

Université de Montréal

Caractérisation de deux récepteurs du fer d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (FhuA et HgbA) ainsi que leur utilisation dans un vaccin sous-unitaire

par

Lara Shakarji

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

Juin, 2005

©Lara Shakarji, 2005



SF

607

U54

2005

V.026

Direction des bibliothèques

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Caractérisation de deux récepteurs du fer d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (FhuA et HgbA) ainsi que leur utilisation dans un vaccin sous-unitaire

présenté par  
Lara Shakarji

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marcelo Gottschalk  
président-rapporteur

Mario Jacques  
directeur de recherche

Khyali Ram Mittal  
membre du jury

## Résumé

*Actinobacillus pleuropneumoniae*, une bactérie à Gram négatif, est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une maladie très contagieuse et qui cause d'importantes pertes économiques. Afin d'acquérir le fer indispensable à sa croissance *A. pleuropneumoniae* possède, au niveau de sa membrane externe, de nombreux récepteurs pour le fer. Dans nos laboratoires nous avons identifié et cloné deux gènes d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 codant pour des récepteurs : FhuA (le récepteur du ferrichrome) et HgbA (le récepteur de l'hémoglobine).

Dans ce mémoire nous avons voulu approfondir la caractérisation de FhuA et HgbA. Des analyses PCR ainsi que des séquençages d'ADN ont permis de rechercher la présence de *fhuA* et de *hgbA* chez les 15 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ainsi que chez 13 souches de champ. L'utilisation de deux mutants isogéniques, de *fhuA* (DG02) et *hgbA* ( $\Delta hgbA$ ), a permis de déterminer la spécificité de substrat des récepteurs du fer FhuA et HgbA ainsi que leur rôle dans la virulence. L'utilisation par *A. pleuropneumoniae* et par les mutants isogéniques de nombreuses sources de fer ainsi que de sidérophores a été évaluée par un test de promotion. Pour finir, la virulence des deux mutants a été évaluée par des infections expérimentales chez des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés. Nos résultats ont démontré que FhuA ainsi que HgbA sont conservés chez tous les sérotypes et biotypes d'*A. pleuropneumoniae* et qu'ils semblent être spécifiques de leur substrats respectifs : le ferrichrome et l'hémoglobine. De plus, il semble que le récepteur pour l'hémoglobine porcine, HgbA, jouerait un rôle dans la virulence

Etant donné que FhuA et HgbA sont exprimés *in vivo* et conservés parmi les 15 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* nous avons voulu évaluer leur effet protecteur. Les vaccins ont été préparés avec FhuA et/ou HgbA et différents adjuvants, en présence ou en absence de LPS et en présence ou en absence d'un immunomodulateur. Des porcelets exempts de microorganismes pathogènes ont été immunisés à l'âge de 4, 6 et 8 semaines par les différentes formulations vaccinales administrées par différentes voies d'immunisation (intranasale, intradermique ou intramusculaire). La réponse immunitaire chez les porcelets vaccinés a été évaluée par ELISA sur les IgG et les IgA sériques. À 10 semaines, les porcelets furent

infectés expérimentalement par une souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Nos résultats ont indiqué que la meilleure voie d'immunisation est la voie intramusculaire et que les protéines recombinantes, FhuA et HgbA, sont immunigènes et induisent une protection contre *A. pleuropneumoniae* sérotype 1.

Étant donné que FhuA et HgbA sont présents chez tous les sérotypes d' *A. pleuropneumoniae* et qu'ils sont capables d'induire une protection chez les porcelets, ils représentent d'excellents candidats pour un vaccin sous-unitaire contre la pleuropneumonie porcine.

**Mots clés :** *A. pleuropneumoniae*, acquisition du fer, récepteurs de la membrane externe, spécificité de substrat, virulence, formulations vaccinales, protection.

## Abstract

*Actinobacillus pleuropneumoniae*, a Gram negative bacterium, is the etiologic agent of porcine pleuropneumonia, a highly contagious disease which causes important economic losses. To uptake iron, an essential nutrient, *A. pleuropneumoniae* synthesizes many outer membrane receptors. In our laboratories we identified and cloned two genes from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 coding for receptors: FhuA (the receptor for ferrichrome) and HgbA (the receptor for hemoglobin).

In this thesis we aimed to complete the characterization of FhuA and HgbA. PCR and DNA sequencing were used to look for the presence of *fhuA* and *hgbA* in the 15 serotypes of *A. pleuropneumoniae* and in 13 field strains. Two isogenic mutants, of *fhuA* (DG02) and *hgbA* ( $\Delta hgbA$ ), were used to determine the substrate specificity of the iron receptors FhuA and HgbA as well as to study their role in the virulence of *A. pleuropneumoniae*. The ability of *A. pleuropneumoniae* and the isogenic mutants to use various sources of iron and siderophores was tested in a growth promotion assay. Finally the virulence of the two mutant strains was evaluated in experimental infections using specific pathogen free piglets. Our data indicate that both FhuA and HgbA are conserved among all serotypes and biotypes of *A. pleuropneumoniae*, that they are specific for their individual substrates (ferrichrome and hemoglobin) and that HgbA, the receptor for porcine hemoglobin may play a role in virulence.

Since FhuA and HgbA are expressed in vivo and are well conserved among the 15 serotypes of *A. pleuropneumoniae* we decided to evaluate the protection they induce in pigs. Vaccines were prepared with FhuA and/or HgbA and different adjuvants, with or without LPS and with or without an immunomodulator. Specific pathogen free piglets were immunised at 4, 6 and 8 weeks of age with the different vaccine formulations by different immunisation routes (intranasal, intradermal or intramuscular). The immune response of vaccinated animals was evaluated by ELISA for antigen-specific IgG and IgA in sera. Piglets were challenged with a virulent strain of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 at 10 weeks of age. Results showed that intramuscular immunisation gave the best response and that the recombinant proteins,

FhuA and HgbA, are immunogenic and confer protection against *A. pleuropneumoniae* serotype 1.

Given that FhuA and HgbA are conserved among the 15 sérotypes of *A. pleuropneumoniae* and that they are able to induce protection in piglets, they might be good candidates for a subunit vaccine against porcine pleuropneumonia.

**Key words:** *A. pleuropneumoniae*, iron uptake, outer membrane receptors, substrate specificity, virulence, vaccine formulations, protection

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xvi
Remerciements.....	xvii
Introduction.....	1
Recension de la littérature.....	4
1. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	5
1.1. Généralités.....	5
1.2. La pleuropneumonie porcine.....	6
1.2.1. Généralités.....	6
1.2.2. Diagnostiques, traitements et prévention.....	7
1.3. Les facteurs de virulence.....	9
1.3.1. La capsule polysaccharidique.....	10
1.3.2. Les lipopolysaccharides (LPS).....	11
1.3.3. Les exotoxines.....	14
1.3.4. Les protéines de la membrane externe (OMP).....	16
1.3.5. Autres facteurs de virulence.....	17
1.3.5.1. Les fimbriae.....	17
1.3.5.2. Les uréases.....	17
1.3.5.3. Les protéases.....	18
1.3.5.4. Les superoxydes dismutases (SOD).....	18
1.3.6. Nouvelles techniques d'identification des facteurs de virulence.....	19
1.3.6.1. IVET.....	19
1.3.6.2. STM.....	20
1.3.6.3. SCOTS.....	21

2. Le fer .....	22
2.1. Généralités.....	22
2.2. Entrée du fer dans la cellule.....	23
2.2.1. Le complexe TonB-ExbB-ExbD.....	23
2.2.2. Transport à travers le périplasme et la membrane cytoplasmique .....	24
2.3. Utilisation du fer par les microorganismes.....	25
2.3.1. Les sidérophores.....	25
2.3.1.1. Généralités.....	25
2.3.1.2. Récepteurs et transport des sidérophores .....	25
2.3.1.3. Libération du fer du complexe Fe <sup>3+</sup> - sidérophore.....	27
2.3.2. Les récepteurs de la transferrine.....	28
2.3.2.1. Généralités.....	28
2.3.2.2. Récepteurs de la transferrine et mécanismes d'acquisition.....	29
2.3.3. Les récepteurs de l'hème et les hémophores.....	30
2.3.3.1. Généralités.....	30
2.3.3.2. Récepteurs de l'hème et mécanismes d'acquisition.....	31
2.3.3.3. Les hémophores.....	32
2.4. Contrôle de l'expression des gènes par le fer.....	33
2.4.1. Généralités.....	33
2.4.2. Modes d'actions de Fur et la boîte Fur.....	34
2.4.3. Le régulation du gène <i>fur</i> .....	36
2.4.4. Fur chez les autres bactéries.....	36
2.4.5. DtxR.....	37
3. Acquisition du fer par <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	38
3.1. Le complexe TonB-ExbB-ExbD d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	39
3.2. Les récepteurs de la transferrine.....	40
3.3. Les sidérophores et le système Fhu.....	41
3.3.1. Les sidérophores.....	41
3.3.2. FhuA d' <i>E. coli</i> .....	42
3.3.3. Le système <i>fhu</i> d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	44

3.3.3.1. L'opéron <i>fhu</i> d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	44
3.3.3.2. La structure de FhuA d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	45
3.3.3.3. Caractérisation de FhuA d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	46
3.4. Le récepteur de l'hémoglobine : HgbA.....	48
3.4.1. Généralités.....	48
3.4.2. Mise en évidence d'un récepteur pour l'hémoglobine chez <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	48
3.4.3. Le récepteur de l'hémoglobine d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	49
 Chapitre 1 : FhuA and HgbA, outer membrane proteins of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> : role as virulence determinants.....	52
Abstract et résumé.....	54
Article.....	56
References.....	63
 Chapitre 2 : Utilisation de deux récepteurs du fer d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , FhuA et HgbA, comme antigènes dans un vaccin sous-unitaire contre la pleuropneumonie porcine.....	70
Introduction.....	71
Matériel et méthodes.....	72
Souches bactériennes, plasmides et condition de croissance.....	72
Expression et purification des protéines recombinantes.....	72
Extraction des LPS d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	73
Immunisations et infections expérimentales.....	73
Méthodes immunologiques.....	74
Microscopie électronique à transmission.....	75
Résultats.....	75
Expérience I.....	75
Expérience II.....	77
Microscopie électronique à transmission.....	79
Discussion et conclusion.....	79
Discussion générale des résultats.....	92
Conclusions.....	99
Bibliographie.....	101

# Liste des tableaux

## Chapitre 1

<b>Table 1</b>	Strains and plasmid used in this study.....	66
<b>Table 2</b>	Use of different iron sources and siderophores by <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 reference strain S4074, <i>fhuA</i> mutant DG02 and <i>hgbA</i> mutant $\Delta hgbA$ .....	67
<b>Table 3</b>	Virulence in pigs of <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1, <i>fhuA</i> mutant DG02 and <i>hgbA</i> mutant $\Delta hgbA$ .....	68

## Chapitre 2

<b>Tableau I</b>	Formulations vaccinales de l'expérience I.....	82
<b>Tableau II</b>	Formulations vaccinales de l'expérience II.....	82

## Liste des figures

### Recension de la littérature

<b>Figure 1</b>	Lésions pulmonaires caractéristiques d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	6
<b>Figure 2</b>	Ensemencement croisé d' <i>A. pleuropneumoniae</i> avec un <i>Staphylococcus</i> $\beta$ -hémolytique.....	7
<b>Figure 3</b>	Image par microscopie électronique à transmission (a) d'une souche capsulée d' <i>A. pleuropneumoniae</i> sérotype 1 et (b) d'un mutant non capsulé.....	10
<b>Figure 4</b>	Structure générale des LPS.....	11
<b>Figure 5</b>	Représentation schématique des fonctions des produits Apx.....	15
<b>Figure 6</b>	Image par microscopie électronique de fimbriae purifiés, colorés négativement, d'une souche d' <i>A. pleuropneumoniae</i> sérotype 1.....	17
<b>Figure 7</b>	Schéma de la translocation, dépendante de TonB, d'un complexe ferrique à travers la membrane externe.....	23
<b>Figure 8</b>	Systèmes d'acquisition des sidérophores par <i>E. coli</i> .....	26
<b>Figure 9</b>	Représentation schématique de l'acquisition du complexe $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore.....	27
<b>Figure 10</b>	Schéma de l'acquisition de la transferrine par une bactérie à Gram négatif.....	29
<b>Figure 11</b>	(A) Structure de l'hème et (B) Structure tridimensionnelle de l'hémoglobine.....	31
<b>Figure 12</b>	Schéma de l'acquisition de l'hème par des hémophores chez <i>Serratia marcescens</i> .....	32
<b>Figure 13</b>	Schéma de la répression des gènes par Fur.....	34
<b>Figure 14</b>	Schéma des différents systèmes d'acquisition du fer d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	38
<b>Figure 15</b>	Structure du ferrichrome.....	42
<b>Figure 16</b>	Schéma de l'acquisition du ferrichrome par <i>E. coli</i> .....	43

<b>Figure 17</b>	Structure bidimensionnelle du récepteur FhuA d' <i>E. coli</i> .....	44
<b>Figure 18</b>	Carte de l'opéron <i>fhu</i> de la souche de référence d' <i>A. pleuropneumoniae</i> sérotype1 4074.....	45
<b>Figure 19</b>	Structure bidimensionnelle (A) et tridimensionnelle (B) du récepteur FhuA d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	46
<b>Figure 20</b>	Structure tridimensionnelle du récepteur HgbA d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	50

## Chapitre 1

<b>Figure 1</b>	Dendrogram analysis showing sequence relatedness of <i>fhuA</i> from reference strains representing <i>A. pleuropneumoniae</i> serotypes 1 to 15.....	69
-----------------	---	----

## Chapitre 2

<b>Figure 1</b>	Processus de compléxation Antigène-Proteosome <sup>TM</sup> .....	83
<b>Figure 2</b>	Réponse sérique en ng/ml des IgG anti-FhuA chez les porcelets immunisés par les formulations 1, 2, 3, 7 et 8.....	84
<b>Figure 3</b>	Réponse sérique en ng/ml des IgA anti-FhuA chez les porcelets immunisés par les formulations 1, 2 et 3.....	84
<b>Figure 4</b>	Réponse sérique en ng/ml des IgG anti-HgbA chez les porcelets immunisés par les formulations 4 à 8.....	85
<b>Figure 5</b>	Réponse sérique en ng/ml des IgA anti-HgbA chez les porcelets immunisés par les formulations 4, 5 et 6.....	85
<b>Figure 6</b>	Signes cliniques observés après 24 heures chez les porcelets immunisés par les formulations 2, 5, 7 et 8 infectés expérimentalement avec la souche virulente d' <i>A. pleuropneumoniae</i> AP37.....	86

<b>Figure 7</b>	Lésions pulmonaires observées chez les porcelets immunisés par les formulations 2, 5, 7 et 8 infectés expérimentalement avec la souche virulente d' <i>A. pleuropneumoniae</i> AP37.....	86
<b>Figure 8</b>	Survie des porcelets immunisés par les formulations 2, 5, 7 et 8 infectés expérimentalement avec la souche virulente d' <i>A. pleuropneumoniae</i> AP37.....	87
<b>Figure 9</b>	Réponse sérique en ng/ml des IgG anti-FhuA et anti-HgbA chez les porcelets immunisés par les formulations 9 à 16.....	88
<b>Figure 10</b>	Réponse sérique en ng/ml des IgA anti-FhuA et anti-HgbA chez les porcelets immunisés par les formulations 9 à 16 .....	88
<b>Figure 11</b>	Signes cliniques observés après 24 heures chez les porcelets immunisés par les formulations 9 à 16 infectés expérimentalement avec la souche virulente d' <i>A. pleuropneumoniae</i> AP37.....	89
<b>Figure 12</b>	Survie des porcelets immunisés par les formulations 9 à 16 infectés expérimentalement avec la souche virulente d' <i>A. pleuropneumoniae</i> AP37 (A) jour 39 et (B) jour 46.....	90
<b>Figure 13</b>	Photo de microscopie électronique à transmission des vésicules présentes dans la formulation vaccinale FhuA- Proteosomes <sup>TM</sup> 1:4 (groupe 2).	91
<b>Figure 14</b>	Photo de microscopie électronique à transmission des vésicules présentes dans la formulation vaccinale HgbA- Proteosomes <sup>TM</sup> 1:4 (groupe 5).	91

## Liste des sigles et des abréviations

ADN	Acides DésoxyriboNucléiques
ADNc	Acides DésoxyriboNucléiques complémentaire
ADNr	Acides DésoxyriboNucléiques ribosomal
Afu	<i>Actinobacillus ferrous uptake</i>
ARN	Acides RiboNucléiques
<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Apx	<i>A. pleuropneumoniae</i> RTX toxins
ATP	Adénosine TriPhosphate
BHI	Brain Heart Infusion
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DtxR	Diphtheria toxin Repressor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDDHA	Ethylenediamine dihydroxyphenyl acetic acid
Fec	Ferric citrate receptor
Fep	Ferric enterochelin
Fhu	Ferric hydroxamate uptake
Fpb	Ferric-binding protein
Fur	Ferric uptake régulation
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
Has	Heme acquisition system
HgbA	Hemoglobin binding protein A
Ig	Immunoglobuline
IPTG	IsoPropyl ThioGalactoside

IVET	<i>In Vivo</i> Expression Technology
K <sub>aff</sub>	Constante d'affinité
Kdo	acide 3-Désoxy-D-manno-octulosonique
LB	Luria-Bertani
LPS	LipoPolySaccharides
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NTA	Nitrilotriacetic acid
OmlA	Outer membrane lipoprotein A
OMP	Outer Membrane Protein
ORF	Open Reading Frames
PalA	Peptidoglycan-associated lipoprotein A
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffer Saline
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RTX	Repeat in Toxins
SCOTS	Selective Capture of Transcribed Sequences
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
SOD	SuperOxide Dismutase
SPF	Specific Pathogen Free
STM	Signature Tagged Mutagenesis
Tbp	Transferrin-binding protein
TMB	3,3',5,5'-TetraMethylBenzidine
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolylb-D-galactoside

À maman, papa et Touti  
À Topi

## Remerciements

Ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour sans la contribution de nombreuses personnes que je tiens à remercier de tout mon cœur.

En premier, je tiens à remercier ma famille sans qui je n'aurais jamais réussi à être qui je suis. Merci papa et maman de m'avoir toujours soutenue et surtout d'avoir eu confiance en moi. Merci Touti d'avoir été là pour moi et de t'être aussi bien occupé de moi.

Je tiens également à remercier mon directeur de recherche, Dr Jacques, pour m'avoir donné la chance d'accomplir mon rêve, pour ses précieux conseils et pour m'avoir tant appris sur le monde de la recherche.

Merci Topi d'avoir compris mon choix de partir si loin, de m'avoir donné tout ton soutien et ton aide.

J'aimerais également remercier tous les membres du GREMIP. Merci de m'avoir aussi bien intégré, de m'avoir fait découvrir vos merveilleux pays et leur culture et n'oublions pas tous vos judicieux conseils.

# INTRODUCTION

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est une bactérie à Gram négatif qui fait partie de la famille des *Pasteurellaceae*. Elle est très spécifique de son hôte, le porc, chez qui elle cause la pleuropneumonie, une maladie très contagieuse qui engendre de grandes pertes économiques au niveau mondial. Il existe 15 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*, eux même divisés en 2 biotypes en fonction de leurs besoins en nicotinamide adénine dinucléotide (NAD ou Facteur V).

Une infection par *A. pleuropneumoniae* est un processus multifactoriel avec de nombreux facteurs de virulence jouant un rôle clé dans la pathogenèse. On peut citer comme facteurs de virulence: la capsule polysaccharidique, les lipopolysaccharides (LPS), les toxines APX et des protéines de la membrane externe.

Actuellement la plupart des vaccins sur le marché sont des bactérines, des cellules entières inactivées chimiquement. Les bactérines vont réduire la mortalité mais ne peuvent pas prévenir les infections. De plus, elles ne confèrent généralement pas de protection contre les sérotypes hétérologues et de nombreux problèmes d'innocuité ont été rapportés. Ainsi un vaccin sûr, efficace et offrant une protection croisée contre tous les sérotypes serait utile.

Le fer est un ion indispensable à la croissance de presque toutes les formes de vie. Dans un milieu aqueux et aérobie la concentration en fer sous sa forme libre soluble est limitée à  $10^{-17}$  M; une valeur nettement inférieure au  $10^{-8}$  à  $10^{-6}$  M nécessaire à la croissance bactérienne. De plus, les vertébrés utilisent comme mécanisme de défense contre les bactéries la complexation du fer avec des protéines telles que la transferrine, la lactoferrine, l'hémoglobine ou encore la ferritine, ce qui diminue la concentration en fer libre dans le milieu, le rendant ainsi encore moins accessible aux bactéries.

Afin de faire face au stockage du fer et à la compétition avec d'autres microorganismes, la plupart des bactéries à Gram négatif possèdent des récepteurs de sources de fer au niveau de la membrane externe, et certains synthétisent et excrètent dans le milieu extracellulaire des molécules capables de fixer le fer de différentes sources: les sidérophores.

Dans un milieu carencé en fer, *A. pleuropneumoniae* est capable d'utiliser comme source de fer la transferrine porcine, l'hémoglobine et l'hème, ainsi que des sidérophores exogènes comme le ferrichrome. Ces caractéristiques confirment

l'expression de récepteurs spécifiques à ces sources de fer au niveau de la membrane externe d'*A. pleuropneumoniae*.

Nous avons récemment identifié et cloné deux gènes d'*A. pleuropneumoniae* qui codent pour les récepteurs FhuA et HgbA. FhuA, une protéine de la membrane externe de 75 kDa, est le récepteur du ferrichrome. Le gène *fhuA* (2 088 bp) fait partie de l'opéron *fhuCDBA*. HgbA, une protéine de la membrane externe de 105 kDa, est le récepteur de l'hémoglobine. Le gène *hgbA* est un cadre de lecture de 2 885 bp.

Étant donné que FhuA et HgbA, des antigènes de surface, sont exprimés *in vivo* et conservés parmi les sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae*, ils pourraient être d'excellents candidats pour le développement d'un vaccin sous-unitaire. Ainsi, une meilleure caractérisation de FhuA et HgbA et la détermination de leur rôle dans la virulence pourrait permettre le développement d'un vaccin sous-unitaire capable de protéger contre tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

RECENSION DE LA  
LITTÉRATURE

# 1. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

## 1.1. Généralités

*A. pleuropneumoniae* fût isolée pour la première fois dans des lésions de la pleuropneumonie porcine par Pattison en 1957 (Pattison *et al.*, 1957). En 1964 Shope et White (Shope *et al.*, 1964; White *et al.*, 1964) la nommèrent *Haemophilus pleuropneumoniae*. En 1983, des hybridations ADN-ADN démontrèrent qu'*Haemophilus pleuropneumoniae* possédait plus d'homologies de séquence avec la bactérie *Actinobacillus lignieresii* qu'avec d'autres membres du genre *Haemophilus*. Depuis elle se nomme *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pohl *et al.*, 1983).

*A. pleuropneumoniae* est un petit cocobacille encapsulé, à Gram négatif, immobile, non sporulé et spécifique de son hôte, le porc (Taylor, 1999). *A. pleuropneumoniae* fait partie de la famille des *Pasteurellaceae* tout comme les genres *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella* et *Mannheimia*.

*A. pleuropneumoniae* est divisée en deux biotypes en fonction de leur besoin en nicotinamide adénine dinucléotide (NAD ou Facteur V). Les souches du biotype I nécessitent un apport en NAD pour leur croissance alors que les souches du biotype II peuvent synthétiser du NAD en présence de nucléotides pyrimidiques ou de leurs précurseurs (Bossé *et al.*, 2002; Niven and Lévesque, 1988). Les biotypes sont eux-mêmes divisés en 15 sérotypes en fonction de leurs différences au niveau des polysaccharides de surface (Blackall *et al.*, 2002; Gottschalk, 2004; Perry *et al.*, 1990; Schaller *et al.*, 2001). Sur la base des différences mineures de leurs polysaccharides de surface, les sérotypes 1 et 5, ont été divisés en sous-sérotypes 1a et 1b, ainsi que 5a et 5b (Jolie *et al.*, 1994).

Des différences significatives dans la virulence des différents sérotypes, dues en partie à la variation dans la quantité de polysaccharides de surface et dans les différentes combinaisons de toxines, ont été observées (Frey, 1995). Ainsi les souches du biotype II sont généralement moins virulentes que celles du biotype I (Dom and Haesebrouck, 1992; Pohl *et al.*, 1983). La virulence associée à un sérotypes varie en fonction du pays: les sérotypes 1, 5 et 7 prédominent en Amérique du Nord alors que le sérotypes 2 prévaut en Europe et au Japon (Dubreuil *et al.*, 2000; Jacques, 2004).

## 1.2. La pleuropneumonie porcine

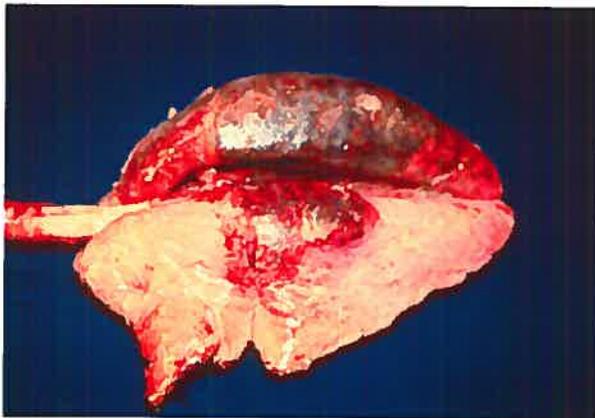
### 1.2.1. Généralités

*A. pleuropneumoniae* est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine; une maladie très contagieuse et qui cause de grandes pertes économiques au niveau mondial. L'importance économique de cette maladie est due à la mortalité ainsi qu'aux coûts engendrés par les frais médicaux (Taylor, 1999).

Contrairement à d'autres maladies pulmonaires, une infection virale antérieure n'est pas nécessaire pour que *A. pleuropneumoniae* induise la maladie, mais il n'est pas rare qu'une infection concomitante ou antérieure par des bactéries ou des virus (comme des *Mycoplasma* ou des *Pasteurella*) aggrave la sévérité de l'infection par *A. pleuropneumoniae* (Fenwick and Henry, 1994).

