en termes de morbidité et de mortalité. Dans ce contexte, les auteurs sont unanimes pour considérer que l'agent pathogène compliquant principal, voire systématique, est *Mannheimia haemolytica*, une bactérie qui n'affecte que les ruminants. Parmi les différents facteurs de virulence incriminables, la culpabilité de la leucotoxine s'impose, notamment parce que, *ex vivo*, elle n'est capable

d'induire la nécrose des leucocytes qu'à la condition *sine qua non* qu'ils soient d'origine bovine, ovine ou caprine. Au niveau moléculaire, cette spécificité est due à une interaction entre la leucotoxine et la  $\beta$ <sub>2</sub>-intégrine LFA-1, un récepteur constitué des sous-unités CD11a et CD18 (Zecchinon *et al.*, 2005).

A court terme, les objectifs du travail étaient (i) de se donner les moyens d'identifier les différences systématiques qui distinguent les sous-unités CD11a et CD18 des ruminants de celles des autres espèces, (ii) de produire une leucotoxine pure et active, (iii) de cibler la sous-unité du

récepteur responsable de la spécificité d'espèce qu'exhibe la leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* envers les leucocytes des ruminants et (iv) d'identifier le motif moléculaire précis de liaison. Etant apparu au cours du travail que la sous-unité portant la spécificité de l'effet cytotoxique était le CD18, nous avons construit et évalué les mutants correspondant à ses portions transmembranaire et cytoplasmique.

A plus long terme, nous espérons (i) disséminer dans la population bovine des animaux intrinsèquement résistants aux pneumonies bactériennes à *Mannheimia haemolytica* soit par

introgression (si nous parvenons à mettre en évidence un allèle correspondant au(x) mutant(s) sélectionné(s)) soit par transgénèse et/ou (ii) élaborer un jeu de peptides compétiteurs du LFA-1 pour la fixation à la leucotoxine, c'est-à-dire inhibiteurs de son activité leucotoxique *in vitro* et inhibiteurs de la virulence de *Mannheimia 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.

## RÉSULTATS

Dans un premier temps, nous avons cloné, séquencé et caractérisé les CD11a bovin (Fett *et al.*, 2004), ovin (Fett *et al.*, 2005a) et caprin (Fett *et al.*, 2005b), de même que les CD18 ovin (Zecchinon *et al.*, 2004a) et caprin (Zecchinon *et al.*, 2004b), ce qui nous a ensuite permis de les contraster entre eux et à certains de leurs homologues non ruminants, pour finalement mettre en évidence respectivement 58 et 17 sites de mutation potentiellement responsables de la virulence spécifique de *M. haemolytica* envers les ruminants.

Nous avons également mis au point un protocole de purification de la leuco-

toxine et vérifié la spécificité de son activité cytolytique *in vitro* via la réalisation de tests de cytotoxicité et de viabilité cellulaire sur diverses lignées réputées sensibles ou insensibles.

Nous avons enfin construit les mutants correspondants aux portions transmembranaire et cytoplasmique du CD18 bovin avant de procéder à leur évaluation en transfectant de manière transitoire la lignée lymphoblastique d'origine humaine K-562, n'exprimant naturellement aucune  $\beta_2$ -intégrine.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons pu mettre en place tous les « outils » indispensables à la réalisation de notre objectif, à savoir se donner les moyens de renoncer à injecter systématiquement des antibiotiques, anti-inflammatoires et bronchodilatateurs en (i) identifiant le motif moléculaire précis responsable de la spécificité d'espèce qu'exhibe *Mannheimia haemolytica* vis-à-vis des ruminants et (ii) en mettant en œuvre la stratégie qui s'avèrera la mieux adaptée (dissemination dans la population bovine d'animaux intrinsèquement résistants soit par introgression soit par transgénèse et/ou développement d'un peptide thérapeutique injectable à substituer aux traitements antibiotiques).