Le mode principal de transmission est aérien; la maladie est transmise par contact direct entre les porcs ou par des gouttelettes projetées à courte distance (Taylor, 1999). *A. pleuropneumoniae* entre dans les poumons après inhalation et va se fixer de préférence sur les cellules du tractus respiratoire inférieur comme les cellules épithéliales alvéolaires (Bossé *et al.*, 2002; Haesebrouck *et al.*, 1997).

Les signes cliniques vont varier en fonction de l'âge de l'animal, de son état immunologique, des conditions environnementales et de l'exposition à l'agent



**Figure 1:** Lésions pulmonaires caractéristiques d'*A. pleuropneumoniae*. (Tiré de [http://www.microgen.ouhsc.edu/a\\_pleuro/a\\_pleuro\\_home.htm](http://www.microgen.ouhsc.edu/a_pleuro/a_pleuro_home.htm))

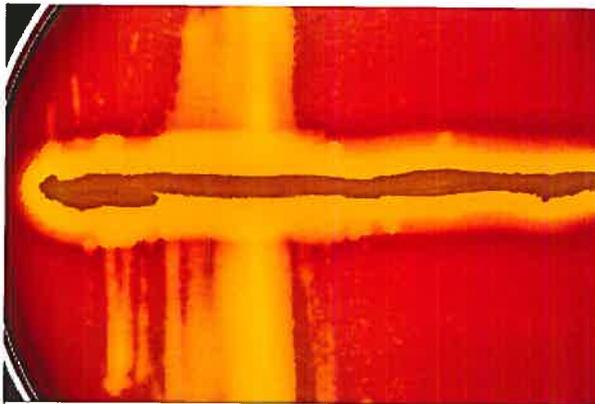
infectieux. La transmission entre élevages résulte de l'introduction d'un porteur sain (forme sous-clinique) dans une population saine. Il existe trois formes cliniques principales: suraiguë, aiguë et chronique. La forme suraiguë débute par des signes cliniques graves: abattement, anorexie, hyperthermie (41,5°C) et une courte période de vomissements et de diarrhées. Par la suite les animaux se couchent, la peau est cyanosée et en phase terminale une dyspnée sévère est notée. La mort survient en 24 à 36 heures. La forme aiguë présente une évolution moins rapide et peut induire une

La mort survient en 24 à 36 heures. La forme aiguë présente une évolution moins rapide et peut induire une

forme chronique. La température atteint 40,5 à 41°C, les animaux sont abattus, anorexiques et présentent des symptômes respiratoires sévères tel la dyspnée, la toux et la respiration par la bouche. Les lésions pulmonaires (Figure 1) associées à la forme suraiguë et aiguë sont caractérisées par des œdèmes sévères, des inflammations, des hémorragies et des nécroses. La forme chronique apparaît quand les signes aigus ont disparus. Une toux intermittente ou sporadique, d'intensité variable va se développer (Bossé *et al.*, 2002; Taylor, 1999).

### 1.2.2. Diagnostiques, traitements et prévention

Il est relativement aisé d'isoler *A. pleuropneumoniae* à partir de lésions pulmonaires. De plus, il n'est pas rare d'isoler de ces lésions d'autres organismes,



**Figure 2 :** Ensemencement croisé d' *A. pleuropneumoniae* avec un *Staphylococcus*  $\beta$ -hémolytique. Démonstration de la réaction CAMP, de l'activité hémolytique et de la nécessité du NAD pour la croissance. (Tiré de [http://www.microgen.ouhsc.edu/a\\_pleuro/a\\_pleuro\\_home.htm](http://www.microgen.ouhsc.edu/a_pleuro/a_pleuro_home.htm))

principalement *Pasteurella multocida*. Étant donné que les souches du biotype I sont exigeantes en NAD, il convient d'utiliser, pour sa croissance, des milieux enrichis en NAD comme un milieu PPLO complémenté de 1% de NAD. Une autre technique consiste à ensemercer l'isolat sur une gélose sang sur laquelle on a ensemercé en stries un *Staphylococcus* (Figure 2).

Les colonies d' *A. pleuropneumoniae* sont hémolytiques et présentent généralement un test CAMP positif. De plus, une réaction positive à l'uréase est une caractéristique importante dans l'identification d' *A. pleuropneumoniae*. Une incubation dans un milieu enrichi de 5 à 7% en CO<sub>2</sub> peut aider lors de l'isolement initial (Fenwick and Henry, 1994). La confirmation de l'appartenance de l'isolat au genre *A. pleuropneumoniae* peut être confirmée par de nombreux tests comme la PCR (Gram *et al.*, 1996; Sirois *et al.*, 1991) ou des test sérologiques utilisant des anticorps monoclonaux ou adsorbés (Taylor, 1999). Une bactérie peut être associée à un groupe de sérotypes grâce aux

profils de ses toxines obtenus par des tests PCR utilisant des amorces spécifiques des gènes des toxines (Frey *et al.*, 1995) ou par des anticorps monoclonaux spécifiques du sérotype 1 (Lairini *et al.*, 1995), ou du sérotype 2 (Rodriguez-Barbosa *et al.*, 1995), ou du sérotype 5 (Dubreuil *et al.*, 1996), ou encore du sérotype 7 (Lebrun *et al.*, 1999).

*In vitro*, *A. pleuropneumoniae* est particulièrement sensible aux antibiotiques suivants: la pénicilline, l'ampicilline, la céphalosporine, le chloramphénicol, les tétracyclines, la colistine, le sulfamides, le cotrimoxazole et la gentamicine. Les antibiotiques préférentiellement utilisés sont ceux ayant des propriétés pharmacocinétiques satisfaisantes. Ainsi les  $\beta$ -lactames, le cotrimoxazole et les tétracyclines sont les antibiotiques les plus efficaces (Chang *et al.*, 2002; MacLean *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2000; Taylor, 1999). Il est important de noter que les antibiothérapies sont efficaces uniquement lors de la phase initiale de la maladie, elles sont capables de réduire la mortalité et permettent de retrouver un gain de poids normal. Une utilisation tardive du traitement engendre, même si l'animal se rétablit, des infections chroniques qui vont induire une insuffisance respiratoire. Étant donné qu'à la suite des antibiothérapies certains animaux deviennent porteurs sains, ils demeurent une source d'infection pour les autres animaux (Taylor, 1999).

Il existe de nombreux moyens de prévention parmi lesquels on retrouve l'isolement des animaux présentant les premiers symptômes de la maladie, l'introduction dans un nouveau troupeau uniquement d'animaux provenant d'élevages sains et évidemment la vaccination. Actuellement de nombreux vaccins sont développés. Ils se divisent en deux groupes majeurs: les bactéries entières tuées ou bactérines et les vaccins sous-unitaires (Taylor, 1999). Les bactérines vont réduire la mortalité mais ne peuvent pas par contre prévenir les infections. De plus, elles ne confèrent généralement pas de protection contre les sérotypes hétérologues (Fenwick and Henry, 1994). L'efficacité limitée des ces vaccins peut en partie être expliquée par l'absence de toxine et de certains facteurs de virulence associés à la bactérie ou par la compétition pouvant exister entre les différents antigènes présents dans le vaccin (Haesebrouck *et al.*, 2004; Van den Bosch and Frey, 2003). Contrairement

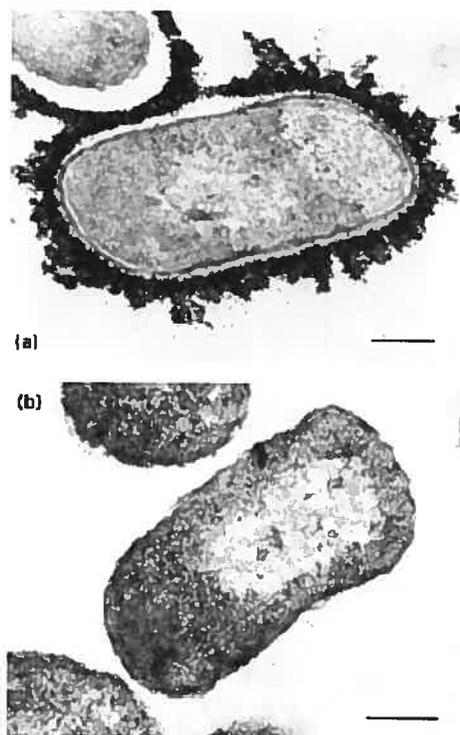
aux bactériines, les vaccins sous-unitaires confèrent une meilleure protection croisée, ils diminuent les symptômes et augmentent les performances de l'animal (Haesebrouck *et al.*, 1997). Dans un vaccin sous-unitaire il est parfois bon de coupler des antigènes. Ainsi par exemple, un vaccin constitué principalement des toxines Apx va induire une protection partielle uniquement si la dose de bactéries administrées est faible (Chiers *et al.*, 1998), mais lorsque ces mêmes toxines sont couplées à la « transferrin-binding protein » (Tbp) une protection significative est observée après une infection expérimentale sévère (Van Overbeke *et al.*, 2001). Toutefois il faut faire attention, car certains antigènes sont compétitifs et peuvent donc induire une diminution de l'efficacité du vaccin. Ainsi, il a été démontré que les anticorps dirigés contre la protéine purifiée PalA, la protéine prédominante de la membrane externe d'*A. pleuropneumoniae*, aggravent les conséquences de l'infection expérimentale et neutralisent les effets protecteurs des anticorps dirigés contre Apx (Van den Bosch and Frey, 2003). Les vaccins ne protègent pas toujours contre l'évolution vers des porteurs sains mais sont une aide efficace dans les programmes d'éradication de la maladie.

### 1.3. Les facteurs de virulence

La pathogenèse de la pleuropneumonie porcine est très complexe et n'est pas encore entièrement élucidée (Bossé *et al.*, 2002). Tout comme les facteurs environnementaux et ceux liés à l'hôte, les facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae* jouent un rôle clé dans la progression de la maladie. Entre autres on peut citer comme facteurs de virulence: la capsule polysaccharidique, les lipopolysaccharides (LPS), les toxines APX et les protéines de la membrane externe (OMP) (Bossé *et al.*, 2002; Frey, 1995; Jacques and Mikael, 2002).

### 1.3.1. La capsule polysaccharidique

La capsule (Figure 3a) joue un rôle important dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae* ; de plus elle protège la bactérie contre les mécanismes de défense de l'hôte comme la phagocytose ou le complément (Inzana *et al.*, 1988). Il a



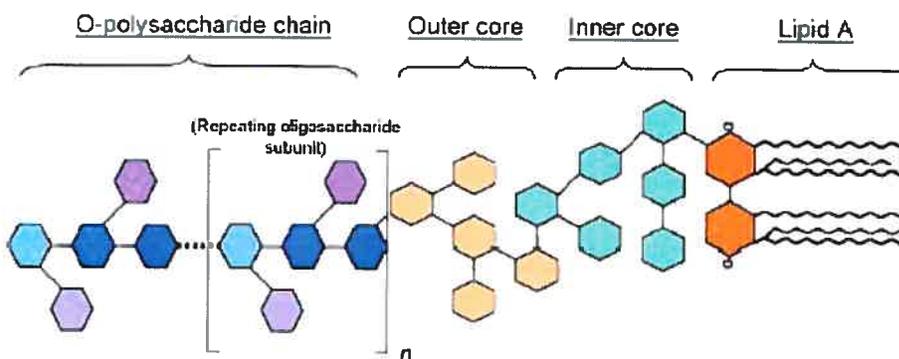
**Figure 3 :** Image par microscopie électronique à transmission (a) d'une souche capsulée d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et (b) d'un mutant non capsulé marqué à la ferritine polycationique (Rioux *et al.*, 2000). Barre 200 nm

été démontré, qu'en fonction du sérotype, l'épaisseur de la capsule varie entre 80-230 nm et qu'il existe une corrélation entre l'épaisseur de la capsule et la virulence de la souche (Bandara *et al.*, 2003; Jacques *et al.*, 1988). La composition chimique et la structure de la capsule des 15 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ont été déterminées par Perry et ses collaborateurs en 1990 pour les sérotypes 1 à 12 (Perry *et al.*, 1990), en 2004 pour les sérotypes 13 et 14 (MacLean *et al.*, 2004; Perry and MacLean, 2004) et en 2005 pour le sérotype 15 (Perry *et al.*, 2005). Elle est constituée soit d'unités répétées d'oligosaccharides (sérotypes 5a, 5b et 10), soit de polymères d'acide teichoïque liés par des ponts diester-phosphate (sérotypes 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11 et 13) ou de polymères d'unités oligosacchariques liées par des ponts phosphate

(sérotypes 1, 4, 12 et 15) (Dubreuil *et al.*, 2000; MacLean *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 1990; Perry and MacLean, 2004; Perry *et al.*, 2005). Les résidus phosphates ou les acides carboxyliques chargent négativement les capsules (Dubreuil *et al.*, 2000). Actuellement deux opérons, l'un codant pour l'exportation des polysaccharides capsulaires *cpxDCBA* (Ward and Inzana, 1997), l'autre codant pour la biosynthèse de la capsule d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5a (*cpsABCDE*) (Ward *et al.*, 1998) sont connus.

Contrairement à la souche mère encapsulée, des mutants non capsulés obtenus soit par mutations chimiques (Inzana *et al.*, 1988), soit par échange allélique (Ward *et al.*, 1998) ou encore par transposition (Figure 3b) (Rioux *et al.*, 2000) sont avirulents, confirmant ainsi l'importance de la capsule dans la virulence. Longtemps il a été supposé que la capsule jouait un rôle dans l'adhésion aux tissus de l'hôte. Cependant, en 2002, Rioux et ses collaborateurs ont construit un mutant sans capsule qui adhère mieux aux cellules de l'hôte que la souche mère (Rioux *et al.*, 2000); démontrant ainsi que la capsule ne jouerait pas de rôle dans l'adhésion mais qu'elle masquerait, au moins partiellement, les adhésines. Les informations existant sur le rôle de la capsule dans la protection contre le complément sont contradictoires. En 1988, Inzana et ses collaborateurs démontrèrent qu'un mutant du sérotype 5 non capsulé est sensible au complément (Inzana *et al.*, 1988) alors qu'en 2000, notre laboratoire démontra le contraire pour un mutant du sérotype 1 (Rioux *et al.*, 2000).

### 1.3.2. Les lipopolysaccharides (LPS)

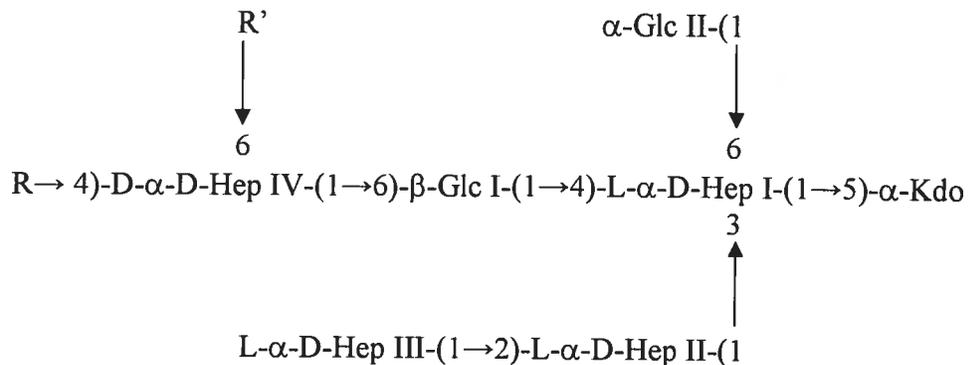


**Figure 4 :** Structure générale des LPS (Erridge *et al.*, 2002).

Les LPS se situent sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ils sont essentiels pour l'intégrité structurale et fonctionnelle de la membrane externe. Les LPS sont divisés en trois parties (Figure 4): (i) le lipide A; (ii) le noyau oligosaccharidique; et (iii) l'antigène-O. Le lipide A est la partie ancrée dans la membrane externe de la bactérie, il est composé de deux dérivés de glucosamine sur lesquels sont liés des acides gras et des phosphates ou des pyrophosphates. Le lipide A est très conservé, fortement hydrophobe et il confère l'activité endotoxique à la molécule. Le noyau oligosaccharidique, entre le lipide A et l'antigène-O, est lui-

même divisé en deux: le noyau interne et externe. Le noyau interne, le plus proche du lipide A, contient une forte proportion de sucres rares comme l'acide 3-Désoxy-D-manno-octulosonique (Kdo). Le noyau externe est généralement constitué de sucres plus communs comme les hexoses (Dubreuil *et al.*, 2000; Erridge *et al.*, 2002).

La structure du noyau oligosaccharidique des sérotypes 1, 2, 5a et 5b d'*A. pleuropneumoniae* est la suivante (Michael *et al.*, 2004):



Pour le sérotype 1: R est (1S)-GalaNAc-(1→4,6)-α-Gal II-(1→3)-β-Gal I-(1→, et R' est H

Pour le sérotype 2: R est β-Glc III-(1→, et R' est D-α-D-Hep V-(1→

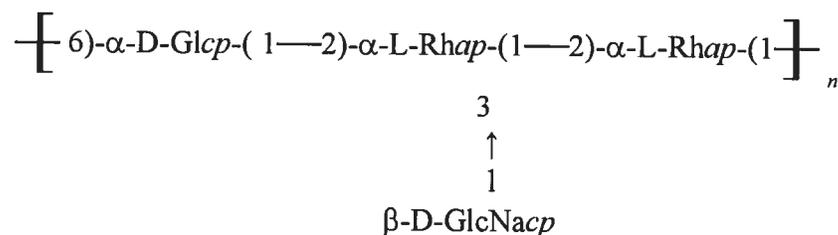
Pour les sérotypes 5a et 5b: R est H et R' est D-α-D-Hep V-(1→

La structure du noyau interne semble bien conservée. Tous les sucres sont sous la forme pyranosyle sauf la chaîne ouverte du N-acétylglactosamine (GalaNAc).

Finalement, l'antigène-O est un polymère de sous-unités saccharidiques répétées.

Chez *A. pleuropneumoniae* cet antigène est retrouvé de façon ubiquitaire. L'antigène-O

d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 est un polymère ramifié de poids moléculaire élevé, formé d'une unité tétrasaccharidique répétée ayant la structure suivante (Altman *et al.*, 1986):



Les sérotypes ont généralement des compositions en LPS différentes. Cependant certaines similarités au niveau de l'antigène-O de quelques sérotypes expliquent les réactions croisées observées parmi certains sérotypes, comme les groupes 1, 9 et 11, les sérotypes 3, 6 et 8 et également les sérotypes 4 et 7 (Dubreuil *et al.*, 2000; Perry *et al.*, 1990).

Bien que des LPS purifiés d'*A. pleuropneumoniae* peuvent causer des dommages tissulaires, les lésions induites par les LPS dans les poumons de porcs ne sont ni hémorragiques, ni nécrotiques. Ceci indique que le LPS n'est pas la cause des lésions typiques de la pleuropneumonie, mais il y contribue (Fenwick *et al.*, 1986). En 1990, notre laboratoire a suggéré que les LPS sont des adhésines (Bélanger *et al.*, 1990). En 1994 nous avons démontré, grâce à la microscopie immuno-électrique et à la cytométrie en flux, un prérequis essentiel pour une adhésine: que les LPS sont exposés à la surface d'*A. pleuropneumoniae*. Dans cette même étude il a également été démontré que la partie saccharidique du LPS joue un rôle dans l'adhérence de la bactérie aux cellules du tractus respiratoire porcin. Le rôle de l'antigène-O et du noyau dans l'adhésion a été déterminé grâce à l'obtention de mutants par transposition. Une mutation au niveau de l'antigène-O n'a pas d'effet sur l'adhérence des bactéries aux cellules du tractus respiratoire porcin mais un noyau oligosaccharidique intact est nécessaire pour une adhérence optimale (Rioux *et al.*, 1999). Afin de mieux connaître les gènes impliqués dans la biosynthèse et l'organisation de l'antigène-O, Labrie et ses collaborateurs (Labrie *et al.*, 2002) ont utilisé les sept mutants rugueux (sans antigène-O) obtenues par Rioux en 1999. Dans une région de 18 cadres de lecture (ORF, open reading frames), quatre gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ont été mis en évidence (ORF 12, ORF16, ORF17 et ORF18) (Labrie *et al.*, 2002). La virulence de certains mutants au niveau des LPS a été évaluée sur des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (SPF, specific pathogen free). Les mutants rugueux (sans antigène-O) étaient aussi virulents que la souche mère (Labrie *et al.*, 2002) alors qu'un mutant du noyau était avirulent (Rioux *et al.*, 1999), confirmant ainsi l'importance du noyau oligosaccharidique lors de l'interaction entre la bactérie et son hôte.

En 2003, un modèle hypothétique, pour l'adhésion d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules de l'hôte, a été proposé. *A. pleuropneumoniae* formerait tout d'abord une liaison de faible affinité entre l'antigène-O du LPS et des résidus de phosphatidyléthanolamine ou de courts glycolipides situés à la surface de la cellule hôte. Par la suite le noyau oligosaccharidique du LPS et/ou d'autres protéines de surface interagiraient plus fortement avec d'autres récepteurs de la cellule cible (Jeannotte *et al.*, 2003).

### 1.3.3. Les exotoxines

*A. pleuropneumoniae* produit quatre exotoxines qui appartiennent à la famille des RTX (repeat in toxins). Les RTX contiennent des répétitions de nanopeptides riches en glycine et elles forment des pores dans la membrane cellulaire de l'hôte. Maintenant les RTX d'*A. pleuropneumoniae* sont appelées Apx (*A. pleuropneumoniae* RTX toxins) (Frey *et al.*, 1993; Frey, 1995; Schaller *et al.*, 1999).

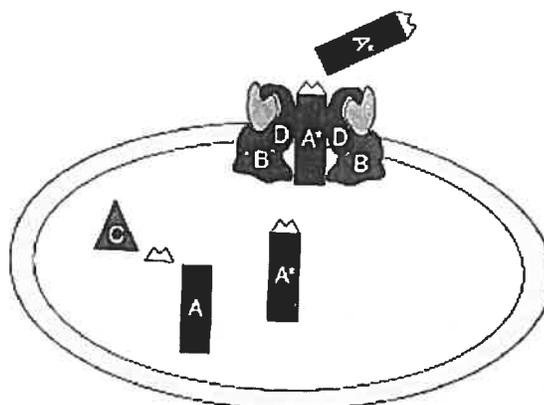
**ApxI** est une protéine de 105 kDa très hémolytique et très cytotoxique. Elle est synthétisée par les sérotypes 1, 5, 9, 10 et 11.

**ApxII** est une protéine de 103 kDa peu hémolytique et modérément cytotoxique. Elle est synthétisée par tous les sérotypes sauf le 10.

**ApxIII** est une protéine de 120 kDa pas hémolytique mais fortement cytotoxique. Elle est synthétisée par les sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8.

**ApxIV** est une protéine de 200 kDa peu hémolytique, son activité cytotoxique n'a pas encore été démontrée. Elle est synthétisée par tous les sérotypes.

Une particularité d'*A. pleuropneumoniae* est que de nombreux sérotypes synthétisent au moins deux toxines parmi Apx I, II et III (Frey *et al.*, 1993). Les gènes codant pour les toxines Apx forment un opéron de quatre gènes: l'opéron *apxCABD*. Le gène C code pour un activateur post-traductionnel (une acylation des acides gras active la toxine), le gène A code pour la pré-toxine et les produits des gènes B et D sont impliqués dans la sécrétion (Figure 5). ApxII ne possède pas les gènes de sécrétion (Frey, 1995).



**Figure 5 :** Représentation schématique des fonctions des produits Apx. La toxine est produite sous forme d'une pré-toxine (ApxA). La toxine active (ApxA\*) est obtenue par une acylation d'ApxA grâce à ApxC. Par la suite la toxine active est sécrétée à l'aide des protéines de sécrétion associées à la membrane (ApxB et ApxD) et d'autres protéines membranaires (Frey, 1995).

Les toxines Apx permettent à *A. pleuropneumoniae* de passer à travers la première ligne de défense de l'hôte: une forte concentration de toxines forme des pores, dans la membrane des cellules phagocytaires, qui induisent un choc osmotique et la mort de la cellule (Haesebrouck *et al.*, 1997). Elles sont également impliquées dans le développement de lésions: elles sont toxiques pour les cellules endothéliales (Serebrin *et al.*, 1991) et provoquent un choc oxydatif dans les macrophages (Dom *et al.*, 1992a) et les neutrophiles (Dom *et al.*, 1992b) qui va résulter en une production excessive de radicaux oxygénés qui vont endommager la cellule.

Des infections expérimentales sur des porcelets et des souris, avec des souches de référence d'*A. pleuropneumoniae*, ont démontré que les sérotypes 1, 5, 9 et 11 étaient exceptionnellement virulents (Komal and Mittal, 1990). Ces résultats suggèrent que les sérotypes synthétisant ApxI sont particulièrement virulents. De plus, les sérotypes qui produisent deux types de toxine (autre que ApxIV) sont généralement plus virulents que ceux qui n'en produisent qu'une (Frey, 1995).

Tascón et ses collaborateurs (Tascón *et al.*, 1994) ont créé un mutant du sérotype 1 ne pouvant sécréter ni ApxI ni ApxII car le gène *apxIB* (un des gènes de la sécrétion) était muté. Ce mutant était ni hémolytique, ni virulent. Une insertion dans le gène *apxIA* a induit un mutant peu hémolytique, pouvant produire et sécréter ApxII, et qui conserve un peu de virulence (Tascón *et al.*, 1994). Ces expériences confirment que les toxines doivent être sécrétées pour causer la maladie, que les

toxines Apx sont le facteur de virulence primaire d'*A. pleuropneumoniae* et que les deux toxines, ApxI et ApxII, sont nécessaires pour une virulence complète du sérotype 1.

#### 1.3.4. Les protéines de la membrane externe (OMP)

Au niveau de la membrane externe d'*A. pleuropneumoniae* se trouvent de nombreuses protéines qui peuvent induire la virulence. La synthèse de certaines de ces protéines peut être régulée par la quantité de fer disponible dans le milieu (Deneer and Potter, 1989b) ou par l'ajout de maltose dans le milieu (Deneer and Potter, 1989a). Lorsque du maltose est ajouté dans le milieu de culture une protéine de 42 kDa est retrouvée chez les sérotypes 1, 2, 3, 5, 6, et 7. Cette protéine possède des propriétés similaires à celles de la porine d'*Escherichia coli* induite par le maltose (Deneer and Potter, 1989a). Les mécanismes d'acquisition du fer seront décrits en détail par la suite.

Bien que les profils protéiques diffèrent pour presque tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (Rapp *et al.*, 1986), certaines OMP ont été retrouvées chez tous les sérotypes. On peut citer PalA, une lipoprotéine de 14 kDa associée au peptidoglycane (Frey *et al.*, 1996), une protéine de 29/41 kDa modifiable par la chaleur, une protéine majeure variant de 32 à 42 kDa en fonction du sérotype et une protéine de 48 kDa (Cruz *et al.*, 1996).

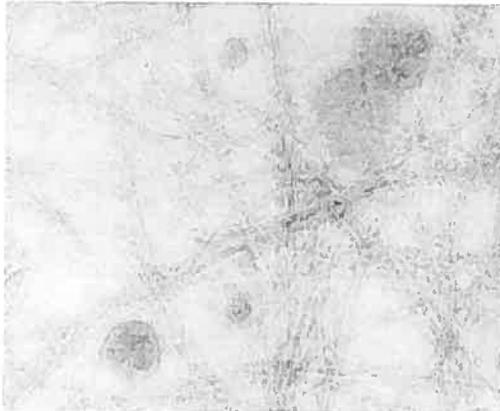
Une lipoprotéine de la membrane externe (OmlA) d'environ 40 kDa, probablement présente chez tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*, a été utilisée dans des immunisations expérimentales. Après une infection expérimentale avec un sérotype homologue, les porcs immunisés par OmlA recombinante ont été protégés de la mort, mais des lésions pulmonaires étaient présentes et *A. pleuropneumoniae* a été isolée des poumons. Ces résultats indiquent que des anticorps dirigés contre OmlA peuvent collaborer à la protection contre *A. pleuropneumoniae* mais ne sont pas suffisants (Gerlach *et al.*, 1993).

### 1.3.5. Autres facteurs de virulence

#### 1.3.5.1. Les fimbriae

Les fimbriae sont des structures filamenteuses qui sont exposées à la surface des bactéries. Ils jouent un rôle dans l'acquisition d'ADN exogène, l'exportation de protéines, la motilité ainsi que dans l'adhésion.

De nombreux rapports démontrent, par microscopie électronique à transmission,



**Figure 6 :** Image par microscopie électronique de fimbriae purifiés, colorés négativement, d'une souche d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (Zhang *et al.*, 2000).

la présence de fimbriae à la surface d'*A. pleuropneumoniae* (Dom *et al.*, 1994; Utrera and Pijoan, 1991). En 2000, des fimbriae ont été isolés d'une souche d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et le séquençage de l'extrémité N-terminale de la sous-unité fimbriaire, nommée ApfA, a révélé son appartenance à la famille des fimbriae de type IV (Figure 6) (Zhang *et al.*, 2000). Les gènes codant pour les fimbriae de type IV forment un opéron de quatre gènes: *apf ABCD*. *apfA* code pour la

protéine fimbriaire et les autres gènes de l'opéron semblent être impliqués dans la biosynthèse (Stevenson *et al.*, 2003). L'opéron *apf ABCD* n'est pas transcrit *in vitro* (Stevenson *et al.*, 2003) mais il est transcrit lorsque la bactérie adhère à des cellules épithéliales pulmonaires et lors d'infections expérimentales (Boekema *et al.*, 2004). La spécificité de la transcription des fimbriae indique l'importance ces derniers dans l'adhésion d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules de l'hôte.

#### 1.3.5.2. Les uréases

Les uréases catalysent l'hydrolyse de l'urée en ammonium et en dioxyde de carbone et ils sont des facteurs de virulence pour certains pathogènes. C'est l'ammonium qui est responsable des effets néfastes dus à l'activité uréase: l'ammonium est cytotoxique pour les cellules épithéliales gastriques et augmente les dommages dus aux neutrophiles (Megraud *et al.*, 1992; Smoot *et al.*, 1990).

En 1997 il a été démontré que l'activité uréase est essentielle pour la survie et/ou la pathogénèse d'*A. pleuropneumoniae* (Bossé and MacInnes, 1997). L'activité uréase est codée par un opéron de gènes similaires à celui des autres bactéries. La sous-unité structurale est codée par les gènes *ureABC* et les protéines accessoires sont codées par quatre gènes situés en aval, *ureEFGD* (Bossé and MacInnes, 1997). De plus, le fait qu'*A. pleuropneumoniae* requiert les gènes du transport du nickel (*cbiKLMQO*) pour son activité uréase indique que de nombreux gènes sont impliqués dans le maintien du phénotype uréase positif (Bossé *et al.*, 2001).

### 1.3.5.3. Les protéases

*A. pleuropneumoniae* sécrète des protéases qui dégradent la gélatine porcine, les IgA porcins et dans une moindre mesure l'hémoglobine porcine, humaine et bovine (Negrete-Abascal *et al.*, 1994). Une des protéines responsables de l'activité protéolytique d'*A. pleuropneumoniae* a été purifiée et caractérisée. C'est une métalloprotéase multimérique constituée de sous-unités d'environ 47 kDa capable de dégrader les IgA et les IgG. Elle est synthétisée *in vivo* par tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal *et al.*, 1998). Il a été suggéré que le clivage des IgA pouvait faciliter la propagation mucosale d'*A. pleuropneumoniae* et que le clivage protéique de l'hémoglobine serait un mécanisme d'acquisition du fer (Haesebrouck *et al.*, 1997). Le rôle des protéases dans la pathogénèse de la pleuropneumonie porcine n'est pas encore bien connu.

### 1.3.5.4. Les superoxydes dismutases (SOD)

Afin de protéger l'animal des infections microbiennes les macrophages et les neutrophiles peuvent synthétiser des radicaux superoxydes (Dom *et al.*, 1992b). Pour contrer cette attaque de nombreuses bactéries à Gram négatif, dont *A. pleuropneumoniae* (Langford *et al.*, 1996), possèdent des superoxydes dismutases, périplasmiques qui utilisent comme co-facteur le cuivre et le zinc ([Cu-Zn]-SOD). Les SODs sont des métalloprotéines qui catalysent la réaction de dismutation des radicaux superoxydes (très réactifs) en oxygène et en peroxyde d'hydrogène ( $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ ) (McCord and Fridovich, 1969). Cette réaction est la première étape d'une série de réactions qui vont empêcher l'accumulation de

radicaux libres d'oxygène et d'hydrogène, qui sont cytotoxiques, dans la cellule (Sheehan *et al.*, 2000). Ainsi les SODs permettent à la bactérie de survivre dans les phagosomes en éliminant les radicaux libres toxiques. Chez *A. pleuropneumoniae* le gène codant pour [Cu-Zn]-SOD est *sodC*. Il est situé entre les gènes *asd* (aspartate semialdehyde dehydrogenase) et *recF* (Langford *et al.*, 1996). [Cu-Zn]-SOD possède une séquence signal à son extrémité N-terminale qui va permettre à la protéine de se diriger vers le périplasme où elle va pouvoir dismuter les radicaux superoxydes exogènes (Langford *et al.*, 1996). Afin de déterminer le rôle de [Cu-Zn]-SOD dans la pathogenèse d'*A. pleuropneumoniae*, l'équipe de Sheehan (Sheehan *et al.*, 2000) a créé des mutants au niveau du gène *sodC*. Bien que *in vitro* ces mutants étaient sensibles aux superoxydes, ils étaient aussi virulents que la souche mère lors d'une infection expérimentale chez des porcs (Sheehan *et al.*, 2000).

### 1.3.6. Nouvelles techniques d'identification des facteurs de virulence.

Afin d'identifier les gènes impliqués dans la virulence et la survie d'*A. pleuropneumoniae*, de nombreuses techniques de biologie moléculaire de pointe ont été utilisées. On peut citer l'IVET (*In Vivo* Expression Technology) (Fuller *et al.*, 1999), la STM (Signature Tagged Mutagenesis) (Fuller *et al.*, 2000; Sheehan *et al.*, 2003), SCOTS (Selective Capture of Transcribed Sequences) (Baltes and Gerlach, 2004) et plus récemment les biopuces.

#### 1.3.6.1. IVET

La technique IVET n'est pas basée sur la reproduction de signaux environnementaux en laboratoire, mais sur l'utilisation de l'hôte comme milieu sélectif afin d'enrichir des gènes fusionnés qui sont exprimés dans les tissus de l'animal. Parmi ces gènes identifiés il existe des gènes induits *in vivo* (les gènes *ivi*) qui sont peu ou pas exprimés *in vitro* mais dont l'expression est élevée dans les tissus de l'hôte (Mahan *et al.*, 1993). La technique originale était basée sur une complémentation *in vivo* de l'auxotrophie de la purine. Par la suite, afin d'élargir l'application de cette méthode, des modifications des systèmes de sélection ont été

effectuées: l'utilisation de la complémentation par des marqueurs auxotrophes, la résistance aux antibiotiques et l'introduction de recombinases à des sites spécifiques (Camilli and Mekalanos, 1995; Mahan *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996).

En 1999 Fuller et ses collaborateurs (Fuller *et al.*, 1999) ont utilisés la technique IVET afin d'identifier les gènes induits *in vivo* chez *A. pleuropneumoniae*. Le système IVET était basé sur des mutants d'*A. pleuropneumoniae* atténués par la riboflavine. Dans cette étude ils ont analysé 2 400 clones aléatoires et isolé 10 clones (*iviA-J*) possédant des promoteurs induits *in vivo* lors de l'infection. Grâce à l'homologie de séquence quatre de ces 10 gènes furent identifiés: le gène *IivI* qui joue un rôle dans la synthèse d'acides aminés branchés, l'opéron *IivDA* qui joue également un rôle dans la synthèse d'acides aminés branchés, l'opéron *secE-musG* (*secE* joue un rôle dans la sécrétion de protéines et *musG* est un facteur de transcription) et le gène *mrp* qui joue un rôle dans la synthèse de LPS (Fuller *et al.*, 1999).

#### 1.3.6.2. STM

La STM est une technique d'hybridation comparative qui utilise une collection de transposons. Dans chaque transposon une «étiquette d'ADN» différente est introduite, rendant ainsi le transposon unique. Les «étiquettes d'ADN» contiennent des régions centrales d'environ 40 pb variables encadrées par des séquences invariables permettant la co-amplification et le marquage de la région centrale par PCR. Ainsi, lors de la mutation d'un organisme par les transposons «étiquetés», chaque mutant peut en théorie être distingué de tous les autres mutants grâce aux différentes «étiquettes d'ADN» portés par les transposons (Hensel *et al.*, 1995).

En 2000, deux études portant sur l'identification des gènes de virulence et l'infection d'*A. pleuropneumoniae* grâce à la STM ont été décrites. Dans la première étude 800 mutants mini-*Tn10* ont été analysés, 110 étaient des mutants potentiellement atténués et uniquement 20 gènes différents furent identifiés. Les gènes identifiés par STM représentent cinq classes de fonctions: des enzymes biosynthétiques, des déterminants de virulence potentiels, des composants de la régulation cellulaire, des composants de la traduction et des fonctions inconnues

(Fuller *et al.*, 2000). Dans la deuxième étude, 2064 mutants *Tn10* ont été analysés dont 105 étaient des mutants potentiellement atténués et 55 gènes différents furent identifiés. Grâce à la recherche de similarité (BLAST) ils ont réussi à identifier des possibles analogues ou homologues pour 51 des 55 gènes. Parmi les correspondances on retrouve des protéines potentiellement impliquées: dans le métabolisme et le transport de nombreux nutriments et substances inconnues, dans la réponse au stress, dans la régulation des gènes et dans la production de composants de la surface cellulaire. Dix séquences possèdent des homologies avec des gènes impliqués dans la production de LPS et de la capsule (Sheehan *et al.*, 2003). Uniquement trois mutants sont identiques entre ces deux études: *tig* qui est impliqué dans la réponse au stress, *pnp* qui est également impliqué dans la réponse au stress et *apvD/macA* dont la fonction est inconnue.

#### 1.3.6.3. SCOTS

La technique SCOTS est une méthode de sélection à partir de l'ADNc. Dans cette technique, l'ARN total microbien et de l'hôte sont extraits des cellules et tissus infectés puis convertie en ADNc. Lors de la conversion de l'ARN en ADNc, l'ADNc acquiert une séquence terminale définie facilitant ainsi l'amplification par PCR. L'ADNc microbien est séparé de l'ADNc de l'hôte grâce à une hybridation avec de l'ADN génomique bactérien biotynilé et préalablement préhybridé avec des fragments d'ADNr (Graham and Clark-Curtiss, 1999).

En 2004, Baltes et Gerlach (Baltes and Gerlach, 2004) ont utilisé la technique SCOTS pour identifier, dans les tissus nécrotiques des poumons de porcs, des gènes transcrits par *A. pleuropneumoniae*. Dans cette étude ils ont identifié 46 gènes différemment exprimés dans les tissus nécrotiques des poumons. Ils n'ont pas trouvé d'homologie avec des gènes de fonction connue pour deux de ces gènes. Les 44 autres gènes furent divisés en 6 groupes en fonction de leur rôle: des protéines sécrétées, dans la surface cellulaire, dans le métabolisme, dans la régulation, dans le stress et pour finir dans le transport. Dans cette étude ils ont également réussi à relier 20 des 46 gènes à l'expression *in vivo* et/ou à la virulence.

## 2. Le fer

### 2.1. Généralités

Le fer est un facteur de croissance indispensable pour presque toutes les formes de vie, sauf les lactobacilles qui utilisent le manganèse et le cobalt en tant que biocatalyseur à la place du fer. Le fer est le co-facteur de nombreux processus biologiques comme la photosynthèse, la fixation du diazote ( $N_2$ ), la respiration, le transport d'oxygène, la régulation des gènes, ou encore la biosynthèse de l'ADN (Andrews *et al.*, 2003). Bien que le fer soit le quatrième élément le plus abondant sur la terre, il est limité, sous sa forme libre soluble, à une concentration d'environ  $10^{-17}$  M dans un milieu aqueux et aérobie; une valeur nettement inférieure à celle nécessaire pour la croissance bactérienne ( $10^{-8}$  à  $10^{-6}$  M). Or, ceci est dû au fait que les oxydes  $Fe^{3+}$  sont très stables et peu solubles à pH7 (Griffiths and Williams, 1999).

Chez les vertébrés le fer est généralement intracellulaire. Il est majoritairement contenu dans l'hème de l'hémoglobine et dans une moindre mesure dans la ferritine. Dans les compartiments extracellulaires, la petite quantité de fer disponible est complexée par des protéines comme la transferrine, dans le sang et la lymphe, ou la lactoferrine dans les sécrétions. Cette complexation du fer par les vertébrés fait chuter à  $10^{-24}$  M la concentration en fer libre dans le milieu extracellulaire, constituant de ce fait un mécanisme de défense contre les bactéries (Braun, 2001).

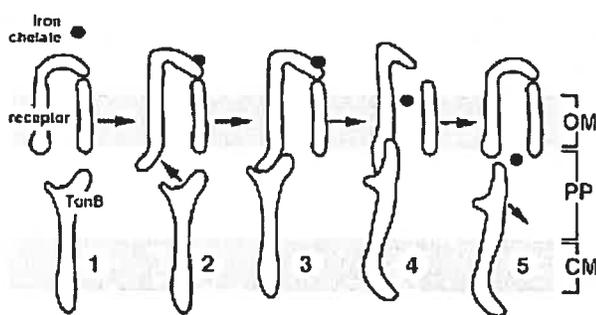
Afin de faire face au stockage du fer et à la compétition avec d'autres microorganismes, la plupart des bactéries possèdent de nombreux mécanismes d'acquisition du fer. L'acquisition du fer peut être divisée en deux mécanismes généraux qui vont être détaillés par la suite. Le premier implique un contact direct entre la bactérie et la source exogène de fer. Le deuxième consiste en une synthèse et un relâchement d'une molécule par la bactérie dans le milieu extracellulaire afin de fixer le fer de différentes sources. Un excès de fer est toxique pour les bactéries et son assimilation est régulée de façon stricte. La plupart des gènes impliqués dans l'assimilation du fer sont exprimés uniquement lors de conditions de déficience en fer. Par la suite, lorsque la concentration de fer intracellulaire augmente ces mêmes gènes sont réprimés (Wandersman and Delepelaire, 2004).

## 2.2. Entrée du fer dans la cellule

### 2.2.1. Le complexe TonB-ExbB-ExbD

Il n'existe pas de source d'énergie dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les bactéries ont développé un système qui fournit l'énergie nécessaire au transport à travers la membrane externe grâce à la force proton motrice de la membrane cytoplasmique. Le système est constitué de trois protéines, TonB, ExbB, et ExbD (le complexe TonB-ExbB-ExbD) qui fournissent l'énergie nécessaire pour le transport actif à travers la membrane externe du fer, de l'hème, du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore et de la vitamine  $\text{B}_{12}$  (Braun and Braun, 2002; Moeck and Coulton, 1998). La majeure partie de TonB, une protéine de 26 kDa, est située dans le périplasma avec une extrémité N-terminale ancrée dans la membrane cytoplasmique. ExbB et ExbD sont entièrement situées dans la membrane cytoplasmique. Ces trois protéines forment un complexe *in vivo* avec un ratio de 1:7:2 (Higgs *et al.*, 2002).

Le processus de transduction de l'énergie nécessite un contact direct entre TonB et le récepteur de la membrane externe. Un segment très conservé de cinq acides aminés hydrophobes, la «boîte TonB», à l'extrémité N-terminale des



**Figure 7 :** Schéma de la translocation, dépendante de TonB, d'un complexe ferrique à travers la membrane externe (OM : membrane externe; PP : périplasma; CM : membrane cytoplasmique) (Moeck and Coulton, 1998).

récepteurs dépendants de TonB à été découvert (Postle, 1993). Le passage d'un complexe ferrique à travers la membrane externe se fait comme suit (Figure 7):

La fixation du ligand sur le récepteur induit des changements conformationnels dans les boucles extracellulaires et périplasmiques du récepteur (Figure 7-2). Ces

changements dus à l'occupation du récepteur par le ligand vont induire un contact entre TonB et le récepteur au niveau de la boîte TonB (Figure 7-3). ExbB et ExbD utilisent la force proton motrice de la membrane cytoplasmique afin de produire une forme «énergisée» de TonB qui va permettre l'ouverture du bouchon du récepteur. Cette ouverture induit la dissociation des chélateurs d'ions ferriques de leur site de

fixation, leur translocation dans le périplasma et la perte d'énergie de TonB (Figure 7-4). Pour terminer, TonB se dissocie du récepteur afin d'être recyclé par le complexe ExbB – ExbD de la membrane cytoplasmique (Figure 7-5) (Moeck and Coulton, 1998).

### 2.2.2. Transport à travers le périplasma et la membrane cytoplasmique

Le transport à travers le périplasma et la membrane cytoplasmique se fait grâce à une protéine périplasmique et un transporteur de la membrane cytoplasmique. Chaque protéine périplasmique fixe un seul complexe ferrique. Il n'est pas encore clair si la protéine périplasmique va chercher le complexe ferrique au niveau du récepteur de la membrane externe ou si la protéine périplasmique attrape le complexe ferrique dans le périplasma (Koster, 2001). La protéine périplasmique agit comme une navette pour amener le complexe ferrique du récepteur au transporteur de la membrane cytoplasmique.

Le transporteur de la membrane cytoplasmique est une perméase de type ABC composée de quatre «modules». Deux modules, intégrés dans la membrane cytoplasmique, sont des perméases et les deux modules ABC (ABC transporteurs), situés au niveau du feuillet interne de la membrane cytoplasmique, sont des ATPase. Les modules perméasiques peuvent être composés de deux copies de la même protéine (système de transport de l'hème), de deux protéines indépendantes (système de transport de l'entérobactine (FepD et FepG)), ou encore d'une grosse protéine composée de deux sous-unités (système de transport du ferrichrome). Les ABC transporteurs sont généralement composés de deux sous-unités identiques (Andrews *et al.*, 2003).

## 2.3. Utilisation du fer par les microorganismes

### 2.3.1. Les sidérophores

#### 2.3.1.1. Généralités

Les sidérophores (du grec «porteur de fer») sont des molécules de faible poids moléculaire (< 1000 Da) qui sont caractérisés par leur forte affinité ( $K_{\text{aff}} > 10^{30}$ ) et leur spécificité pour les ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ils sont généralement synthétisés par des bactéries et quelques champignons en réponse à une déficience en fer dans le milieu. Leur rôle est de fixer le fer de l'environnement et de le rendre disponible aux cellules microbiennes (Andrews *et al.*, 2003; Neilands, 1984, 1995). Les sidérophores peuvent être classés en trois classes majeures en fonction de la structure chimique du groupe impliqué dans la liaison avec le fer: les hydroxamates (ex. ferrichrome, aérobactine), les catéchols (ex. entérobactine) et les  $\alpha$ -hydroxycarboxylates (ex. la pyochéline de *Pseudomonas aeruginosa*) (Andrews *et al.*, 2003; Neilands, 1995; Wandersman and Delepelaire, 2004). Les hydroxamates sont très solubles dans l'eau, moins affectés par les changements de pH et plus stables que les catéchols (Guerinot, 1994).

#### 2.3.1.2. Récepteurs et transport des sidérophores

Dans un milieu carencé en fer les bactéries vont synthétiser des sidérophores et les libérer dans le milieu afin qu'ils fixent les ions ferriques. Le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore est trop large pour passer librement à travers la membrane externe. Alors pour ce faire, la première étape de l'internalisation du complexe nécessite un récepteur qui fixe avec une forte affinité le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore (Andrews *et al.*, 2003; Braun *et al.*, 1998) (Figure 8). Tous les récepteurs de sidérophores actuellement connus sont apparentés (Koster, 2001) et les structures cristallines de FepA (récepteur de l'entérobactine) (Buchanan *et al.*, 1999), FecA (récepteur du citrate ferrique) (Ferguson *et al.*, 2002), et FhuA (récepteur du ferrichrome) (Ferguson *et al.*, 1998) ont été déterminées. Ils sont formés d'un bouchon à leur extrémité N-terminale, suivi d'un tonneau- $\beta$ , formé de 22 feuilletts  $\beta$ , à leur extrémité C-terminale. La liaison du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore à son récepteur induit l'ouverture du bouchon et le passage du complexe vers le périplasme. Certains

bactériophages et antibiotiques prennent pour cible les récepteurs des sidérophores afin de pénétrer dans la cellule, c'est pourquoi la synthèse de ces récepteurs est généralement induite uniquement lors d'une carence en fer dans le milieu.

Une bactérie peut posséder de nombreux récepteurs pour les sidérophores, chacun possédant une forte affinité pour son ligand (Andrews *et al.*, 2003). Bien que les récepteurs soient très spécifiques à leur ligand, les systèmes de transports à travers le périplasma et la membrane interne sont identiques pour tous les hydroxamates ferriques (Braun *et al.*, 1998). Cette spécificité du récepteur peut être expliquée comme suit: l'exacte complémentarité entre le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore et son récepteur induit une forte spécificité et une forte affinité qui sont avantageuses pour extraire les rares complexes  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore du milieu et les concentrer au niveau de la membrane cellulaire. Par exemple les récepteurs FhuA, FhuE et IutA reconnaissent respectivement les ferrichromes, les coprogènes et les aérobactines. Une fois dans le périplasma c'est la même protéine périplasmique, FhuD, et le même ABC transporteur, FhuB-FhuC, qui transportent le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore vers le cytosol (Figure 8) (Braun, 2001).

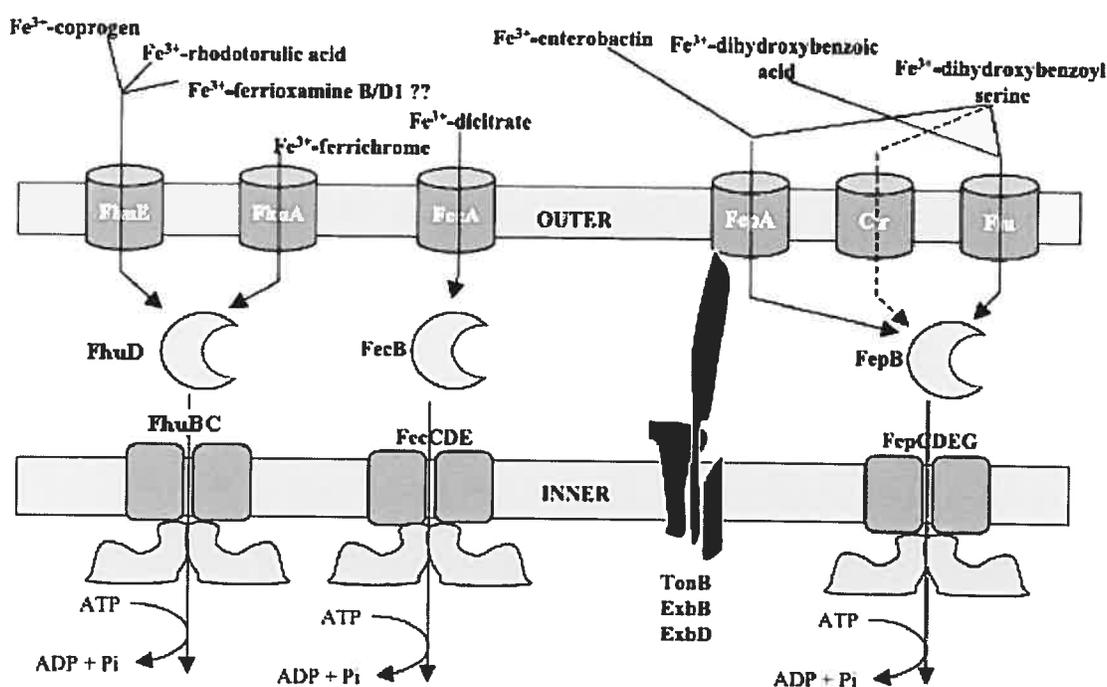
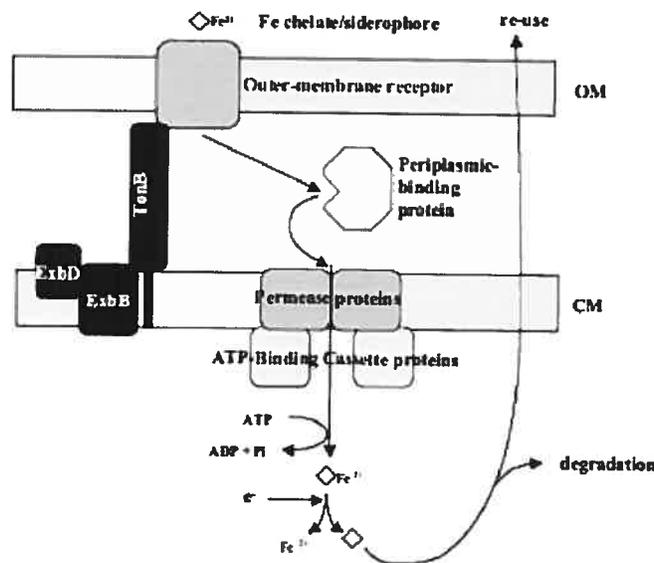


Figure 8 : Systèmes d'acquisition des sidérophores par *E. coli* (Andrews *et al.*, 2003).