Nous avons ainsi (i) mis au point une procédure de production et purifica-

tion de la leucotoxine, (ii) cloné et séquencé les CD11a bovin, ovin et caprin, de même que les CD18 ovin et caprin, (iii) contrasté ceux-ci avec certains de leurs homologues non ruminants pour mettre en exergue les sites de divergence potentiellement responsables de la spécificité d'espèce de *Mannheimia haemolytica* envers les ruminants, (iv) construit 3 des 18 mutants du CD18 bovin (puisque'il est apparu au cours du projet que ce dernier était responsable de la spécificité de la cytotoxicité de la leucotoxine) et (v) mis en œuvre des expérimentations de transfection transitoire avec tests de toxicité pour aboutir à la conclusion que les sites de divergence décrits dans les portions transmembranaire et cytoplasmique du CD18 n'étaient en rien responsables de la spécificité d'espèce qu'exhibe *Mannheimia haemolytica* vis-à-vis des ruminants.

Les perspectives à court terme sont (i) l'évaluation des 15 sites répertoriés dans la région extracellulaire du CD18, (ii) le testage de LFA-1 bovins chimériques dont certains domaines spécifiques du CD18 auront été remplacés par leur correspondant humain et (iii) la vérification du maintien de la capacité marginatoire du ou des mutants/chimères sélectionnés.

## REFERENCES

- FETT T., ZECCHINON L., BAISE E., DESMECHT D. The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA : molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene*, 2004, **325**, 97-101.
- FETT T., ZECCHINON L., BAISE E., DESMECHT D. Cloning and characterisation of the primary structure of the sheep lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit. *Mol. Immunol.*, 2005a, **42**, 1503-1508.
- FETT T., ZECCHINON L., BAISE E., DESMECHT D. Molecular characterisation of the caprine (*Capra hircus*) lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit-encoding cDNA. *BMC Vet. Res.*, 2005b, **1**, 4.

- ZECCHINON L., FETT T., BAISE E., DESMECHT D. Molecular cloning and characterisation of the CD18 partner in ovine (*Ovis aries*)  $\beta_2$ -integrins. *Gene*, 2004a, **334**, 47-52.
- ZECCHINON L., FETT T., BAISE E., DESMECHT D. Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*. *Mol. Membr. Biol.*, 2004b, **21**, 289-295.
- ZECCHINON L., FETT T., DESMECHT D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet. Res.*, 2005, **36**, 133-156.
- PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE**
- FETT T., ZECCHINON L., BAISE E., DESMECHT D. The bovine (*Bos taurus*) CD11a-encoding cDNA : molecular cloning, characterisation and comparison with the human and murine glycoproteins. *Gene*, 2004, **325**, 97-101.
- FETT T., ZECCHINON L., BAISE E., DESMECHT D. Cloning and characterisation of the primary structure of the sheep lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit. *Mol. Immunol.*, 2005a, **42**, 1503-1508.
- FETT T., ZECCHINON L., BAISE E., DESMECHT D. Molecular characterisation of the caprine (*Capra hircus*) lymphocyte function-associated antigen-1 alpha subunit-encoding cDNA. *BMC Vet. Res.*, 2005b, **1**.
- ZECCHINON L., FETT T., BAISE E., DESMECHT D. Molecular cloning and characterisation of the CD18 partner in ovine (*Ovis aries*)  $\beta_2$ -integrins. *Gene*, 2004a, **334**, 47-52.
- ZECCHINON L., FETT T., BAISE E., DESMECHT D. Characterization of the caprine (*Capra hircus*) beta-2 integrin CD18-encoding cDNA and identification of mutations potentially responsible for the ruminant-specific virulence of *Mannheimia haemolytica*. *Mol. Membr. Biol.*, 2004b, **21**, 289-295.
- ZECCHINON L., FETT T., DESMECHT D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet. Res.*, 2005, **36**, 133-156.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. Anatomy of Lymphocyte Function-associated Antigen-1. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 2006a, **6**, 149-172.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. Bind another day: the LFA-1/ICAM-1 interaction as therapeutic target. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 2006b, **6**, 173-189.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. Key roles of LFA-1 in leukocyte migration and immune response. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 2006c, **6**, 191-200.
- ZECCHINON L., FETT T., VANDEN BERGH P., DESMECHT D. LFA-1 and associated diseases: the dark side of a receptor. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 2006d, **6**, 201-216.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le Service public fédéral de Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement, Grant S-6107.