### 2.3.1.3. Libération du fer du complexe $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore

Trois mécanismes différents permettent la libération du fer du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore (Crosa, 1989):

1. Le sidérophore apporte le fer à la membrane externe mais ne pénètre pas dans le cytosol de la cellule.
2. Le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore pénètre dans la cellule où le ligand se décompose permettant ainsi la libération du fer.
3. Le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore pénètre dans la cellule. Le fer est libéré après une réduction du fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  en fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  résultant en une dissociation des deux membres due à la faible affinité du sidérophore pour les ions  $\text{Fe}^{2+}$ . Le sidérophore ne subit pas forcément de modifications chimiques (Figure 9).



**Figure 9 :** Représentation schématique de l'acquisition du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore qui va par la suite être dissocié dans le cytoplasme grâce à la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  (Andrews *et al.*, 2003).

De nombreuses enzymes avec une activité de réduction du fer ont été identifiées chez les bactéries (par exemple les sulfites réductases ou les flavohémoglobines) mais il n'y a pas encore d'évidence concrète qui indique que ces enzymes ont un rôle physiologique majeur dans le métabolisme du fer (Andrews *et al.*, 2003; Fontecave *et al.*, 1994). L'énergie nécessaire à la translocation à travers la membrane externe du complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -sidérophore est fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD.

Il n'est pas rare pour une bactérie d'utiliser des sidérophores exogènes (synthétisés par d'autres micro-organismes) afin de diminuer la quantité de fer libre pour ses compétiteurs et d'éviter les effets bactériostatiques dus aux sidérophores exogènes (Andrews *et al.*, 2003). Par exemple *E. coli* est capable d'utiliser comme source de fer son sidérophore endogène l'entérobactine ainsi que le ferrichrome (un sidérophore synthétisé par un champignon). *E. coli* possède des récepteurs spécifiques pour chacun de ces deux sidérophores.

Certains antibiotiques sont des analogues des sidérophores comme l'albomycine, un dérivé du ferrichrome. Il a été prouvé que la structure cristalline de l'albomycine se fixe à FhuA, le récepteur du ferrichrome, sur la membrane externe (Ferguson *et al.*, 2000). Le transport actif de l'albomycine, via le système de transport du ferrichrome, diminue la CMI à un niveau tel qu'il devient un des antibiotiques les plus efficaces contre les bactéries à Gram négatif ainsi que les bactéries à Gram positif (Braun, 2001).

## 2.3.2. Les récepteurs de la transferrine

### 2.3.2.1. Généralités

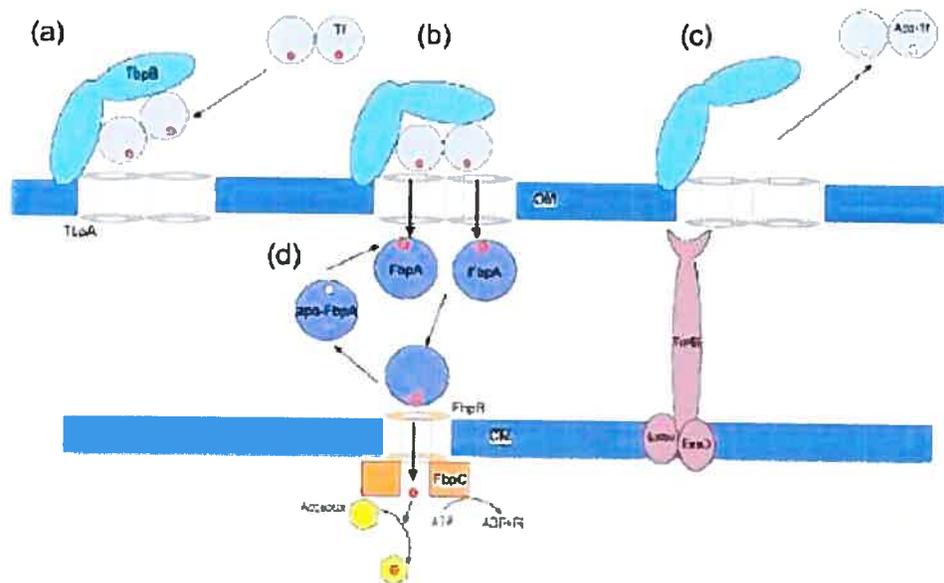
Les transferrines sont des glycoprotéines monomériques de 80 kDa retrouvées dans le sérum (25 - 44  $\mu$ M dans le sérum humain). Leur rôle est de fixer le fer et de le transporter aux différentes cellules de l'hôte via les fluides extracellulaires, réduisant ainsi la concentration de fer libre pour les micro-organismes. Elles sont composées de deux lobes identiques pouvant chacun fixer un ion ferrique (Baker *et al.*, 2002).

Certaines bactéries sont capables d'utiliser les ions ferriques transportés par les transferrines, leur conférant ainsi un avantage par rapport aux autres bactéries. Des bactéries à Gram négatif, comme les *Pasteurellaceae* ou les *Neisseriaceae*, synthétisent au niveau de leur membrane externe des récepteurs pour la transferrine (Cornelissen and Sparling, 1994; Gray-Owen and Schryvers, 1996). L'expression de ces récepteurs ainsi que leur activité de liaison sont augmentées lors d'une limitation du fer dans le milieu (Ogunnariwo and Schryvers, 1990; Ogunnariwo *et al.*, 1991).

### 2.3.2.2. Récepteurs de la transferrine et mécanismes d'acquisition

Les récepteurs pour la transferrine sont composés de deux sous-unités: TbpA (environ 100 kDa) et TbpB (entre 65 et 85 kDa). Les gènes codant pour ces protéines, *tbpA* et *tbpB*, sont arrangés sous forme d'un opéron (Legrain *et al.*, 1993). TbpA possède des homologues de séquence avec les récepteurs de sidérophores (Legrain *et al.*, 1993). Tout comme l'acquisition des sidérophores, l'acquisition de la transferrine est dépendante du complexe TonB-ExbB-ExbD et de la force proton motrice.

Le fait qu'un mutant déficient en TbpB soit capable d'utiliser la transferrine comme source de fer (avec moins d'efficacité que la souche sauvage) indique que TbpA est capable d'induire seule tout le processus d'internalisation du fer ferrique et qu'elle possède la boîte TonB (Anderson *et al.*, 1994). TbpB est une lipoprotéine ancrée, par son extrémité N-terminale, au feuillet externe de la membrane externe. Il a été suggéré que TbpB augmenterait l'affinité du récepteur pour la transferrine et faciliterait la discrimination entre la protéine chargée en fer et la non chargée (Cornelissen and Sparling, 1994; Retzer *et al.*, 1998).



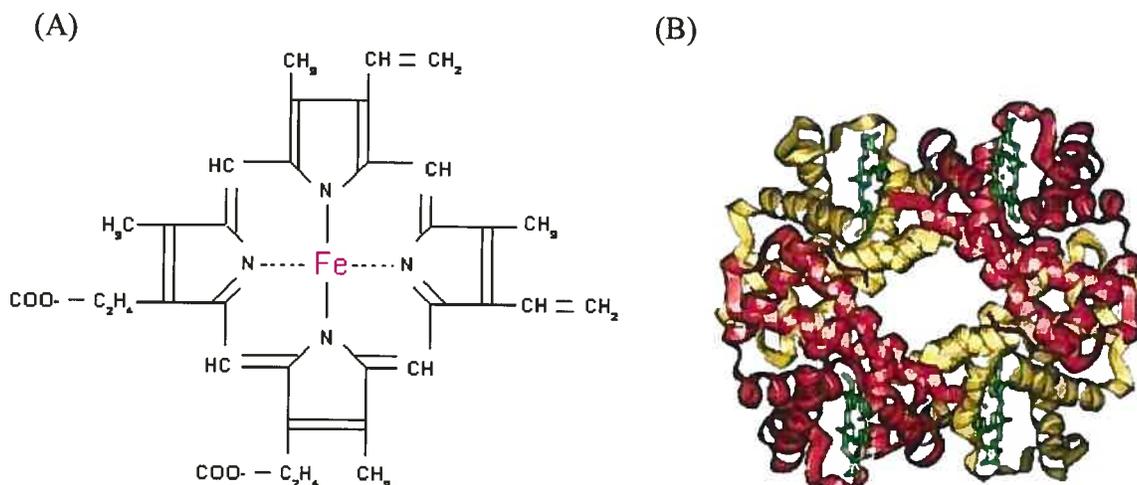
**Figure 10 :** Schéma de l'acquisition de la transferrine par une bactérie à Gram négatif. (a) la transferrine est reconnue de par le récepteur TbpB et présentée à TbpA. (b) Le fer ferrique est libéré de la transferrine, traverse la membrane externe, est pris en charge par FbpA, traverse le périplasma, se fixe à l'ABC transporteur FpbB-FpbC et pour finir traverse la membrane cytoplasmique. (c) Après la libération du fer ferrique, la transferrine est relarguée dans le milieu (Ratledge and Dover, 2000).

Au niveau de la membrane externe de la bactérie le fer ferrique est libéré de la transferrine et cette dernière est relarguée dans le milieu afin de ne pas s'accumuler dans le cytoplasme bactérien (Schryvers and Morris, 1988). Une fois que le fer ferrique a traversé la membrane externe il est pris en charge par une protéine périplasmique (FbpA) (Chen *et al.*, 1993; Kirby *et al.*, 1997) qui va l'emmenner à travers le périplasma jusqu'à l'ABC transporteur de la membrane cytoplasmique. Pour finir l'ABC transporteur, composé d'une perméase FpbB et d'une ATPase FpbC, transporte le fer ferrique à travers la membrane cytoplasmique jusqu'au cytoplasme (Figure 10) (Adhikari *et al.*, 1996; Khun *et al.*, 1998).

### 2.3.3. Les récepteurs de l'hème et les hémophores

#### 2.3.3.1. Généralités

Le terme hème désigne la forme réduite ( $\text{Fe}^{2+}$ ) de l'ion protoporphyrine IX et le terme hémine fait référence à la forme oxydée ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de la molécule. Généralement le mot hème est utilisé pour désigner l'ion protoporphyrine IX sous ses deux formes d'oxydation (Figure 11A) (Genco and Dixon, 2001; Lee, 1995). L'hème est la source de fer la plus abondante chez l'hôte, il n'est donc pas surprenant que les bactéries pathogènes puissent l'utiliser comme source de fer. Étant donné que l'hème libre est très toxique (c'est une molécule hydrophobe qui déstabilise les membranes et entraîne des réactions de réduction non-enzymatiques) chez l'hôte, il est lié à diverses protéines. Dans le sérum il est principalement lié à l'hémoglobine mais aussi à l'hémopexine, à l'albumine ou encore à des lipoprotéines (Camejo *et al.*, 1998). Cependant, *in vitro*, l'hème est une source de fer pour de nombreuses espèces bactériennes (Wandersman and Delepelaire, 2004). L'hémoglobine est retrouvée dans les globules rouges où elle a pour fonction le transport de l'oxygène. L'hémoglobine est constituée de quatre sous-unités, deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$ , qui fixent chacune un groupement hème (Figure 11B) (Perutz, 1960).



**Figure 11 :** (A) Structure de l'hème et (B) Structure tridimensionnelle de l'hémoglobine. (Tiré de <http://en.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin>)

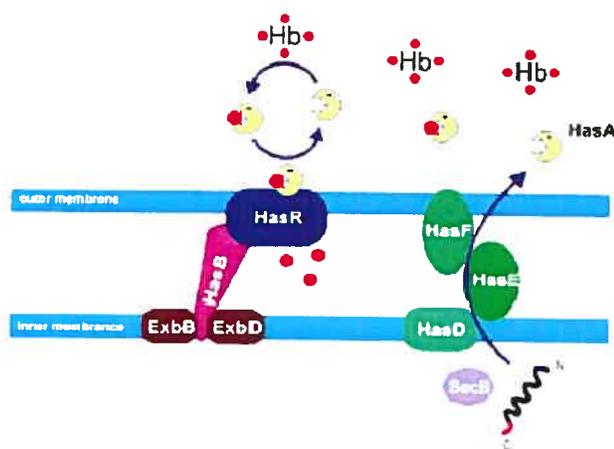
### 2.3.3.2. Récepteurs de l'hème et mécanismes d'acquisition

Les bactéries peuvent utiliser l'hème, l'hémoglobine ou le complexe hème-hémopexine comme source directe de fer (Andrews *et al.*, 2003). Ainsi, l'hème ou le complexe hémique va se fixer sur des récepteurs de la membrane externe. L'hème est pris en charge par les récepteurs membranaires et est transporté vers le périplasme. Par contre les protéines contenant de l'hème vont être déchargées à la surface cellulaire et seul l'hème est transporté dans le périplasme (Wandersman and Stojiljkovic, 2000). La présence d'un gène *tonB* (Jarosik *et al.*, 1994), d'une boîte TonB sur le récepteur (Stojiljkovic and Hantke, 1992; Stojiljkovic *et al.*, 1995), et des protéines auxiliaires ExbB et ExbD (Jarosik and Hansen, 1995) impliquent que le transport de l'hème à travers la membrane externe est dépendant du complexe TonB-ExbB-ExbD. Une fois dans le périplasme, l'hème est transporté à travers la membrane cytoplasmique par une perméase périplasmique (Lee, 1995). Il existe de nombreux récepteurs impliqués dans la fixation des composés hémiques à la surface bactérienne (Ratledge and Dover, 2000) et ils possèdent une structure générale fortement similaire à celle des récepteurs de sidérophores (Wandersman and Stojiljkovic, 2000). Les récepteurs de composés hémiques sont divisés en deux groupes en fonction de leur spécificité au substrat. Les pathogènes qui se sont fortement adaptés à leur hôte, comme *Haemophilus influenzae* ou *Neisseria*

*meningitidis*, synthétisent des récepteurs très spécifiques à la source hémique présente dans leur niche écologique. Alors que les autres bactéries, comme *Yersinia pestis* ou *Yersinia enterocolitica*, possèdent des systèmes d'acquisition de l'hème pouvant récupérer le fer à partir de nombreuses sources (Ratledge and Dover, 2000; Wandersman and Stojiljkovic, 2000).

### 2.3.3.3. Les hémophores

Afin d'acquérir l'hème extracellulaire, certaines bactéries à Gram négatif ont développé un système d'acquisition semblable aux sidérophores: les hémophores. Leur existence fut découverte chez *Serratia marcescens*: grâce à une protéine sécrétée dans le milieu (HasA), *S. marcescens* est capable d'utiliser l'hème libre et



**Figure 12 :** Schéma de l'acquisition de l'hème par des hémophores chez *Serratia marcescens*. En premier les hémophores sont sécrétés dans le milieu extracellulaire grâce à HasDEF et SecB. Par la suite les hémophores fixent l'hème et le transportent vers le récepteur HasR. L'énergie nécessaire au passage de l'hème à travers la membrane externe est fournie par le complexe HasB-ExbB-ExbD (Wandersman and Delepelaire, 2004).

l'hème lié à l'hémoglobine. De plus l'acquisition de ces composés est inhibée chez un mutant  $\Delta hasA$  par des anticorps anti-HasA (Letoffe *et al.*, 1994a). Les hémophores sont des protéines extracellulaires spécialisées dans l'acquisition et le transport de l'hème vers des récepteurs membranaires spécifiques (Figure 12). Ils sont sécrétés dans le milieu grâce à un ABC transporteur (Letoffe *et al.*, 1994b). Comme la plupart des protéines sécrétées par un ABC transporteur (HasDEF

pour *S. marcescens*), les hémophores possèdent un signal de sécrétion à leur extrémité C-terminale qui est maintenu accessible grâce à une chaperonne, SecB (Delepelaire and Wandersman, 1998). Le signal de sécrétion interagit avec la protéine ABC afin d'induire l'activité ATPasique de cette dernière. Une fois dans le milieu, les hémophores extraient l'hème des hémoglobines et des hémopexines et le transportent vers des récepteurs membranaires spécifiques (HasR pour *S.*

*marcescens*) (Ghigo *et al.*, 1997) afin qu'il soit internalisé. Le récepteur possède une double fonction: il promeut l'acquisition de l'hème libre et de l'hème lié aux hémophores. Le deuxième système d'acquisition est plus efficace et il permet la croissance de la bactérie à une concentration d'hème moins élevée (Ghigo *et al.*, 1997). En 2001 Paquelin et ses collaborateurs caractérisèrent, chez *S. marcescens*, une protéine homologue à TonB, HasB, impliquée uniquement dans l'acquisition de l'hème (Paquelin *et al.*, 2001). Cette découverte indique que l'énergie nécessaire à la translocation à travers la membrane externe de l'hème est fournie par la force proton motrice à travers le complexe HasB/TonB-ExbB-ExbD.

## 2.4. Contrôle de l'expression des gènes par le fer

### 2.4.1. Généralités

Afin de combattre le manque de fer les bactéries ont développé de nombreuses stratégies. En plus de la synthèse de sidérophores et de protéines permettant l'acquisition et le transport du fer vers le cytosol, les bactéries vont exprimer de nombreux gènes qui sont silencieux lors de leur croissance dans un milieu contenant du fer (Crosa, 1997). Parmi ces gènes, on peut citer les gènes codant pour: des mécanismes métaboliques (Hantke, 1987; Stojiljkovic *et al.*, 1994), la chimotaxie (Karjalainen *et al.*, 1991), la défense contre les radicaux oxygénés (Niederhoffer *et al.*, 1990) ou encore la production d'une toxine ou d'autres facteurs de virulence (Litwin and Calderwood, 1993). L'expression des facteurs de virulence lors d'une privation de fer n'est pas surprenante étant donné que le fer est généralement en quantité limitante dans les tissus et les fluides de l'hôte. Dans une bactérie, un nombre considérable de gènes sont uniquement régulés par l'absence de fer; de plus ces gènes sont exprimés (ou réprimés) de façon très coordonnée, suggérant la présence d'un régulateur commun. Ce régulateur a été mis en évidence grâce à un mutant d'*E. coli* qui exprimait, de façon constitutive, tous les gènes généralement inhibés par le fer (production de sidérophores ou biosynthèse de protéines de la membrane externe). Le régulateur a été nommé Fur («Ferric uptake régulation») (Hantke, 1981). Chez *E. coli* la protéine Fur est un homodimère

composé de sous-unités de 17 kDa chacune (Coy and Neilands, 1991); elle est produit par le gène *fur* (Hantke, 1984; Schaffer *et al.*, 1985).

#### 2.4.2. Modes d'actions de Fur et la boîte Fur

Fur agit comme un répresseur positif. Dans un milieu riche en fer chaque sous-unité de l'homodimère fixe un ion  $\text{Fe}^{2+}$  (le co-répresseur) ce qui augmente l'affinité de Fur pour une séquence cible d'ADN (la boîte Fur) et inhibe la transcription de tous les gènes et opérons régulés par le fer. Par contre en milieu carencé en fer,  $\text{Fe}^{2+}$  est libéré et la répression est levée (Figure 13) (Bagg and Neilands, 1987). Une sous-unité Fur peut être divisée en deux domaines: l'extrémité N-terminale qui permet la fixation à l'ADN et l'extrémité C-terminale, riche en résidus histidine, qui semble fixer le co-répresseur  $\text{Fe}^{2+}$  et induire la dimérisation (Coy and Neilands, 1991; Stojiljkovic and Hantke, 1995).

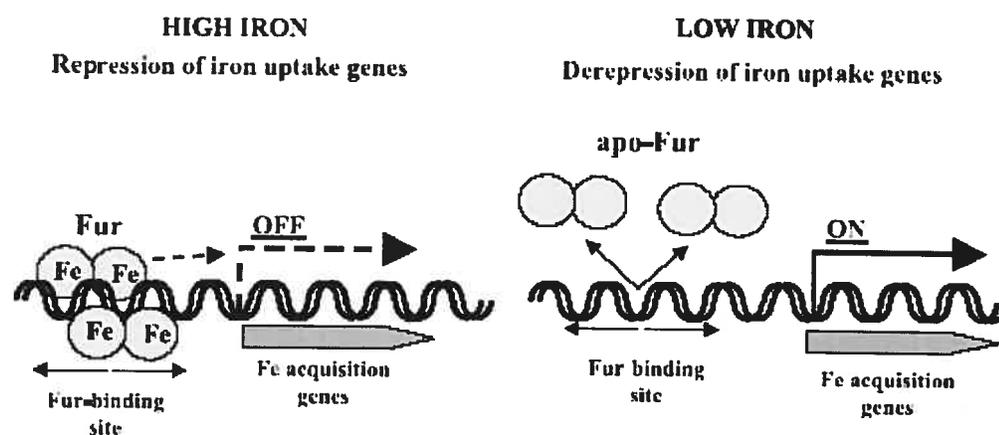


Figure 13 : Schéma de la répression des gènes par Fur (Andrews *et al.*, 2003).

Généralement le complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur va se fixer au niveau du promoteur des gènes réprimés entre les régions -35 à -10 empêchant la fixation de l'ARN polymérase et donc la transcription. Grâce à l'alignement multiple de séquences d'opérateurs régulés par Fur, les sites de fixation de Fur ont été définis comme étant une séquence consensus de 19 pb (5'-GATAATGATAATCATTATC-3') appelée la boîte Fur (Calderwood and Mekalanos, 1987; Stojiljkovic *et al.*, 1994). Il fut proposé

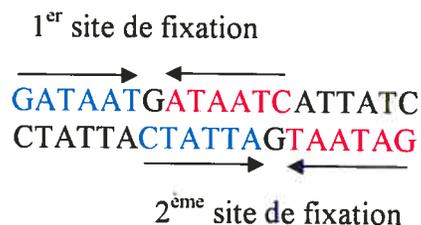
que Fur reconnaîtrait la séquence consensus en tant que deux séquences répétées, inversées de 9 pb, séparées par une paire de base (Bagg and Neilands, 1987).



Par la suite, grâce à des expériences d’empreinte à la DNase et de microscopie électronique, il a été suggéré que la séquence consensus est reconnue comme trois unités adjacentes, hexamériques 5’- GATAAT-3’ (Escolar *et al.*, 1998). Cette même étude démontra qu’un minimum de trois hexamères est nécessaire à la fixation initiale de Fur et des hexamères supplémentaires augmentent l’affinité de Fur pour la séquence nucléique. La séquence consensus contient deux hexamères dans l’orientation «forward» qui sont séparés par une paire de base du troisième hexamère qui est en orientation inverse (Escolar *et al.*, 1998).



En 2002, un nouveau modèle pour l’interaction entre Fur et l’ADN a été proposé: la séquence consensus de 19 pb est constituée de deux séquences de 13 pb superposées. Chaque séquence de 13 pb est elle-même composée d’un motif ‘6-1-6’ (deux hexamères inversés interrompus par un nucléotide) (Lavrrar *et al.*, 2002). Cet arrangement permettrait à deux dimères Fur d’interagir avec le site de fixation en tant que deux dimères superposés et positionnés face à face sur la double hélice d’ADN.



### 2.4.3. Le régulation du gène *fur*

Le gène *fur* fait partie d'un opéron bicistronique, il se trouve en aval du gène *fldA*. Le gène *fldA* code pour la flavodoxine, une protéine contenant de la flavine et impliquée dans des réactions de réduction. Il se peut que la flavodoxine joue un rôle dans le maintien de la concentration du fer libre, sous sa forme réduite, dans le cytosol. La flavodoxine pourrait jouer un rôle important pour la protéine Fur en lui fournissant son co-répresseur  $Fe^{2+}$ . Le gène *fur* possède son propre promoteur (Andrews *et al.*, 2003).

En 1988 il a été démontré que le gène *fur* est modérément autorégulé par Fur (grâce à une boîte *fur* située dans la région intercistronique) et son expression est stimulée par un système AMPc-CAP (De Lorenzo *et al.*, 1988). En 1999, une étude de Zheng et ses collaborateurs a démontré que le métabolisme du fer peut être régulé par le stress oxydatif. Ainsi l'opéron *fldA-fur* est activé par un système SoxRS en réponse à un stress oxydatif et le promoteur du gène *fur* est induit par OxyR en réponse à un stress causé par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Zheng *et al.*, 1999). Les découvertes précédentes suggèrent que la régulation de Fur est très complexe.

### 2.4.4. Fur chez les autres bactéries

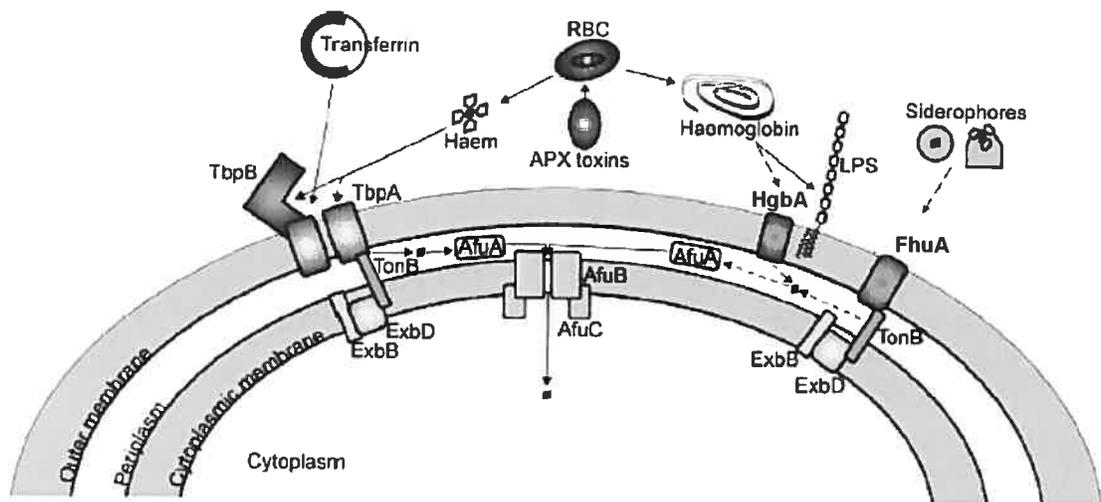
À la suite de la découverte initiale de Fur chez *E. coli* (Hantke, 1981), plusieurs homologues de Fur responsables de l'expression de gènes par le fer furent retrouvés chez de nombreuses bactéries à Gram négatif ainsi qu'à Gram positif (Crosa, 1997). Le gène *fur* est considéré comme essentiel pour certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* (Venturi *et al.*, 1995) et *Neisseria gonorrhoeae* (Berish *et al.*, 1993). Par contre il semble que *E. coli*, *Vibrio spp* et *Yersinia pestis* peuvent s'en passer (Vasil and Ochsner, 1999). Cette différence suggère que le fer est essentiel à la respiration des espèces pour lesquelles *fur* est indispensable (Vasil and Ochsner, 1999). Il est clair que Fur n'est pas une protéine de répression parmi tant d'autres mais probablement une des protéines majeures de la régulation chez la plupart des bactéries à Gram négatif.

#### 2.4.5. DtxR

De nombreuses bactéries à Gram positif produisent une protéine avec des fonctions équivalentes au répresseur Fur: la protéine DxtR. Elle fut tout d'abord caractérisée chez *Corynebacterium diphtheriae* en tant que protéine contrôlant les gènes d'acquisition du fer et les gènes de virulence (Boyd *et al.*, 1990; Fourel *et al.*, 1989). Au départ, il a été suggéré que Fur était présent chez les bactéries à Gram négatif et DxtR chez les bactéries à Gram positif mais finalement il a été démontré que la plupart des microorganismes possèdent de nombreuses protéines Fur-like et DxtR-like. Tout comme Fur, DxtR utilise  $Fe^{2+}$  comme co-répresseur. C'est une protéine dimérique de 25 kDa qui ne reconnaît pas la boîte Fur (Schmitt *et al.*, 1992) mais une autre séquence palindromique (Tao and Murphy, 1992).

### 3. Acquisition du fer par *A. pleuropneumoniae*

Comme *A. pleuropneumoniae* se retrouve essentiellement dans le tractus respiratoire inférieur où les nutriments essentiels pour sa croissance comme le fer sont restreints, elle a développé de nombreux systèmes d'acquisition du fer (Haesebrouck *et al.*, 2004). Il a été démontré que dans des conditions de limitation en fer *A. pleuropneumoniae* peut utiliser la transferrine porcine (Gonzalez *et al.*, 1990), l'hémoglobine et l'hème (Bélanger *et al.*, 1995; Deneer and Potter, 1989b), ainsi que des sidérophores exogènes comme le ferrichrome (Diarra *et al.*, 1996). Ces caractéristiques confirment l'expression de récepteurs spécifiques à ces sources de fer au niveau de la membrane externe d'*A. pleuropneumoniae* (Figure 14) (Jacques, 2004).



**Figure 14 :** Schéma des différents systèmes d'acquisition du fer d' *A. pleuropneumoniae* (Adapté de (Bossé *et al.*, 2002).

### 3.1. Le complexe TonB-ExbB-ExbD d'*A. pleuropneumoniae*

L'acquisition, *in vivo*, du fer par *A. pleuropneumoniae* nécessite la présence d'un système TonB fonctionnel (Tonpitak *et al.*, 2000). Dans une étude de STM, Sheehan et ses collaborateurs (Sheehan *et al.*, 2003) ont identifié deux souches atténuées portant des mutations dans ce qui semblerait être deux versions différentes d'un gène TonB: l'un est le gène identifié par Tonpitak et ses collaborateurs (Tonpitak *et al.*, 2000) et l'autre est un nouveau gène. Le premier système découvert a été dénommé *tonB1* et le deuxième *tonB2*. En 2004, Beddek et ses collaborateurs (Beddek *et al.*, 2004) ont déterminé le rôle dans l'acquisition du fer et dans la virulence des deux systèmes TonB:

- Contrairement à l'ordre des gènes du système *tonB1*, *tonB-exbB-exbD*, l'ordre des gènes du système *tonB2*, *exbB-exbD-tonB*, est très homologue à celui d'autres *Pasteurellaceae* (Elkins *et al.*, 1998). Cette découverte suggère que le système *tonB2* est le système indigène d'*A. pleuropneumoniae* et que le système *tonB1* aurait été acquis par transfère latéral.
- L'expression des deux systèmes est augmentée dans un milieu restreint en fer.
- TonB2, mais pas TonB1, est essentiel pour l'assimilation du fer associé à l'hémine, l'hémoglobine porcine et le ferrichrome. De plus, le gène *tonB1* ne complémente pas une mutation dans le gène *tonB2*. Donc, le système *tonB1* ne semble pas être nécessaire à l'acquisition de ces sources de fer.
- Les deux systèmes semblent être impliqués dans l'acquisition de la transferrine porcine mais le mécanisme d'acquisition n'est pas encore connu.
- Lors d'une infection expérimentale, la capacité du mutant *tonB2* à induire la pleuropneumonie est très atténuée alors que le mutant *tonB1* est aussi virulent que la souche mère. Ainsi, TonB2 semble jouer un rôle plus important dans la virulence que TonB1.
- Pour finir, les auteurs ont supposé que l'acquisition du système *tonB1* par *A. pleuropneumoniae* pourrait lui conférer des avantages biologiques de par sa capacité à acquérir la transferrine, mais la protéine TonB1 n'interviendrait pas ou presque pas dans ce processus.

### 3.2. Les récepteurs de la transferrine

Des récepteurs pour la transferrine ont été décrits chez *A. pleuropneumoniae* (Gerlach *et al.*, 1992a; Gonzalez *et al.*, 1995). Ces récepteurs sont très spécifiques à leur substrat: ils permettent d'utiliser comme unique source de fer, la transferrine porcine mais pas la transferrine provenant d'autres animaux (D'Silva *et al.*, 1995; Niven *et al.*, 1989). L'incapacité d'*A. pleuropneumoniae* à infecter d'autres animaux que le porc peut être due, du moins en partie, au fait qu'*A. pleuropneumoniae* est incapable d'utiliser la transferrine provenant d'autres origines (Gonzalez *et al.*, 1990).

Dans des conditions limitantes en fer *A. pleuropneumoniae*, tout comme les autres membres de la famille des *Pasteurellaceae*, produit deux protéines d'acquisition de la transferrine: TbpA et TbpB. TbpA est une protéine d'environ 100 kDa qui forme un canal transmembranaire permettant le passage du fer à travers la membrane externe (Gonzalez *et al.*, 1995) (Daban *et al.*, 1996). TbpB est une lipoprotéine d'environ 60 kDa qui semble être ancrée au niveau de la membrane externe par son extrémité N-terminale (Gerlach *et al.*, 1992a; Gonzalez *et al.*, 1995). Des analyses génétiques ont permis d'identifier les gènes codant pour TbpA et TbpB. Ces gènes forment un opéron: *tbpBA* (Gerlach *et al.*, 1992b; Gonzalez *et al.*, 1995). Une boîte Fur a été découverte en amont de l'opéron *tbp*, indiquant que les gènes *tbp* sont régulés par le fer environnant (Gonzalez *et al.*, 1995).

Afin de déterminer le rôle de TbpA et TbpB dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae*, Baltes et ses collaborateurs (Baltes *et al.*, 2002) ont construit des mutants *tpbA*, *tpbB* et *tpbAB*. Suite à des infections expérimentales il a clairement été démontré, par des évaluations cliniques, de la sérologie et des analyses post-mortem, une diminution de la virulence des trois mutants. Il semblerait qu'aucun des mutants n'ait été capable de coloniser les poumons suffisamment longtemps afin d'induire une réponse immunitaire détectable. Ces résultats indiquent que les récepteurs pour la transferrine sont des facteurs de virulence importants pour *A. pleuropneumoniae* et que les autres systèmes d'acquisition du fer présents chez *A. pleuropneumoniae* sont incapables de remplacer TbpA et TbpB (Baltes *et al.*, 2002).

Comme la plupart des systèmes d'acquisition du fer, l'acquisition de la transferrine par *A. pleuropneumoniae* est dépendante du complexe TonB-ExbB-ExbD. Chez *A. pleuropneumoniae*, les gènes codant pour les protéines fournissant l'énergie, TonB, ExbB et ExbD, et les gènes codant pour les transporteurs TbpA et TbpB, sont organisés dans le même opéron: *tonB exbB exbD tbpB tbpA* (Tonpitak *et al.*, 2000). La co-transcription de ces gènes, lors d'une carence en fer, indique qu'ils forment une unité fonctionnelle dans le transfert des ions ferriques fournis par la transferrine.

Après s'être détaché de la transferrine et avoir traversé la membrane externe, l'ion ferrique entre dans le cytoplasme grâce à un système de transport constitué d'une protéine périplasmique et d'un ABC transporteur: le système Afu (*Actinobacillus* ferrous uptake) (Chin *et al.*, 1996). L'opéron *afu* est localisé en amont de l'opéron *apxICABD*, mais *afu* est transcrit dans le sens opposé du gène codant pour l'hémolysine: *apxIC*. L'opéron *afu* est composé de trois gènes: *afuA*, *afuB*, *afuC* codant respectivement pour une protéine périplasmique liant les ions ferriques, pour une perméase intégrée dans la membrane cytoplasmique et pour une ATPase (Chin *et al.*, 1996). Des systèmes similaires à Afu sont retrouvés chez *Serratia marcescens* (SfuABC) (Angerer *et al.*, 1990; Angerer *et al.*, 1992), chez *Haemophilus influenzae* (HitABC) (Adhikari *et al.*, 1995; Sanders *et al.*, 1994) et chez *Neisseria gonorrhoeae* (FbpABC) (Adhikari *et al.*, 1996; Berish *et al.*, 1990).

### 3.3. Les sidérophores et le système Fhu

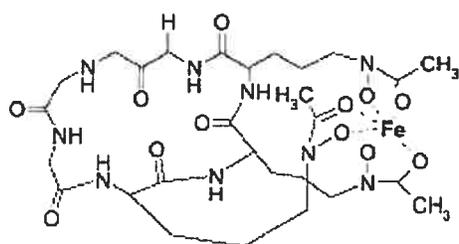
#### 3.3.1. Les sidérophores

La synthèse de sidérophores par *A. pleuropneumoniae* a intrigué de nombreux groupes de recherche. Deneer et Potter (Deneer and Potter, 1989b) ainsi que Niven et ses collaborateurs (Niven *et al.*, 1989) ont démontré que même en milieu carencé en fer *A. pleuropneumoniae* n'est pas capable de synthétiser des sidérophores de type hydroxamate ou catéchol (Deneer and Potter, 1989b; Niven *et al.*, 1989). Toutefois, Diarra et ses collaborateurs (Diarra *et al.*, 1996) ont démontré qu'une souche du serotype 1 (FMV 87-682) et une souche du sérotype 5 (2245) sont capables d'excréter, en réponse à un stress lié au fer, un chélateur de fer. Ces composants

n'étaient ni de type phénolate, ni de type hydroxamate. Dans cette même étude ils ont démontré, grâce à des tests de promotion, que la plupart des souches d' *A. pleuropneumoniae* peuvent acquérir le fer des sidérophores de type hydroxamate ou catéchol. Ils ont également prouvé que tous les sérotypes d' *A. pleuropneumoniae* (sauf une souche de champ du sérotype 5) sont capables d'utiliser comme unique source de fer un sidérophore exogène de type hydroxamate: le ferrichrome (Diarra *et al.*, 1996).

### 3.3.2. FhuA d' *E. coli*

Le ferrichrome est un sidérophore de type hydroxamate synthétisé par des champignons dont ceux du genre *Ustilago sphaerogena* (Figure 15). De nombreuses



**Figure 15 :** Structure du ferrichrome (Andrews *et al.*, 2003).

bactéries sont capables d'utiliser le ferrichrome comme source de fer. Parmi ces bactéries on retrouve *E. coli* qui possède un récepteur pour le ferrichrome sur sa membrane externe: FhuA (Coulton, 1982; Fecker and Braun, 1983). FhuA d' *E. coli* est également le récepteur pour les phages T1,

T5,  $\Phi$ 80 et UC-1, pour la toxine bactérienne colicine M (Braun and Wolff, 1973) et pour quelques antibiotiques comme l'albomycine (un analogue structurale du ferrichrome) (Ferguson *et al.*, 2000) et la rifamycine (Ferguson *et al.*, 2001).

Le système *fhu* d' *E. coli* est constitué de quatre gènes *fhuA*, *fhuC*, *fhuD* et *fhuB* (Fecker and Braun, 1983). Le gène *fhuA* code pour le récepteur FhuA (79 kDa), *fhuD* code pour une protéine périplasmique de 31 kDa (FhuD) et pour finir *fhuC* et *fhuB* codent respectivement pour deux protéines ancrées dans la membrane cytoplasmique: FhuC (29 kDa) et FhuB (41 kDa). FhuC et FhuB permettent le transport de nombreux composés  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroxamate du périplasm au cytoplasme (Figure16) (Fecker and Braun, 1983).

Une meilleure connaissance de la chimie des protéines a permis d'élucider la structure bi- et tridimensionnelle de FhuA d' *E. coli*. FhuA est une protéine monomérique de 723 acides aminés. Sa structure tridimensionnelle est formée d'un

bouchon à l'extrémité N-terminale (résidus 1 à 160) suivi d'un tonneau  $\beta$  à l'extrémité C-terminale (résidus 161 à 723). Le tonneau est formé de 22 feuillettes  $\beta$  antiparallèles et transmembranaires ( $\beta 1$  à  $\beta 22$ ). Ces feuillettes sont reliés à la surface par 11 boucles (L1 à L11) et dans le périplaste par 10 tours (T1 à T10) (Figure 17) (Ferguson *et al.*, 1998). Au cours de cette même année, il a été démontré que la fixation du ferrichrome sur FhuA induit des changements conformationnels dans le périplaste qui permettent l'interaction de FhuA avec le complexe TonB-ExbB-ExbD (Locher *et al.*, 1998). Étant donné que Diarra et ses collaborateurs (Diarra *et al.*, 1996) ont démontré que tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* sont capables d'utiliser comme unique source de fer le ferrichrome (Diarra *et al.*, 1996), on peut supposer qu'*A. pleuropneumoniae* possède sur sa membrane externe un récepteur homologue à FhuA.

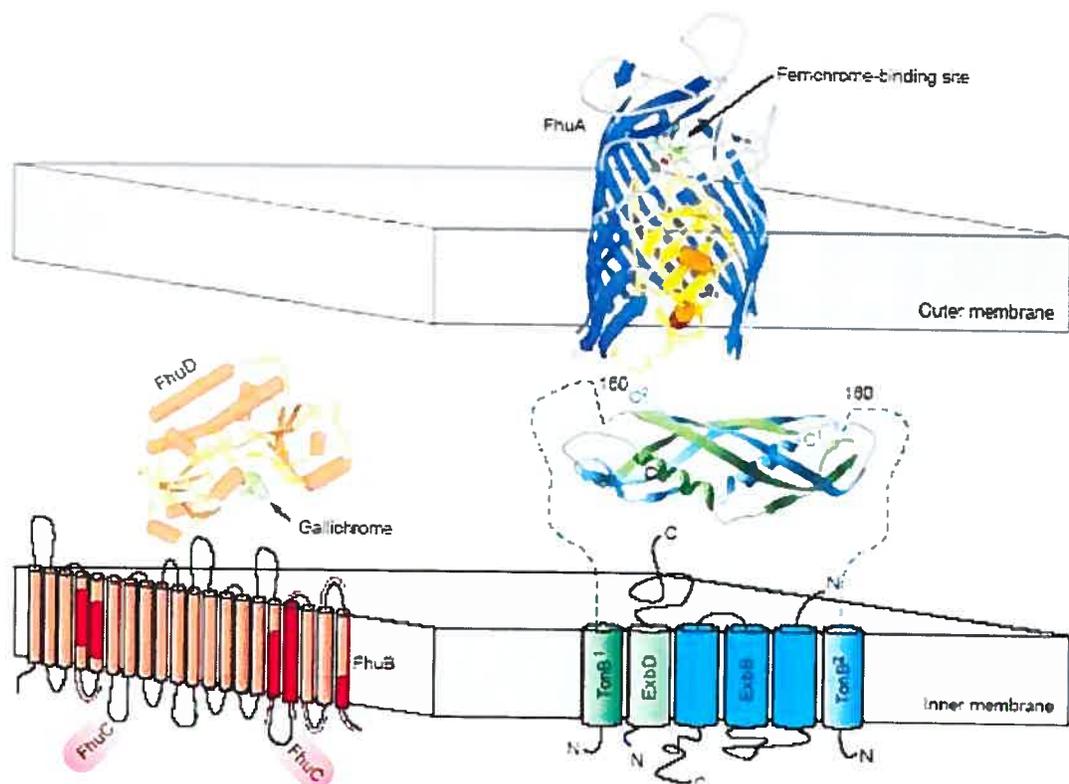
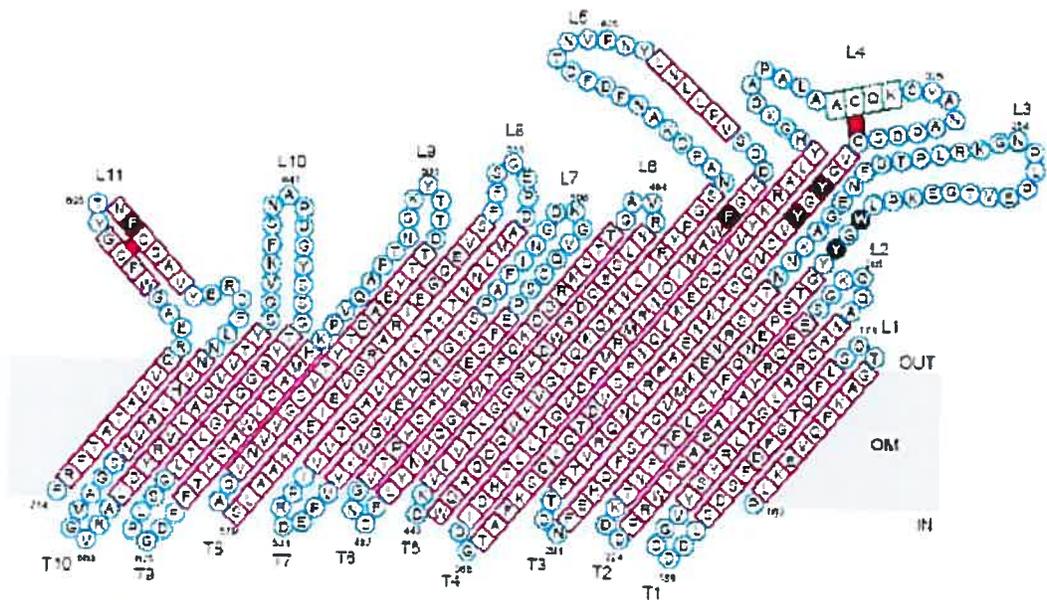


Figure 16 : Schéma de l'acquisition du ferrichrome par *E. coli* (Braun and Braun, 2002).



**Figure 17 :** Structure bidimensionnelle du récepteur FhuA d'*E. coli*. 22 feuillettes  $\beta$  antiparallèles et transmembranaires ( $\beta 1$  à  $\beta 22$ ), 11 boucles extracellulaires (L1 à L11) et 10 tours périplasmiques (T1 à T10) (Braun and Braun, 2002).

### 3.3.3. Le système *fhu* d'*A. pleuropneumoniae*

Le clonage et le séquençage des gènes impliqués dans l'acquisition du ferrichrome par *A. pleuropneumoniae* ainsi que la structure du récepteur FhuA d'*A. pleuropneumoniae* ont été élucidés dans notre laboratoire par Mikael (Mikael *et al.*, 2002; Mikael *et al.*, 2003).

#### 3.3.3.1. L'opéron *fhu* d'*A. pleuropneumoniae*

Grâce à une banque génomique d'*A. pleuropneumoniae* Mikael (Mikael *et al.*, 2002) a démontré qu'*A. pleuropneumoniae* possède un opéron *fhu*, d'environ 6 kb (Figure 18), composé de quatre gènes *fhuC*, *fhuD*, *fhuB* et *fhuA* (ces gènes semblent apparaître dans les opérons *fhu* de nombreuses bactéries):

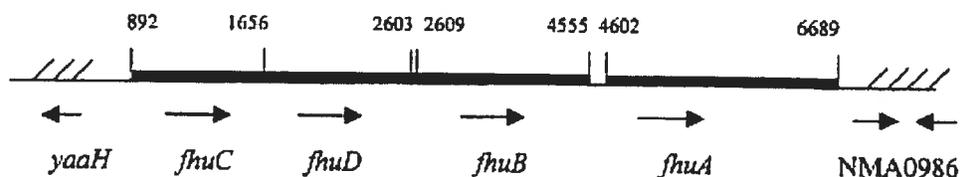
*fhuC* (765 pb) code pour une protéine qui lie l'ATP: FhuC (28,5 kDa).

*fhuD* (954 pb) code pour une protéine périplasmique qui transporte le ferrichrome du récepteur à la membrane cytoplasmique: FhuD (35,6 kDa).

*fhuB* (1953 pb) code pour une protéine intramembranaire: FhuB (69,4 kDa)

*fhuA* (2088 pb) code pour le récepteur de la membrane externe: FhuA (77 kDa).

Il est important de noter que l'organisation de l'opéron *fhu* d'*A. pleuropneumoniae* est relativement différente de celle d'*E. coli* (chez *E. coli*, *fhuA* est en amont des trois autres gènes). De plus, la séquence génétique de ces deux opérons ne possède que 27% d'homologie (Mikael *et al.*, 2002).



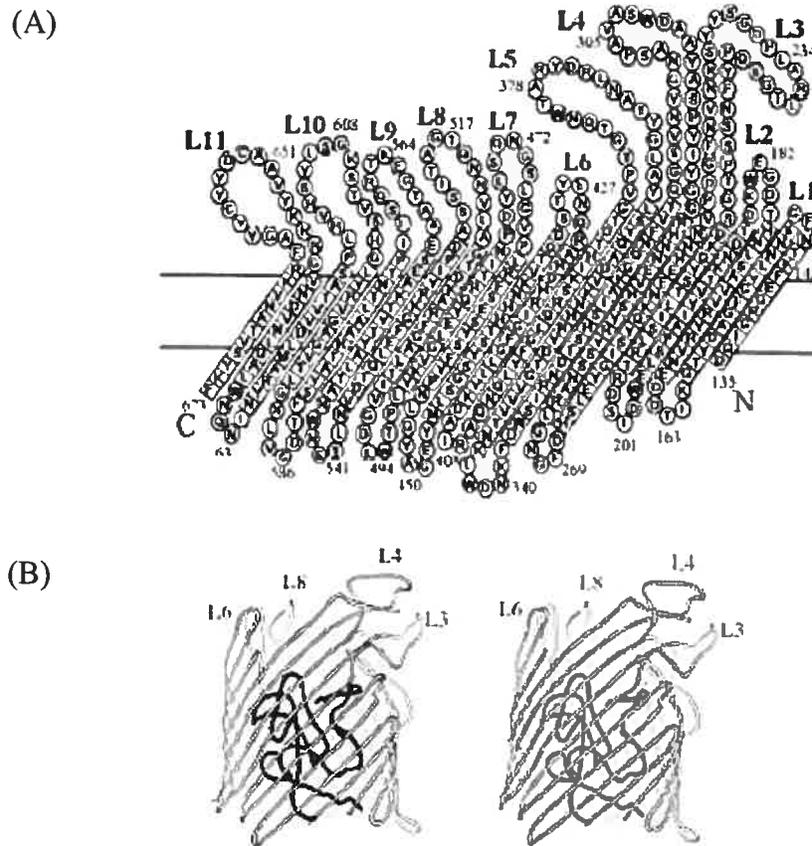
**Figure 18 :** Carte de l'opéron *fhu* de la souche de référence d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 4074 (Mikael *et al.*, 2002).

La distribution de l'opéron *fhu* chez les sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae* a été déterminée par PCR ainsi que par Southern blot. Les 12 souches de référence possédaient ces 4 gènes, indiquant que le système d'acquisition de ferrichrome est retrouvé chez tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et que l'opéron *fhu* est toujours organisé dans le même ordre (Mikael *et al.*, 2002).

### 3.3.3.2. La structure de FhuA d'*A. pleuropneumoniae*

Grâce à l'alignement de la séquence d'acides aminés de la protéine FhuA d'*A. pleuropneumoniae* un modèle pour FhuA a pu être déterminé. Tout comme FhuA d'*E. coli*, FhuA d'*A. pleuropneumoniae* possède 11 boucles extracellulaires (L1 à L11), 10 tours périplasmiques (T1 à T10) et 22 feuilletts  $\beta$  intramembranaires (Figure 19A). Bien que leur structure générale semble être similaire, certaines différences majeures existent entre autres au niveau de la longueur de deux boucles extracellulaires L3 et L4 (Mikael *et al.*, 2002). Ferguson et ses collaborateurs (Ferguson *et al.*, 1998) ont démontré que L3 et L4 jouent un rôle crucial dans la reconnaissance et l'acquisition du ligand. Ainsi on peut supposer que les différences au niveau des boucles L3 et L4 peuvent être responsables du manque de susceptibilité d'*A. pleuropneumoniae* à la toxine bactérienne colicine M et aux antibiotiques comme l'albomycine et la rifamycine qui utilisent, chez *E. coli*, FhuA

comme site d'entrée dans la cellule. La structure tridimensionnelle de FhuA d'*A. pleuropneumoniae* est similaire à celle d'*E. coli*: toutes deux possèdent deux domaines. Les deux domaines de FhuA d'*A. pleuropneumoniae* sont un bouchon à l'extrémité N-terminale (résidus 1 à 134) suivi d'un tonneau  $\beta$  à l'extrémité C-terminale (résidus 135 à 673) (Figure 19B) (Mikael *et al.*, 2002).



**Figure 19 :** Structure bidimensionnelle (A) et tridimensionnelle (B) du récepteur FhuA d'*A. pleuropneumoniae*. En (A) les carrés correspondent aux feuillets  $\beta$  et les cercles correspondent aux boucles et aux tours. En (B) le bouchon est représenté par une ligne noire continue et le tonneau  $\beta$  est représenté par une ligne grise (Mikael *et al.*, 2002).

### 3.3.3.3. Caractérisation de FhuA d'*A. pleuropneumoniae*

L'expression *in vivo* de FhuA, par *A. pleuropneumoniae*, a été étudiée. Le gène *fhuA* d'une souche d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 a été cloné dans un vecteur d'expression puis le vecteur a été transformé dans une souche d'*E. coli*. Les protéines FhuA obtenues après induction des souches d'*E. coli* ont été purifiées grâce

à une colonne d'agarose. Les protéines purifiées ont réagi avec le sérum d'un porc infecté par *A. pleuropneumoniae*, indiquant que FhuA est exprimée *in vivo* (Mikael *et al.*, 2002).

Afin de connaître l'effet d'une restriction en fer sur l'expression de *fhuA*, des réactions de RT-PCR ont été réalisées sur de l'ARN isolé d'*A. pleuropneumoniae* ayant été cultivée dans différentes conditions. Ces conditions étant: i) un milieu riche en fer; ii) un milieu restreint en fer grâce à différentes concentrations d'EDDHA (un chélateur de fer); et iii) un milieu contenant de l'EDDHA comme chélateur de fer et du ferrichrome comme unique source de fer. Le niveau de transcrits de *fhuA* n'a pas augmenté en réponse à une diminution de la concentration en fer, même lorsque le niveau d'EDDHA était très élevé ou en présence de ferrichrome. Ainsi, contrairement aux autres systèmes d'acquisition du fer, l'expression de *fhuA* n'est pas régulée négativement par le fer (Mikael *et al.*, 2003).

Un mutant *fhuA* a été généré grâce à un système de transconjugaison en une étape. Lors d'un test de promotion le mutant  $\Delta fhuA$  (DG02) n'était pas capable d'utiliser le ferrichrome comme unique source de fer, indiquant que le système d'acquisition du ferrichrome a été aboli chez  $\Delta fhuA$ . Par contre les systèmes d'acquisition et d'utilisation d'autres sources de fer comme la transferrine ou l'hémoglobine étaient toujours actifs, indiquant que ces systèmes d'acquisition n'étaient pas affectés par la mutation. Ces résultats démontrent de façon irrévocable que chez *A. pleuropneumoniae*, le gène *fhuA* code pour le récepteur du ferrichrome (Mikael *et al.*, 2003).

Afin de connaître le rôle de FhuA dans la virulence, Baltes et ses collaborateurs (Baltes *et al.*, 2003) ont effectué des infections expérimentales sur des porcs. Ils ont infecté les porcs par une souche sauvage d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 7 et par un mutant *fhuA* de la même souche. La maladie causée par le mutant était identique à celle causée par la souche sauvage, indiquant que le récepteur FhuA ne joue pas de rôle dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 7 (Baltes *et al.*, 2003).

### 3.4. Le récepteur de l'hémoglobine: HgbA

#### 3.4.1. Généralités

L'hémoglobine est retrouvée dans les globules rouges où elle a pour fonction le transport de l'oxygène. L'hémoglobine est constituée de quatre sous-unités, deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$ , qui fixent chacune un groupement hème (Figure 11B) (Perutz, 1960). Comme nous l'avons indiqué précédemment: l'hème est la source de fer la plus abondante chez l'hôte, il n'est donc pas surprenant que les bactéries pathogènes puissent l'utiliser comme source de fer. Afin d'acquérir l'hème contenu dans l'hémoglobine, de nombreuses bactéries possèdent des récepteurs au niveau de leur membrane externe. Parmi ces bactéries on peut citer *H. influenzae*, *Neisseria spp.*, *Yersinia enterocolitica* ou encore *E. coli*.

#### 3.4.2. Mise en évidence d'un récepteur pour l'hémoglobine chez *A. pleuropneumoniae*

Jusqu'à récemment les mécanismes utilisés par *A. pleuropneumoniae* pour utiliser l'hémoglobine et l'hémine ainsi que les protéines impliquées dans leur acquisition n'étaient pas connus. Il avait été démontré qu'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et 2 étaient capables d'utiliser, *in vitro*, l'hémoglobine et l'hémine porcine (Bélanger *et al.*, 1995; Deneer and Potter, 1989b) et que l'hémoglobine porcine pouvait se lier aux LPS d'*A. pleuropneumoniae* (Archambault *et al.*, 1997; Bélanger *et al.*, 1995). De plus des études de cytométrie en flux ont comparé la fixation de l'hémoglobine par *A. pleuropneumoniae* cultivées dans un milieu riche et un milieu restreint en fer. Cette étude a démontré que la fixation de l'hémoglobine est réprimée par le fer, car l'absence de fer augmente l'expression de récepteurs pour l'hémoglobine (Archambault *et al.*, 1999).

En 2003, Archambault et ses collaborateurs (Archambault *et al.*, 2003) ont cherché à identifier des protéines d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 pouvant fixer l'hémoglobine et l'hémine. Pour ce faire, ils ont préparé des extraits de membrane externe provenant de cellules cultivées dans des milieux riches et dans des milieux restreints en fer. Ces préparations ont subi des purifications d'affinité avec de l'hémoglobine et de l'hémine bovine couplées à de l'agarose. Cette technique a

permis d'isoler, à partir d'*A. pleuropneumoniae* cultivé dans un milieu restreint en fer, deux protéines; une de 75 kDa et une de 104 kDa (un marquage des cellules avec du [<sup>3</sup>H]palmitate a démontré qu'aucune de ces deux protéines n'est une lipoprotéine). Une recherche dans les bases de données de la séquence peptidique de la protéine de 75 kDa a révélé une homologie avec des protéines de la membrane externe régulées par le fer, des protéines de transport ainsi que des récepteurs TonB-dépendants de nombreuses bactéries à Gram négatif. Ainsi les deux protéines de la membrane externe, de 75 et 104 kDa, identifiées dans cette étude fixent l'hémoglobine et l'hémine, ce qui permet de supposer qu'elles pourraient être des récepteurs de l'hémoglobine et de l'hémine. De plus, dans cette étude il a été démontré que les sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae* étaient capables d'utiliser l'hémoglobine et l'hémine porcine comme unique source de fer (Archambault *et al.*, 2003).

### 3.4.3. Le récepteur de l'hémoglobine d'*A. pleuropneumoniae*

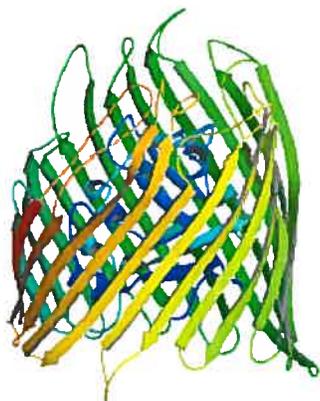
Ce n'est que récemment que le récepteur de l'hémoglobine chez *A. pleuropneumoniae* (HgbA) a été cloné, caractérisé (Srikumar *et al.*, 2004) et sa structure modélisée (Pawelek and Coulton, 2004).

Srikumar et ses collaborateurs (Srikumar *et al.*, 2004) ont découvert le récepteur de l'hémoglobine chez *A. pleuropneumoniae* grâce à des purifications d'affinité avec de l'hémoglobine couplée à de l'agarose. Par cette technique ils ont isolé une protéine de la membrane externe d'environ 105 kDa qu'ils ont dénommé HgbA. Le gène *hgbA* a été cloné et la protéine HgbA caractérisée. Le gène *hgbA* est un cadre de lecture (ORF) de 2838 pb qui code pour une protéine de 946 acides aminés. Dans la séquence promotrice de *hgbA* une boîte Fur a été identifiée suggérant que HgbA serait régulé par le fer. Les 23 premiers acides aminés de HgbA semblent coder pour une séquence signal. Des analyses de la séquence peptidique de HgbA d'*A. pleuropneumoniae* ont démontré que *hgbA* d'*A. pleuropneumoniae* est partiellement homologue à *hgbA* de *Pasteurella multocida*. Une séquence très conservée chez les récepteurs TonB-dépendants, la boîte TonB, est retrouvée à

l'extrémité N-terminale de HgbA, suggérant que le complexe TonB-ExbB-ExbD fournit l'énergie à HgbA (Srikumar *et al.*, 2004).

Afin de confirmer la régulation de HgbA par le fer des RT-PCR sur de l'ARN isolé d'*A. pleuropneumoniae* (cultivée dans des milieux riches et des milieux restreints en fer) ont été réalisés. Le niveau de *hgbA* transcrit augmente en réponse à une diminution du niveau de fer dans le milieu confirmant que l'expression d'*hgbA* est régulée par le fer. Finalement un mutant ayant une délétion dans le gène *hgbA* a été construit. Lors d'un test de promotion le mutant  $\Delta hgbA$  n'était pas capable d'utiliser l'hémoglobine comme unique source de fer. Ce résultat indique que le système d'acquisition de l'hémoglobine a été aboli chez  $\Delta hgbA$  et confirme que le gène *hgbA* code pour un récepteur de l'hémoglobine (Srikumar *et al.*, 2004).

Au courant de la même année, Pawelek et Coulton (Pawelek and Coulton, 2004) ont modélisé le récepteur HgbA d'*A. pleuropneumoniae*. Une étude de la



**Figure 20 :** Structure tridimensionnelle du récepteur HgbA d'*A. pleuropneumoniae*. Les feuillets  $\beta$  sont représentés par des flèches et les boucles sont représentées par des lignes continues. Le bouchon est en bleu et le tonneau  $\beta$  est en vert (Pawelek and Coulton, 2004).

séquence primaire ainsi qu'une modélisation comparative ont démontré des similarités entre HgbA d'*A. pleuropneumoniae* et d'autres récepteurs de la membrane externe d'*E. coli*, comme FepA, FhuA et FecA. HgbA possède un bouchon à son extrémité N-terminale suivi d'un tonneau  $\beta$  de 22 feuillets à son extrémité C-terminale (Figure 20). Les boucles

extracellulaires de HgbA semblent être plus allongées que celle des récepteurs d'*E. coli*, ce qui pourrait faciliter la liaison protéine-protéine avec l'hémoglobine. Une modélisation d'identification des replis des boucles de HgbA a démontré que 10 des 11 boucles extracellulaires sont très homologues aux boucles jouant un rôle dans l'interaction protéine-

protéine ou avec l'hème chez des récepteurs membranaires. En fait il semblerait que ce soit les boucles 2 et 7 qui jouent un rôle dans la reconnaissance et la liaison de l'hémoglobine et de l'hème (Pawelek and Coulton, 2004).

De grandes pertes économiques dues à la mortalité des porcs, aux retards de croissance et aux frais médicaux sont imputables à *A. pleuropneumoniae* (Taylor, 1999). Pour lutter contre cet agent infectieux, il existe de nombreux antibiotiques mais ils ne sont efficaces que lors de la phase initiale de la maladie. De plus, utilisés de façon excessive, ils peuvent engendrer des antibiorésistances (Chang *et al.*, 2002; Prescott *et al.*, 2000; Taylor, 1999). Ainsi la prévention reste le meilleur moyen de lutter contre cette bactérie. De nombreux vaccins sont actuellement commercialisés mais généralement ils ne réduisent la mortalité que chez les sérotypes homologues et posent des problèmes d'innocuité (Fenwick and Henry, 1994; Haesebrouck *et al.*, 1997). Le développement d'un vaccin sûr, efficace et offrant une protection croisée contre tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* semble donc nécessaire. Mikael, Srikumar et leurs collaborateurs (Mikael *et al.*, 2002; Srikumar *et al.*, 2004) ont démontré que FhuA et HgbA, deux récepteurs du fer de la membrane externe, sont exprimés *in vivo* et conservés chez les sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae*. Ces connaissances nous ont incités à étudier d'une façon plus détaillée ces deux récepteurs et à développer et tester un vaccin sous-unitaire ayant pour composante FhuA et/ou HgbA.

# CHAPITRE 1

FhuA and HgbA, outer membrane proteins of  
*Actinobacillus pleuropneumoniae*: role as virulence  
determinants.

(Submitted to the Canadian Journal of Microbiology)

**FhuA and HgbA, Outer Membrane Proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*:  
Role as Virulence Determinants**

Lara Shakarji, Leonie G. Mikael, Ramakrishnan Srikumar, Marylène Kobisch,  
James W. Coulton and Mario Jacques<sup>1</sup>

**Lara Shakarji, Leonie G. Mikael and Mario Jacques<sup>1</sup>.** Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6

**Ramakrishnan Srikumar and James W. Coulton.** Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine, Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, QC, Canada, H3A 2B4

**Marylène Kobisch.** Unité de recherche de mycoplasmologie et bactériologie, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, BP 53, 22440 Ploufragan, France

**L. G. Mikael's present address.** Montreal Children's Hospital Research Institute, 4060 St. Catherine West, Place Toulon 242, Montreal, QC, Canada, H3Z 2Z3

<sup>1</sup>Corresponding author e-mail: [mario.jacques@umontreal.ca](mailto:mario.jacques@umontreal.ca)

Tel: +1 450 773 8521 ext 18348; Fax: +1 450 778 8108

### Abstract:

For the recently described serotype 15 of biotype I and serotypes 13 and 14 of biotype II of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *fhuA* and *hgbA* were detected by PCR and DNA sequencing. To determine the substrate specificity of the iron receptors FhuA and HgbA and to study their role in the virulence of *A. pleuropneumoniae*, two isogenic deletion mutants of *fhuA* and *hgbA* were used. Different sources of iron and siderophores were tested in growth promotion assays. FhuA and HgbA are specific for their respective ligands: ferrichrome and hemoglobin. The virulence of the two deletion mutant strains was evaluated in experimental infections using specific pathogen free piglets. FhuA mutant (DG02) was highly virulent as was the wild type parental strain S4074. Significantly, the virulence of HgbA mutant ( $\Delta hgbA$ ) was attenuated. Our data indicate that both FhuA and HgbA are conserved among all serotypes and biotypes of *A. pleuropneumoniae* and that HgbA, the receptor for porcine hemoglobin, may play a role in virulence.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, iron uptake, outer membrane receptors, virulence.

### Résumé:

Chez le sérotype 15 du biotype I, récemment décrit, ainsi que chez les sérotypes 13 et 14 du biotype II d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, la présence de *fhuA* et de *hgbA* a été recherchée par analyse PCR ainsi qu'un séquençage d'ADN. Afin de déterminer la spécificité de substrat des récepteurs du fer FhuA et HgbA ainsi que leur rôle dans la virulence, deux mutants isogéniques délétés de *fhuA* et *hgbA* ont été utilisés. Différentes sources de fer ainsi que des sidérophores ont été évalués par un test de promotion. Les résultats indiquent que FhuA et HgbA semblent être spécifiques de leur ligand respectif, le ferrichrome et l'hémoglobine. La virulence des deux mutants délétés a été évaluée par des infections expérimentales chez des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés. Tout comme la souche mère sauvage S4074, le mutant FhuA (DG02) est très virulent. Par contre la virulence du mutant HgbA ( $\Delta hgbA$ ) est atténuée. Dans l'ensemble nos résultats indiquent que FhuA ainsi que

HgbA sont conservés chez tous les sérotypes et biotypes d'*A. pleuropneumoniae*. De plus, le récepteur pour l'hémoglobine porcine, HgbA, semblerait jouer un rôle dans la virulence.

Mots clés: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, acquisition du fer, récepteurs de la membrane externe, virulence.

Iron is an important growth factor for almost all microorganisms. In vertebrates, the concentration of free soluble iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) is  $10^{-18}$  M, a concentration much lower than the  $10^{-8}$  to  $10^{-6}$  M required for bacterial growth (Griffiths and Williams, 1999). To acquire iron from their environment, Gram-negative bacteria express iron receptors on their outer membrane (OM) and they may synthesize siderophores, low-molecular-weight iron chelators.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the etiologic agent of porcine pleuropneumonia, a highly contagious disease that causes major economic losses to the swine industry worldwide (Taylor, 1999). There are 15 serotypes of *A. pleuropneumoniae*, further divided in two biotypes according to their need for nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (Bossé *et al.*, 2002). Biotype I strains are NAD-dependent (serotypes 1 to 12, and 15) while biotype II strains are NAD-independent (serotypes 13 and 14). Serotypes 1, 5 and 7 are most prevalent in North America, whereas serotype 2 is most common in Europe and Japan (Dubreuil *et al.*, 2000). Under iron-limiting conditions, *A. pleuropneumoniae* can use porcine transferrin (Gonzalez *et al.*, 1990), hemoglobin and heme compounds (Bélanger *et al.*, 1995; Deneer and Potter, 1989), as well as exogenous siderophores such as ferrichrome (Diarra *et al.*, 1996). These features strongly imply that *A. pleuropneumoniae* expresses specific receptors for these different iron sources on their outer membrane (Jacques, 2004). The present study focuses on two of these iron receptors that were recently described by our group: FhuA and HgbA. The gene *fhuA* (2088 bp) is part of the *fhuCDBA* operon; FhuA is an OM protein of 75 kDa that acts as receptor for ferrichrome (Mikael *et al.*, 2002). The gene *hgbA* (2885 bp) encodes HgbA, an OM protein of 105 kDa that acts as receptor for hemoglobin (Srikumar *et al.*, 2004). Homology modeling of HgbA revealed regions of potential interactions with hemoglobin and heme (Pawelek and Coulton, 2004). Both *fhuA* and *hgbA* were shown to be present in serotypes 1 to 12 of biotype I (Mikael *et al.*, 2002; Srikumar *et al.*, 2004).

The objectives of the present study were to establish the presence of *fhuA* and *hgbA* in serotypes 13 and 14 of biotype II, and in the newly described serotype 15 of biotype I (Blackall *et al.*, 2002), to investigate the substrate specificity of FhuA and HgbA, and to evaluate their potential role in virulence.

The presence of *fhuA* and *hgbA* among the reference strains of serotypes 13, 14, 15 and field strains of serotype 1 (Table 1) was tested by PCR amplification. DNA of serotypes 13, 14 and 15 was extracted by phenol-chloroform-isoamyl alcohol (Labrie *et al.*, 2002). DNA from the field strains was extracted by DNeasy® Tissue kit (QIAGEN). The set of primers used to amplify *fhuA* was based on the mature sequence of *fhuA* from *A. pleuropneumoniae* serotype 1: AFor [5'-GATGAGGTGTCGGTGGTT-3'] and ARev [5'-TGTGGCATTGACTTTACG-3'] (Mikael *et al.*, 2003). A PCR product of approximately 2 kb was observed. PCR amplification showed that *fhuA* is also present in serotypes 13, 14 and 15. In addition, we performed similar PCR amplifications on 13 field strains of *A. pleuropneumoniae* serotype 1, from our collection and found *fhuA* to be present in all field strains tested. To amplify *hgbA*, primers were designed based on the mature sequence of *hgbA* from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (HgbA5' [5'-TGCATTGGCACAAGAGCA-3'] and HgbA3' [5'-AAGTTTCTTCCCGGAGCA - 3']), yielding a PCR product of approximately 2.7 kb. Results from PCR amplification showed that *hgbA* is indeed present in serotypes 13, 14 and 15. In addition, we performed similar PCR amplifications on 13 field strains of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 from our collection and found *hgbA* to be present in all field strains tested. Therefore, both *fhuA* and *hgbA* genes are well conserved among all serotypes of the two biotypes of *A. pleuropneumoniae*.

The *fhuA* PCR products of serotypes 13, 14 and 15 were cloned in a pGEM-T Easy (Promega) vector and then transformed into *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  to compare sequences of *fhuA* with those previously determined for serotypes 1 to 12 (Mikael *et al.*, 2003). After transformation of *E. coli* strains with post-ligation products, the transformation mixture was plated on Luria-Bertani (LB; Difco Laboratories) plates supplemented with 0.5 mM IPTG, 80  $\mu$ g/ml X-Gal and 100  $\mu$ g/ml ampicillin.

Plasmids were extracted with Qiaprep spin miniprep kit (QIAGEN). Sequencing was carried out at Service d'analyse et de synthèse of Université Laval (<http://nucleus.rsvs.ulaval.ca>). ClustalX algorithm (<http://clustalw.genome.ad.jp>) was used to align amino acid residues from the FhuA sequence of the 15 *A. pleuropneumoniae* serotypes. Based on their sequence relatedness (Figure 1), the dendrogram divided FhuA into two major branches. The first main branch of the dendrogram included serotypes 1, 11, 9, 3, 8, 13, 14 and 15; the second main branch encompassed serotypes 2, 4, 7, 5, 10, 12 and 6. As speculated by Mikael et al. (2003), the relatedness correlated with the serological cross-reactivity of serotypes 1, 9 and 11; 3 and 8; and 4 and 7 which is due to structural similarities of the O antigen of each group (Dubreuil *et al.*, 2000). Perry and collaborators have demonstrated that polyclonal rabbit antisera prepared against whole cells of *A. pleuropneumoniae* serotypes 3, 8 and 15 contain antibody showing equivalent reaction to the purified O-chain of *A. pleuropneumoniae* serotypes 3, 8 and 15 which also correlate with our observations (Perry *et al.*, 2005). Sequences from serotypes 13 and 14 belong to biotype II and are grouped among sequences of biotype I, not on a separate branch.

To investigate the substrate specificity of FhuA and HgbA, two isogenic deletion mutants were used: *fhuA* mutant DG02 and mutant  $\Delta hgbA$ . Mutant DG02 has a 1015 bp deletion in the 2088 bp coding sequence of *fhuA* (Mikael *et al.*, 2003);  $\Delta hgbA$  has a 650 bp deletion in the 2885 bp coding sequence of *hgbA* (Srikumar *et al.*, 2004). Growth promotion assays assessed the ability of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parental strain S4074, *fhuA* mutant DG02 and  $\Delta hgbA$  to use various sources of iron and siderophores for growth. Brain Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories) plates supplemented with 15  $\mu\text{g/ml}$  NAD, with or without an iron chelator (EDDHA, Sigma [200  $\mu\text{M}$ ]), were inoculated with bacteria: 100  $\mu\text{l}$  of cells in stationary phase were spread evenly on plates. Five  $\mu\text{l}$  of the iron source (at concentrations of 1000, 100, 10 and 1  $\mu\text{g/ml}$ ) were dotted on the surface of agar plates to allow growth promotion by the iron sources. Plates were incubated overnight at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Only iron sources that permitted growth of the reference strain S4074 were tested with *fhuA* mutant DG02 and mutant  $\Delta hgbA$ . Growth promotion assays indicated that reference

strain S4074 used porcine transferrin, hemoglobin and hemin as well as the hydroxamate siderophore ferrichrome and the bis-catechol siderophore ISD-I 207 (Table 2). *A. pleuropneumoniae* can also use iron sources such as ferric nitrate, ferric chloride, ferric sulfate, ferrous ammonium sulfate and ferrous chloride but not ferric citrate (Table 2). The growth promotion tests showed that, as expected, the *fhuA* mutant DG02 was unable to use ferrichrome as the sole source of iron and that the mutant  $\Delta hgbA$  was unable to use hemoglobin or hemin as the sole source of iron. All other iron sources that the parent strain S4074 was able to use also promoted the growth of the two mutants (Table 2). Furthermore, *A. pleuropneumoniae* strain S4074 can use ferrichrome but not the hydroxamate siderophore deferoxamine. Thus, the receptors FhuA and HgbA are highly specific for their substrates, ferrichrome for FhuA, and hemoglobin for HgbA. Interestingly, the fact that *A. pleuropneumoniae* can use the catechol ISD-I 207 strongly suggests the presence of another receptor specific for catechol.

Since *fhuA* is constitutively expressed in *A. pleuropneumoniae* (Mikael *et al.*, 2003) and not iron-regulated as usually observed with OMPs involved in iron uptake, we hypothesized that FhuA might have another function. We analyzed *fhuA* mutant DG02 with a new technology called Phenotype MicroArrays (Biolog, Inc., Hayward, CA) that permits simultaneous assays of nearly 2,000 growth phenotypes. Tests are performed in a set of 20 x 96-well microplates containing different nutrients or inhibitors in which cell respiration is measured with a redox indicator (Bochner *et al.*, 2001; Bochner, 2003). The *fhuA* mutant DG02 was compared pairwise with the parental wild-type strain. Both strains were pregrown on chocolate agar in 5% CO<sub>2</sub> at 35°C and 15 µg/ml NAD was included in all inoculating fluids. Interestingly, the *fhuA* mutant only showed defects in the use of certain dipeptides as nitrogen source: 5 of the 280 dipeptides tested. These were Ala-Glu, Val-Glu, Gln-Glu, Gln-Tyr, and Ser-Gln. Ferrichrome, the siderophore transported by FhuA, is a cyclic hexapeptide composed of three molecules of glycine and three molecules of N-acetyl-N-hydroxyornithine. Although we can speculate that FhuA of *A. pleuropneumoniae* may also be involved in transport of specific dipeptides, further experiments will be needed before reaching such a conclusion. It would be interesting to see if these

observations are also valid with FhuA receptors found in other Gram-negative bacteria.

To evaluate the potential role that the two iron receptors FhuA and HgbA may play in the virulence of *A. pleuropneumoniae*, we carried out experimental infections on specific pathogen free (SPF) piglets using both mutant strains of the pathogen. Thirteen SPF piglets that were 12 weeks old at the onset of the experiments were reared in a pathogen free environment. One group of five piglets received the *fhuA* mutant DG02; one group of four piglets received the mutant  $\Delta hgbA$ ; and one group of four piglets, not challenged by bacteria, served as control. The three groups of piglets were housed separately. Bacterial strains were grown on PPLO agar plates supplemented with 1 mg/ml of glucose, 10  $\mu$ g/ml NAD and 5% horse serum. Plates were incubated for 18 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Piglets were challenged once intranasally with a total of 1 ml (0.5 ml per nostril) of a culture containing 1 x 10<sup>6</sup> CFU/ml. Animals were monitored daily for rise in body temperature and clinical signs: cough, dyspnea, fever, vomiting and exhaustion. Piglets were euthanized 15 days after the inoculation or as soon as severe clinical signs were observed. All pigs were examined thoroughly at necropsy, including evaluation of macroscopic lung lesions, and isolation of the inoculated bacteria from the lung and serological analysis. Following 72 hours post challenge, two piglets infected with *fhuA* mutant DG02 died; no mortality was recorded for piglets challenged with mutant  $\Delta hgbA$  and non-infected control piglets (Table 3). As recorded in Table 3, the body temperature was higher than normal for 100% of the piglets infected with *fhuA* mutant DG02 and 75% of the piglets infected with mutant  $\Delta hgbA$ . Fever was also observed for a longer period of time in the *fhuA* mutant DG02-infected group. Temperature of control piglets did not rise. Piglets infected with *fhuA* mutant DG02 had the most intense clinical: vomiting, exhaustion and particularly dyspnea. Piglets challenged with mutant  $\Delta hgbA$  or in the control group developed no clinical signs. The average daily gain in total body weight was 150 g for *fhuA* mutant DG02-infected piglets, 547 g for mutant  $\Delta hgbA$ -infected piglets and 768 g for non-infected control piglets, indicating that growth is highly affected in pigs infected with *fhuA* mutant DG02. Necropsy

was carried out on every piglet. Upon macroscopic examination, lung lesions were observed in 100% of piglets challenged with mutant DG02, and 75% of piglets challenged with mutant  $\Delta hgbA$ . The histological analysis showed that lesions observed in piglets challenged with mutant DG02 were more severe than those observed in piglets challenged with mutant  $\Delta hgbA$  (data not shown). In piglets challenged with *fhuA* mutant DG02, 100% of the piglets had *A. pleuropneumoniae* in their lungs, 40% in their nasal cavities and 60% in their tonsils. In piglets challenged with mutant  $\Delta hgbA$ , 75% of the piglets had *A. pleuropneumoniae* in their lungs and 50% in their tonsils but no *A. pleuropneumoniae* was found in their nasal cavities. No *A. pleuropneumoniae* were isolated from control piglets. Overall, we observed diminished ability of the  $\Delta hgbA$  mutant to colonize the respiratory tract of infected piglets. Results obtained with *fhuA* mutant DG02 are similar to those we have repeatedly obtained with the parental strain S4074 (Labrie *et al.*, 2002; Rioux *et al.*, 1999; Rioux *et al.*, 2000). Serum antibodies were tested with a Swinecheck® App 1, 9, 11 kit (Biovet) which allows the detection of antibodies against *A. pleuropneumoniae* serotypes 1, 9 and 11. Prior to the infection all the piglets were seronegative as expected. Seroconversion appeared after one week in all piglets challenged with both mutants, except for one piglet in the group that received the  $\Delta hgbA$  mutant. After two weeks, all piglets challenged with both *fhuA* and *hgbA* mutants were seropositive. These results showed that both *fhuA* mutant DG02 and  $\Delta hgbA$  are able to induce symptoms and lesions typical of infection by *A. pleuropneumoniae* serotype 1. Our results are in agreement with those of Baltes *et al.* (2003) who showed that *fhuA* of *A. pleuropneumoniae* serotype 7 was not required for virulence. However, virulence of the  $\Delta hgbA$  mutant is apparently attenuated compared to that of the *fhuA* mutant DG02 and the parental strain S4074 based on the following observations: lower mortality rate, lower fever, less severe clinical signs, fewer lung lesions, average daily gain in body weight similar to control pigs, and a diminished ability to colonize the upper respiratory tract and tonsils. Considering the presence of multiple iron uptake systems in *A. pleuropneumoniae*, it is not surprising that inactivation of a single iron uptake system is insufficient to confer avirulence to a strain.

In conclusion, this study demonstrates that the iron receptors FhuA and HgbA are well conserved among all serotypes and biotypes of *A. pleuropneumoniae*, and that they are both specific for their cognate substrates, ferrichrome and hemoglobin, respectively. The ubiquitous expression of both iron receptors in *A. pleuropneumoniae* suggests that they play a key role in iron uptake or other uncharacterized physiological functions. While *A. pleuropneumoniae* serotype 1 *fhuA* mutant DG02 was highly virulent, confirming similar results obtained with a serotype 7 *fhuA* mutant (Baltes *et al.*, 2003), the  $\Delta hgbA$  mutant strain was attenuated, indicating that HgbA may play a role in virulence of *A. pleuropneumoniae*. To further evaluate their roles in virulence, it would be necessary to construct *fhuA* and *hgbA* mutants in a background lacking one or more iron uptake systems. Notable is the recent construction of an *A. pleuropneumoniae tonB2* mutant in which uptake of iron from hemin, hemoglobin, transferrin and ferrichrome was abolished; this strain was avirulent (Beddek *et al.*, 2004). Redundancy of iron transport systems makes it difficult to pinpoint the role of a single system. Because the surface receptors FhuA and HgbA are well conserved across different *A. pleuropneumoniae* serotypes, they represent potential candidates for the development of a subunit vaccine.

This work was supported in part by the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine, a network of the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and industrial partners. Financial support was also provided by Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (2002-ER-71900). We thank A. Labbé, R. Cariolet and B. Beurepaire for assistance with the experimental infection, G. Pelletier-Jacques and J. Labrie for technical aid.

## References:

- Baltes, N., Tonpitak, W., Hennig-Pauka, I., Gruber, A.D., and Gerlach, G.F. (2003) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 siderophore receptor FhuA is not required for virulence. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 41-48.
- Beddek, A.J., Sheehan, B.J., Bossé, J.T., Rycroft, A.N., Kroll, J.S., and Langford, P.R. (2004) Two TonB Systems in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Their Roles in Iron Acquisition and Virulence. *Infect Immun* **72**: 701-708.
- Bélanger, M., Bégin, C., and Jacques, M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun* **63**: 656-662.
- Blackall, P.J., Klaasen, H.L., van den Bosch, H., Kuhnert, P., and Frey, J. (2002) Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol* **84**: 47-52.
- Bochner, B.R., Gadzinski, P., and Panomitros, E. (2001) Phenotypic microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res* **11**: 1246-1255.
- Bochner, B.R. (2003) New technologies to assess genotype-phenotype relationships. *Nat Rev Genet* **4**: 309-314.
- Bossé, J.T., Janson, H., Sheehan, B.J., Beddek, A.J., Rycroft, A.N., Simon Kroll, J., and Langford, P.R. (2002) *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* **4**: 225-235.
- Deneer, H.G., and Potter, A.A. (1989) Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **57**: 798-804.
- Diarra, M.S., Dolence, J.A., Dolence, E.K., Darwish, I., Miller, M.J., Malouin, F., and Jacques, M. (1996) Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl Environ Microbiol* **62**: 853-859.
- Dubreuil, J.D., Jacques, M., Mittal, K.R., and Gottschalk, M. (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim Health Res Rev* **1**: 73-93.

- Gonzalez, G.C., Caamano, D.L., and Schryvers, A.B. (1990) Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol Microbiol* **4**: 1173-1179.
- Griffiths, E., and Williams, P. (1999) *The iron-uptake systems of pathogenic bacteria, fungi and protozoa*. Chichester; Toronto: Wiley.
- Jacques, M. (2004) Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* **68**: 81-85.
- Labrie, J., Rioux, S., Wade, M.M., Champlin, F.R., Holman, S.C., Wilson, W.W., Savoye, C., Kobisch, M., Sirois, M., Galarneau, C., and Jacques, M. (2002) Identification of genes involved in biosynthesis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants. *J Endotoxin Res* **8**: 27-38.
- Madec, F., and Kobisch, M. (1982) Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à l'abattoir. *Journées de la Recherche porcine en France* **14**: 405-412.
- Mikael, L.G., Pawelek, P.D., Labrie, J., Sirois, M., Coulton, J.W., and Jacques, M. (2002) Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (*fhu*) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **148**: 2869-2882.
- Mikael, L.G., Srikumar, R., Coulton, J.W., and Jacques, M. (2003) *fhuA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron. *Infect Immun* **71**: 2911-2915.
- Pawelek, P.D., and Coulton, J.W. (2004) Hemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: homology modelling reveals regions of potential interactions with hemoglobin and heme. *J Mol Graph Model* **23**: 211-221.
- Perry, M.B., MacLean, L.L., and Vinogradov, E. (2005) Structural characterization of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15. *Biochem Cell Biol* **83**: 61-69.

- Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Frey, J., Nicolet, J., Kobisch, M., Dubreuil, J.D., and Jacques, M. (1999) Isolation and characterization of mini-*Tn10* lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can J Microbiol* **45**: 1017-1026.
- Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Kobisch, M., Frey, J., Gottschalk, M., and Jacques, M. (2000) Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb Pathog* **28**: 279-289.
- Srikumar, R., Mikael, L.G., Pawelek, P.D., Khamessan, A., Gibbs, B.F., Jacques, M., and Coulton, J.W. (2004) Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **150**: 1723-1734.
- Taylor, D.J. (1999) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In *Diseases of swine*. Straw, B.E., Allaire, S.D., Mengeling, W.L. and Taylor, D.J. (eds). Ames, Iowa: Iowa State University Press, pp. 343-354.

**Table 1.** Strains and plasmid used in this study.

Strain	Characteristics	Source or Reference
<b><i>A. pleuropneumoniae</i></b>		
<b>reference strains</b>		
S4074	Serotype 1, Biotype I	K. R. Mittal (U. de Montréal)
N 273	Serotype 13, Biotype II	M. Gottschalk (U. de Montréal)
3906	Serotype 14, Biotype II	M. Gottschalk
HS 143	Serotype 15, Biotype I	M. Gottschalk
<b><i>A. pleuropneumoniae</i></b>		
<b>field strains</b>		
11-73	Serotype 1	Our collection
11-74	Serotype 1	Our collection
1212 A	Serotype 1	Our collection
86-81-1496	Serotype 1	Our collection
87-41-1888	Serotype 1	Our collection
99-B977	Serotype 1	Our collection
FMV 86-6471	Serotype 1	Our collection
FMV 87-534A	Serotype 1	Our collection
FMV 87-682	Serotype 1	Our collection
FMV 93-2677	Serotype 1	Our collection
FMV 94-3294	Serotype 1	Our collection
FMV 95-8406	Serotype 1	Our collection
Q 87-586	Serotype 1	Our collection
<b><i>A. pleuropneumoniae</i></b>		
<b>mutant strains</b>		
DG02	Chromosomal internal deletion of <i>fhuA</i> in serotype 1 strain S 4074	(Mikael et al. 2003)
$\Delta hgbA$	Chromosomal internal deletion of <i>hgbA</i> in serotype 1 strain S 4074	(Srikumar et al. 2004)
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ ( $\phi 80$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	BRL
<b>Plasmid</b>		
pGEM-T Easy	Cloning vector: pUC <i>ori</i> , Amp <sup>r</sup>	Promega

**Table 2.** Use of different iron sources and siderophores by *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain S4074, *fhuA* mutant DG02 and *hgbA* mutant  $\Delta hgbA$

Iron source	Parental strain S4074	<i>fhuA</i> mutant DG02	<i>hgbA</i> mutant $\Delta hgbA$
Porcine transferrin <sup>a</sup>	+	+	+
Porcine hemoglobin	+	+	-
Porcine Hemin	+	+	-
Ferrichrome	+	-	+
Deferoxamine mesylate	-	-	-
Catechol <sup>bc</sup>	+	+	+
Other catecholates and miscellaneous iron sources <sup>d</sup>	-	-	-
Ferric citrate	-	-	-
Ferric nitrate	+	+	+
Ferric chloride	+	+	+
Ferric sulfate	+	+	+
Ferrous ammonium sulfate	+	+	+
Ferrous chloride	+	+	+

<sup>a</sup> A generous gift of D.F. Niven, McGill University.

<sup>b</sup> Bis-catechol ISD-I 207 (Diarra et al. 1996).

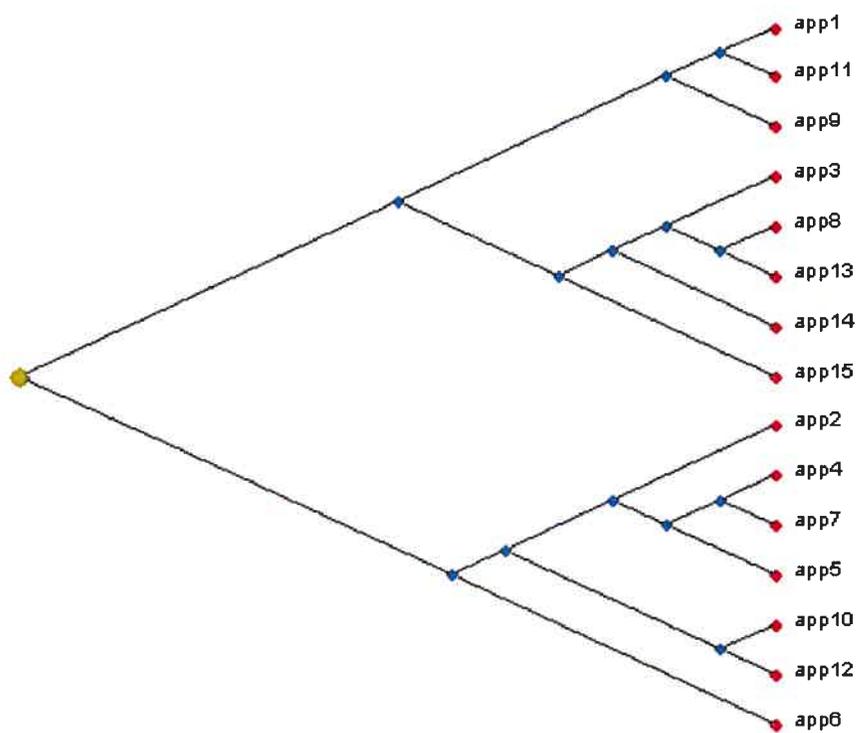
<sup>c</sup> A generous gift of M.J. Miller, University of Notre Dame.

<sup>d</sup> Arterenol bitartrate hydrate, L-arterenol, epinephrine, dopamine hydrochloride, L-DOPA, 2,3-dihydroxybenzoic acid, 2,4-dihydroxybenzoic acid, gentisic acid, protocatechuic acid, DOPAC, DL-isoproterenol hydrochloride, dobutamine hydrochloride, rhodotorulic acid and S-carbidopa, salicylic acid (*Pseudomonas spp.*).

**Table 3.** Virulence in pigs of 12A. *pleuropneumoniae* serotype 1, *fhuA* mutant DG02 and *hgbA* mutant  $\Delta hgbA$ .

Group	Number of pigs (n)	Mortality (n)	Fever <sup>a</sup>		Pigs with lung lesions <sup>b</sup>				Pigs in which <i>A. pleuropneumoniae</i> was isolated			Average daily gain in total body weight after 7 days of challenge (g)
			Pigs affected (%)	Duration (days)	(%)	Average weight of lungs (g)	Size of the lesions <sup>f</sup> (x/28)	From lungs (%)	From nasal cavity (%)	From tonsils (%)		
Control	4	0	0	0	0	439 ± 19 <sup>c</sup>	0/28	0	0	0	0	769 ± 132 <sup>i</sup>
DG02 mutant	5	2	100	2-5	100	647 ± 165 <sup>d</sup>	11/28 ± 3 <sup>g</sup>	100	40	60	60	150 ± 175 <sup>j</sup>
$\Delta hgbA$ mutant	4	0	75	1	75	491 ± 21 <sup>e</sup>	3/28 ± 2 <sup>h</sup>	75	0	50	50	547 ± 335 <sup>k</sup>

<sup>a</sup>T > 40°C<sup>b</sup>Macroscopic lung lesions.<sup>c</sup>individual values were 420g, 445g, 450g and 442g.<sup>d</sup>individual values were 627.5g, 812g, 592.25g, 581.25g and 630.27g.<sup>e</sup>individual values were 480g, 475g, 512g and 496g.<sup>f</sup>Represents area of pneumonic lesion. Scale of 0 to 28 as described by Madec and Kobisch, (1982). Values represent the mean ± S.D.<sup>g</sup>individual values were 8, 10, 12, 12 and 12.<sup>h</sup>individual values were 2, 2, 4 and 5.<sup>i</sup>individual values were 750g, 637.5g, 862.5g and 825g.<sup>j</sup>individual values were 237.5g, - 25g and 237.5g.<sup>k</sup>individual values were 512.5g, 212.5g, 612.5g and 850g.



**Figure 1.** Dendrogram analysis showing sequence relatedness of *fhuA* from reference strains representing *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 to 15.

## Chapitre 2

Utilisation de deux récepteurs du fer d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, FhuA et HgbA, comme antigènes dans un vaccin sous-unitaire contre la pleuropneumonie porcine.

## Introduction

Lors d'études antérieures dans notre laboratoire, deux récepteurs pour le fer ont été caractérisés, FhuA et HgbA. Des analyses de Western blot ont permis de démontrer que *fhuA* et *hgbA* étaient exprimés *in vivo* (Mikael *et al.*, 2002; Mikael *et al.*, 2003; Srikumar *et al.*, 2004). Dans le chapitre 1, nous avons démontré par des analyses PCR que *fhuA* et *hgbA* étaient présents chez les 15 sérotypes d' *A. pleuropneumoniae*. De plus, un séquençage d'ADN suivi d'une analyse des séquences par un dendrogramme, nous a permis de prouver que la séquence de *fhuA* des sérotypes 13 et 14 du biotype II est très homologue à celle des sérotypes du biotype I. Ces connaissances nous ont permis de supposer que FhuA et HgbA pourraient être d'excellents composants d'un vaccin sous-unitaire contre la pleuropneumonie porcine.

Afin d'optimiser la formulation des vaccins nous avons effectué deux essais. Lors du premier essai nous avons comparé la protection induite par la protéine FhuA à celle induite par la protéine HgbA contre *A. pleuropneumoniae* sérotype 1, lorsque les protéines sont administrées par voie intranasale. Les formulations vaccinales contiennent FhuA ou HgbA avec pour adjuvant le Proteosome<sup>TM</sup> (ID Biomedical Inc. ; <http://www.idbiomedical.com>), avec ou sans lipopolysaccharides (LPS) (Tableau 1). Pour le deuxième essai nous avons évalué différentes voies d'immunisation (intranasale, intradermique ou intramusculaire), différents adjuvants (Proteosomes<sup>TM</sup>, Emulsigen) ainsi que l'effet d'un immunomodulateur sur la réponse immune des porcelets face à *A. pleuropneumoniae*. Pour ce faire nous avons intégré les deux protéines dans les formulations en présence ou en absence de CpG. Les CpG sont des séquences d'ADN bactérien immunostimulatrices définies par la présence de motifs CpG non méthylés dans leur structure (Pisetsky, 1996). Les CpG peuvent être intégrées dans une formulation vaccinale afin d'augmenter la réponse immunitaire. Le Proteosome<sup>TM</sup> (ID Biomedical Inc., Laval, QC) est un adjuvant mucosal composé de protéines très hydrophobes de la membrane externe de *Neisseria meningitidis* qui vont former des vésicules de 60-100 nm de diamètre (Curtis *et al.*, 1990). L'Emulsigen est un adjuvant du type huile dans l'eau qui peut être administré par voie intradermique ou par voie intramusculaire.

## Matériel et méthodes

### Souches bactériennes, plasmides et condition de croissance

La souche de référence d'*A. pleuropneumoniae* S4074 et la souche de champ d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 AP37 ont été ensemencées sur des géloses brain heart infusion (BHI; Difco Laboratories) supplémentées par du NAD (15 µg/ml). Les souches d'*E. coli* BL21 (DE3) transformées par les plasmides pLM202 (Mikael *et al.*, 2002) ou pRSC04 (Srikumar *et al.*, 2004) ont été ensemencées dans des bouillons Luria-Bertani (LB; Difco Laboratories) supplémentés par de la kanamycine (30 µg/ml). Les géloses et bouillons ont été incubés pour la nuit à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

### Expression et purification des protéines recombinantes FhuA et HgbA

Les souches d'*E. coli* BL21 portant soit le plasmide pLM202 soit le plasmide pRSC04 ont été cultivées pour la nuit à 37°C. Les plasmides pLM202 et pRSC04 portent respectivement la séquence mature de *fhuA* et la séquence mature de *hgbA* dans les vecteurs d'expressions pET30a (Promega) ou pBK-CMV (Stratagene). Les protéines recombinantes acquièrent une queue hexahistidine, au niveau N-terminal (pour FhuA) et au niveau C-terminal (pour HgbA), qui va permettre leur purification sur une colonne d'agarose Ni<sup>++</sup>-NTA (Amersham). La production de protéines recombinantes est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG pendant 3 heures à 25°C. Étant donné que les protéines recombinantes ne possèdent pas la séquence signal qui permet leur exportation vers la membrane externe elles vont former des corps d'inclusions dans le cytosol. Les corps d'inclusions ont été isolés par centrifugation et le culot congelé. Le jour suivant, les corps d'inclusions ont été suspendus dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) et soniqués pour 5 minutes. Par la suite la solution a été centrifugée à 10000 rpm pour 20 minutes et le culot solubilisé dans 20 ml de 6 M guanidine hydrochloride pH 8 (100 mM Tris pH8, 300 mM NaCl, 6 M GnHCl). Afin de culotter les débris, la solution a été centrifugée et le surnageant filtré à travers un filtre de 0.45 µM. La préparation a été chargée sur une colonne d'agarose Ni<sup>++</sup>-NTA puis éluée avec un solution d'imidasol (100 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 4 M Urea,

1 M imidazole). Les fractions collectées ont été dialysées contre une solution de 0.1% TEEN (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Empigen (Calbiochem)) pendant 24 heures.

### **Extraction des LPS d'*A. pleuropneumoniae***

*A. pleuropneumoniae* S4074 a été ensemencée sur des géloses BHI supplémentées par du NAD (15 µg/ml). Le jour suivant, les colonies ont été suspendues dans du PBS avec 0.5% de formaldéhyde et incubées une nuit à 4°C. Le lendemain, la DO<sub>540</sub> a été ajustée à une valeur d'environ 0.25. Afin de dissocier les membranes cellulaires, les cellules ont été bouillies pendant une heure et la solution a été centrifugée à 12000 g pendant 45 minutes. Le surnageant a été filtré, incubé pendant 30 minutes avec un volume équivalent de phénol à 90% et centrifugé à 12000 g pendant 30 minutes. Cette étape a été répétée deux fois. Pour terminer, la phase aqueuse, contenant les LPS, a été dialysée contre de l'eau pendant 24 heures et lyophilisée.

### **Immunisations et infections expérimentales**

Les protéines purifiées FhuA et HgbA ont soit été complexées à l'adjuvant mucosal Proteosome™ (ID Biomedical Inc.) ou à l'Emulsigen (MVP Laboratories Inc, Ralston, NE), un adjuvant du type huile dans l'eau. Par la suite l'Empigen contenu dans les formulations avec le Proteosome™ a été éliminé par des dialyses et l'incorporation de l'antigène, la pureté et la solubilité du complexe ont été analysées (Figure1) (Mallett *et al.*, 1995).

Notre premier essai (Expérience I) a été effectué en utilisant des formulations vaccinales contenant soit FhuA soit HgbA avec des Proteosome™ avec ou sans LPS d'*A. pleuropneumoniae* (Tableau 1). Les formulations ont été administrées par voie intranasale à des porcelets exempts de microorganismes pathogènes (SPF). Pour notre deuxième essai (Expérience II) nous avons formulé des vaccins avec FhuA, HgbA et un adjuvant (Emulsigen ou Proteosome™) avec ou sans immunomodulateur. Ces formulations ont été administrées à des porcelets SPF par

différentes voies d'immunisations (intranasale, intradermique ou intramusculaire) (Tableau 2). Comme contrôle nous avons utilisé un vaccin déjà commercialisé : Pleurostar<sup>TM</sup> (Novartis). Pleurostar<sup>TM</sup> est un vaccin sous-unitaire, pentavalent qui protège les porcs contre les sérotypes 1, 2, 5, 7 et 9 d' *A. pleuropneumoniae*.

Afin de tester l'efficacité de nos formulations vaccinales des groupes de 6 porcelets exempts de microorganismes pathogènes ont été immunisés à 4, 6 et 8 semaines d'âge (jours 0, 14 et 28). Les immunisations intranasales ont été effectuées avec un nébuliseur, les immunisations intramusculaires ont été effectuées dans les muscles du cou des animaux, tandis que les immunisations intradermiques ont été effectuées à l'aide de l'appareil AgroJet (Willson, 2004) (« low-pressure, needle-free jet injector »). Des échantillons de sang ont été prélevés de la veine jugulaire aux jours 0, 14, 28 et 42 (avant les immunisations aux jours 0, 14 et 28 ou avant l'infection expérimentale au jour 42). À 10 semaines d'âge les porcelets avec la meilleure réponse immunitaire pour le premier essai (n=24) et tous les porcelets pour le deuxième essai (n=48), ont été infectés expérimentalement avec la souche virulente *A. pleuropneumoniae* AP37 de sérotype 1 (Willson *et al.*, 1995). L'infection consiste à exposer les porcs durant 10 minutes, dans une chambre en plexiglass, à des aérosols produits à partir d'une suspension bactérienne ( $10^6$  cfu/ml) (Willson *et al.*, 1995).

## Méthodes immunologiques

La réponse immune des porcelets vaccinés a été évaluée par des tests ELISA pour les IgG et les IgA sériques. Pour ce faire 1 µg d'antigène a été immobilisé, pour la nuit, au fond de plaques 96 puits (Nunc-Immuno Maxisorp). Le lendemain, après avoir bloqué les puits pour une heure à température ambiante avec une solution de gélatine 0.5%, différentes dilutions de sérums porcins ont été testées (1/100, 1/1000, 1/10000, 1/50000 pour les IgG et 1/2, 1/5, 1/10, 1/40 pour les IgA). Les plaques ont été incubées à 37°C pour une heure. Les anticorps utilisés pour la détection des IgG étaient des immunoglobulines de chèvre anti-IgG de porc couplées à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Afin de détecter les IgA, des

immunoglobulines de souris anti-IgA porcin (Serotec) ont été utilisées. Cette étape a été suivie par une incubation avec des immunoglobulines de chèvre anti-IgG murin biotinyllées (Zymed) et d'un conjugué combiné à l'avidine-peroxydase (Sigma). Une détection colorimétrique a été effectuée sur toutes les plaques grâce au 3,3',5,5'-TetraMethylBenzidine (TMB; Zymed). Après quelques minutes de développement, la réaction a été arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et la DO a été lue à une longueur d'onde de 450 nm. Des courbes standard d'IgG et d'IgA porcin ont été utilisées afin de déterminer les quantités d'immunoglobulines contenues dans les sérums porcins.

### **Microscopie électronique à transmission**

Les vésicules contenues dans nos formulations vaccinales à base de Proteosome<sup>TM</sup> ont été visualisées grâce à un microscope électronique à transmission Philips 420 en utilisant une technique de coloration négative. Sur des grilles de cuivre de 150 mesh recouvertes de formvar une goutte de formulation vaccinale a été déposée. Après une minute, l'excès de liquide a été retiré sans assécher la grille et une goutte de colorant (acide phosphotungstique 2%, BSA 0.001%) a été ajoutée. Pour finir l'excès de colorant a été retiré sans assécher la grille et la grille a été déposée sur un papier filtre quelques minutes. Le voltage utilisé est de 80Kv et les grossissements sont de 13 500x, 18 500x, 37 500x et de 105 000x. Afin de déterminer la taille des vésicules des grilles standards ont été utilisées.

## **Résultats**

### **Expérience I**

Lors de notre premier essai nous avons voulu comparer la protection induite par chacune de nos protéines recombinantes, FhuA et HgbA, administrées par la voie intranasale. Étant donné que le vaccin contient soit FhuA soit HgbA nous avons évalué le niveau d'anticorps anti-FhuA chez les groupes 1, 2 et 3 (vaccinés avec FhuA) (Figures 2 et 3) et le niveau d'anticorps anti-HgbA chez les groupes 4, 5 et 6 (vaccinés avec HgbA) (Figure 4 et 5). À la fin de la première série d'immunisations (Tableau 1), la disponibilité de locaux ne nous permettait d'infecter que 4 des 6

groupes de porcelets. Nous avons donc choisi d'infecter deux groupes (un vacciné avec FhuA l'autre avec HgbA) ayant induit la meilleure réponse immunitaire après deux immunisations ainsi que les deux groupes contrôles 7 et 8.

Après 28 jours d'immunisation, les porcelets immunisés avec les formulations contenant la protéine FhuA (groupes 1, 2 et 3) développent un niveau d'IgG sérique anti-FhuA similaire (~ 1300 ng/ml) (Figure 2). Le niveau d'IgA sérique anti-FhuA synthétisé est inférieur à celui des IgG anti-FhuA et il varie de 22 à 43 ng/ml (Figure 3). La figure 2 montre également que le niveau d'IgG anti-FhuA produit par les porcelets vaccinés avec les formulations contenant la protéine FhuA et l'adjuvant Proteosomes<sup>TM</sup> (groupes 1, 2 et 3) est similaire au niveau produit par le contrôle négatif (groupe 7) (~ 1600 ng/ml). Étant donné que les niveaux d'IgG spécifiques synthétisés par les groupes contenant la protéine FhuA (groupes 1, 2 et 3) sont identiques (Figure 2), nous avons décidé d'infecter les porcelets immunisés avec la formulation FhuA-Proteosomes<sup>TM</sup> 1:4 (groupe 2) qui, après 28 jours d'immunisation, induit légèrement plus d'IgA anti-FhuA que les autres groupes (Figure 3).

Après deux immunisations, la formulation HgbA- Proteosomes<sup>TM</sup>- LPS 1:2:1 (groupe 6) (~ 900 ng/ml) induit la meilleure synthèse d'IgG sérique anti-HgbA suivie de près par la formulation HgbA- Proteosomes<sup>TM</sup> 1:4 (groupe 5) (~ 850 ng/ml) (Figure 4). En général, les porcelets synthétisent moins d'IgA sérique anti-HgbA (95-142 ng/ml) que d'IgG anti-HgbA (Figure 5). La formulation HgbA- Proteosomes<sup>TM</sup> 1:4 (groupe 5) (142 ng/ml) induit la meilleure synthèse d'IgA anti-HgbA suivie de près par la formulation HgbA- Proteosomes<sup>TM</sup> 1:1 (groupe 1) (137 ng/ml) (Figure 5). Étant donné que la formulation 5 induit la meilleure synthèse d'IgA anti-HgbA (Figure 5) et la deuxième meilleure synthèse d'IgG anti-HgbA (Figure 4) nous avons décidé d'infecter les porcelets immunisés par avec formulation HgbA-Proteosomes<sup>TM</sup> 1:4 (groupe 5) afin de faciliter la comparaison avec le groupe 2.

Après 24 heures d'infection expérimentale, nous avons observé et évalué sur une échelle de 0 à 9, les signes cliniques (Figure 6). Les porcelets non immunisés (groupe 7) ont été plus affectés que les porcelets immunisés avec la protéine

recombinante HgbA (groupe 5) et avec le vaccin Pleurostar<sup>TM</sup> (groupe 8). L'étude de l'étendue des lésions pulmonaires (Figure 7) a montré que 80% des poumons des porcelets non immunisés (groupe 7) sont affectés par *A. pleuropneumoniae* alors que les poumons des porcelets immunisés avec FhuA (groupe 2), HgbA (groupe 5) et avec Pleurostar<sup>TM</sup> (groupe 8) sont moins affectés. Pour terminer nous avons étudié la survie, après 36 heures, des porcelets infectés avec *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (Figure 8). Nous avons constaté que tous les porcelets immunisés avec Pleurostar<sup>TM</sup> (groupe 8) ont survécu et que tout de même 66% des porcelets immunisés avec la protéine recombinante FhuA (groupe 2) et 33% des porcelets immunisés avec la protéine recombinante HgbA (groupe 5) ont survécu.

## Expérience II

Lors du deuxième essai nous avons voulu comparer l'efficacité de l'adjuvant mucosal Proteosome<sup>TM</sup> avec celle de l'Emulsigen, administré par les voies intradermique ou intramusculaire, combinés aux protéines recombinantes FhuA et HgbA. Nous avons également voulu évaluer les effets d'un immunomodulateur sur la réponse immune. Étant donné que toutes les formulations contenaient les deux protéines nous avons modifié le protocole des tests ELISA afin de tester simultanément les anticorps contre les deux antigènes.

Après trois immunisations, la formulation induisant le plus haut niveau d'IgG sérique anti-FhuA et anti-HgbA (~16000 ng/ml) est FhuA-HgbA (1:1) complexé avec l'Emulsigen et les CpG, administrée par la voie intramusculaire (groupe 11). Cette formulation est suivie de près par le vaccin commercial additionné de FhuA et HgbA également administré par la voie intramusculaire (groupe 14) (Figure 9). Après 28 jours d'immunisation, les formulations administrées par la voie intradermique (groupes 12 et 13) semblent conférer moins de réponse immune que les formulations administrées par la voie intramusculaire, mais après la troisième immunisation, le niveau d'IgG spécifique augmente pour atteindre des valeurs approximatives de 9000 ng/ml pour la formulation 12 et 6000 ng/ml pour la formulation 13 (Figure 9). Il est

intéressant de remarquer qu'après la troisième immunisation la production d'IgG anti-FhuA et anti-HgbA augmente pour toutes les formulations (Figure 9).

Les formulations contenant du Proteosome™ (groupe 9) induisent la plus faible synthèse d'IgG anti-FhuA et anti-HgbA (2000 ng/ml) (Figure 9) mais un niveau d'IgA anti-FhuA et anti-HgbA (21 ng/ml) similaire (Figure 10). En fait, après trois immunisations, toutes les formulations induisent un niveau similaire d'IgA anti-FhuA et anti-HgbA (~ 22 ng/ml) sauf pour le vaccin FhuA-HgbA (1:1) avec l'Emulsigen et les CpG administré par la voie intramusculaire (group 11) (52 ng/ml) (Figure 10).

Nous avons infecté expérimentalement, avec une souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1, tous les porcelets de la deuxième expérience. Étant donné l'ampleur de l'expérience nous avons décidé d'infecter trois porcelets de chaque groupe au 39<sup>ème</sup> jour et le reste des porcelets une semaine plus tard (jour 46). Après 24 heures d'infection expérimentale, nous avons observé et évalué sur une échelle de 0 à 9, les signes cliniques (Figure 11). Les formulations 9, 10 et 12 semblent induire un degré de signes cliniques similaires (2.33 - 2.83), tout comme les formulations 11, 13, 14, 15 et 16 (0.833 - 1.5) (Figure 11). Aucun des groupes n'a développé de signes cliniques graves. Pour terminer nous avons étudié la survie, après 96 heures, des porcelets infectés par *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (Figure 12). La meilleure survie a été observée chez les porcelets ayant reçu le vaccin commercial (groupes 14 et 16). Il faut également noter que la formulation 11, qui induisait le plus haut niveau d'IgA anti-FhuA et anti-HgbA, montre également une diminution de mortalité (Figure 12). Après l'infection au 39<sup>ème</sup> jour les formulations 11 et 12 induisaient des protections similaires alors que lors de l'infection une semaine plus tard la formulation 11 semble être aussi efficace que les formulations contenant le vaccin commercial (groupes 14 et 16).

## Microscopie électronique à transmission

Lors de notre première expérience nous avons décidé d'infecter expérimentalement les porcelets des groupes 2 et 5 par la souche virulente *A. pleuropneumoniae* AP37 de sérotype 1. Par la suite nous avons voulu visualiser les vésicules formées par les Proteosome<sup>TM</sup> et les antigènes dans ces préparations vaccinales. Pour ce faire nous avons utilisé un microscope électronique à transmission et coloré nos échantillons grâce à la technique de coloration négative.

Les images de microscopie électronique des formulations vaccinales FhuA-Proteosomes<sup>TM</sup> 1:4 (groupe 2) (Figure 13) et HgbA-Proteosomes<sup>TM</sup> 1:4 (groupe 5) (Figure 14) démontrent la présence de vésicules entre 50 et 100 nm de diamètre. Ces résultats sont en accord avec les caractéristiques des Proteosome<sup>TM</sup> énumérées précédemment (Curtis *et al.*, 1990).

## Discussion et conclusion

Au cours de nos expériences nous avons voulu comparer l'effet protecteur de deux protéines de la membrane externe d'*A. pleuropneumoniae*, FhuA et HgbA, administrées par la voie intranasale, deux adjuvants, Proteosome<sup>TM</sup> et Emulsigen ainsi que différentes voies d'immunisation (intranasale, intradermique ou intramusculaire). Nous avons constaté que le niveau d'IgA sérique était toujours inférieur au niveau d'IgG sérique. Cette observation était prévisible étant donné que nous avons recherché la présence d'anticorps dans le sang où prédominent les IgG et non dans les sécrétions mucosales où prédominent les IgA.

Lors de notre premier essai nous avons comparé la protection induite par FhuA et HgbA, administrées par la voie intranasale avec ou sans LPS d'*A. pleuropneumoniae*. Les résultats de survie montrent que la protéine FhuA (groupe 9) est capable d'induire une protection partielle contre la pleuropneumonie porcine. Tout comme FhuA, la protéine HgbA (groupe 12) est capable de protéger les porcelets, mais moins efficacement. Il faut également noter que les signes cliniques ainsi que l'étendue des lésions pulmonaires sont atténués chez les porcelets immunisés par HgbA comparativement aux porcelets non immunisés. Ces résultats indiquent que

HgbA peut également protéger partiellement les porcelets contre *A. pleuropneumoniae* sérotype 1.

Lors de notre deuxième essai nous avons voulu comparer le Proteosome™ à l'Emulsigen ainsi que différentes voies d'immunisation (intranasale, intradermique ou intramusculaire). De plus, nous avons voulu évaluer l'effet protecteur d'un immunomodulateur. Nos résultats ont démontré que le plus faible niveau d'IgG anti-FhuA et anti-HgbA est induit par la formulation contenant les Proteosome™ (groupe 9), mais que le niveau d'IgA anti-FhuA et anti-HgbA induit est similaire à celui des autres groupes. Cette observation peut être expliquée par le fait que le Proteosome™ est un adjuvant mucosal et que les immunisations intranasales induisent une plus grande production d'IgA que d'IgG. Nos résultats indiquent également que la formulation FhuA-HgbA (1:1) complexée avec l'Emulsigen et les CpG, administrée par la voie intramusculaire (groupe 11) induit la meilleure production d'IgA anti-FhuA et anti-HgbA. Ceci pourrait indiquer que les CpG favorisent la production d'IgA. Étant donné qu'après la troisième immunisation la production d'IgG anti-FhuA et anti-HgbA est augmentée chez tous les groupes, nous pouvons supposer que la troisième immunisation est essentielle pour augmenter le niveau d'anticorps ainsi que pour conférer une protection contre *A. pleuropneumoniae*.

Lorsque nous comparons les deux essais, nous constatons que le niveau d'IgG spécifiques obtenu après le deuxième essai est jusqu'à dix fois supérieur au niveau obtenu lors du premier essai. Par contre, le niveau d'IgA spécifique est comparable. Ceci indique que l'Empigen est un meilleur adjuvant pour induire la production d'IgG et que les deux adjuvants sont comparables dans l'induction de la synthèse d'IgA. Nous avons également constaté qu'après 24 heures d'immunisation, les signes cliniques observés dans la première expérience sont plus élevés que ceux de la deuxième expérience, indiquant que la combinaison des deux protéines recombinantes, FhuA et HgbA, dans des formulations vaccinales induit une meilleure protection qu'une seule protéine.

Les résultats de survie obtenue après avoir infecté la moitié des porcelets après 39 jours sont différents de ceux obtenus avec les porcelets immunisés une

semaine plus tard (jour 46). Les porcelets infectés au 46<sup>ème</sup> jour avec les formulations 9, 10, 11, et 14 étaient mieux protégés que les porcelets des mêmes groupes mais infectés une semaine plus tôt. Ces résultats indiquent qu'une semaine supplémentaire pour produire des anticorps contre les protéines recombinantes FhuA et HgbA est essentielle pour augmenter la protection contre *A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Il faut également noter, qu'après 46 jours d'immunisation, FhuA et HgbA sont capables de protéger aussi efficacement les porcelets contre une infection par *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 que par Pleurostar<sup>TM</sup>. Lorsque nous comparons la production d'anticorps spécifiques avec les résultats d'infections expérimentales nous constatons une meilleure corrélation entre la protection et le niveau d'IgA qu'avec le niveau d'IgG.

Grâce à tous ces résultats, nous pouvons donc conclure que les protéines recombinantes FhuA et HgbA sont immunogènes et confèrent une protection partielle contre la pleuropneumonie porcine. Étant donné que FhuA et HgbA sont capables d'induire une protection chez le porc, ils sont de bons candidats pour un vaccin sous-unitaire contre la pleuropneumonie porcine.

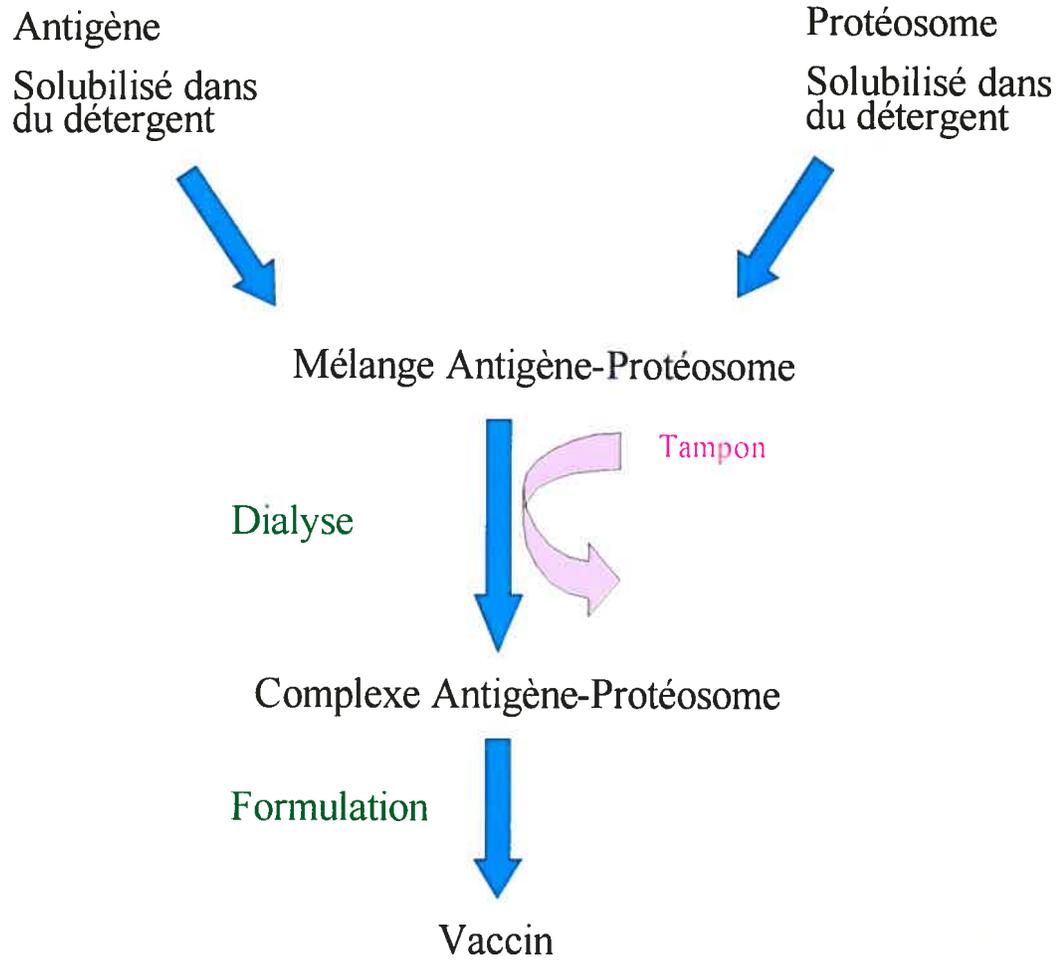
**Tableau 1.** Formulations vaccinales de l'expérience I.

<b>Groupe</b>	<b>Formulation</b>	<b>Voie d'administration</b>
1	100 µg FhuA + 100 µg Proteosomes <sup>TM</sup> ratio 1:1	Intranasale
2	100 µg FhuA + 400 µg Proteosomes <sup>TM</sup> ratio 1:4	Intranasale
3	100 µg FhuA + 200 µg Proteosomes <sup>TM</sup> + 100 µg LPS ratio 1:2:1	Intranasale
4	100 µg HgbA + 100 µg Proteosomes <sup>TM</sup> ratio 1:1	Intranasale
5	100 µg HgbA + 400 µg Proteosomes <sup>TM</sup> ratio 1:4	Intranasale
6	100 µg HgbA + 200 µg Proteosomes <sup>TM</sup> + 100 µg LPS ratio 1:2:1	Intranasale
7	Contrôle négatif	Intramusculaire
8	Contrôle positif (Pleurostar APP, Novartis)	Intramusculaire

**Tableau 2.** Formulations vaccinales de l'expérience II.

<b>Groupe</b>	<b>Formulation</b>	<b>Voie d'administration</b>
9	100 µg FhuA + 100 µg HgbA + 300 µg Proteosomes <sup>TM</sup> + 100 µg LPS ratio 1 :3 :1	Intranasale
10	25 µg FhuA + 25 µg HgbA + Emulsigen	Intramusculaire
11	25 µg FhuA + 25 µg HgbA + Emulsigen + CpG	Intramusculaire
12	25 µg FhuA + 25 µg HgbA + Emulsigen	AgroJet (ID) <sup>a</sup>
13	25 µg FhuA + 25 µg HgbA + Emulsigen + CpG	AgroJet (ID) <sup>a</sup>
14	25 µg FhuA + 25 µg HgbA + Pleurostar APP	Intramusculaire
15	Contrôle négatif	Intramusculaire
16	Contrôle positif (Pleurostar APP, Novartis)	Intramusculaire

<sup>a</sup> Intradermique



**Figure 1.** Processus de compléxation Antigène-Proteosome™.

## Expérience I

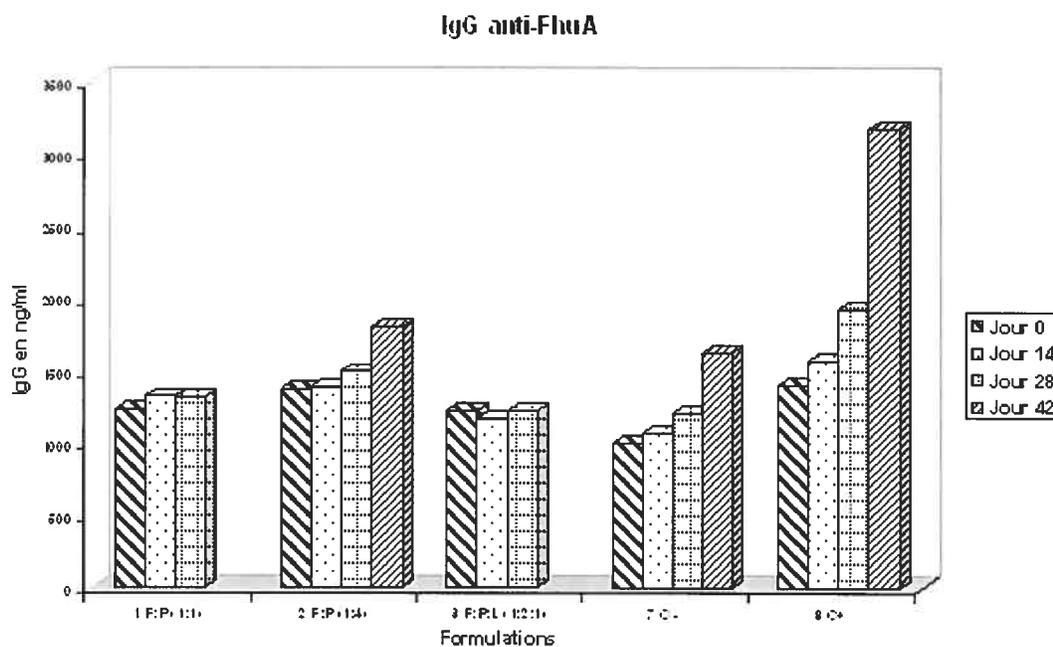


Figure 2. Réponse sérique en ng/ml des IgG anti-FhuA chez les porcelets immunisés par les formulations 1, 2, 3, 7 et 8. (F = FhuA; P = Proteosomes<sup>TM</sup>, L = LPS; C = Contrôle)

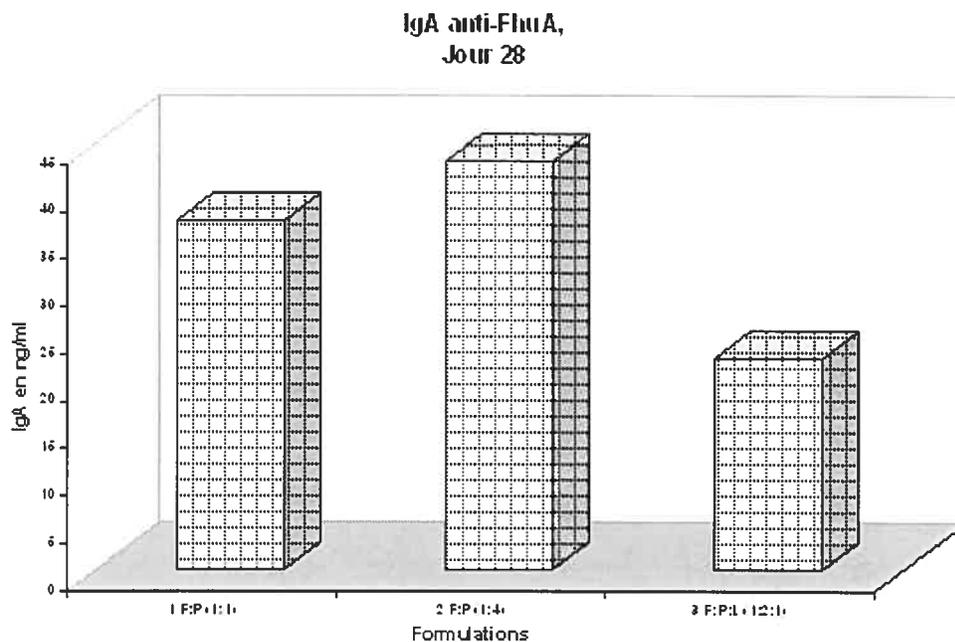


Figure 3. Réponse sérique en ng/ml des IgA anti-FhuA chez les porcelets immunisés par les formulations 1, 2 et 3. (F = FhuA; P = Proteosomes<sup>TM</sup>, L = LPS)

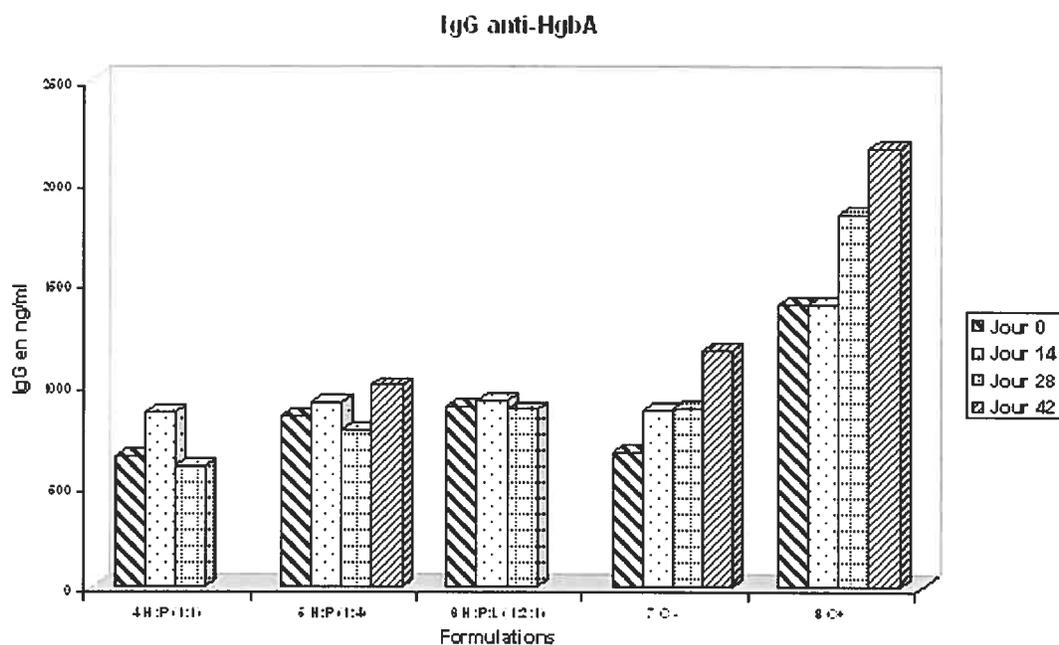


Figure 4. Réponse sérique en ng/ml des IgG anti-HgbA chez les porcelets immunisés par les formulations 4 à 8. (H = HgbA; P = Proteosomes<sup>TM</sup>; L = LPS; C = Contrôle)

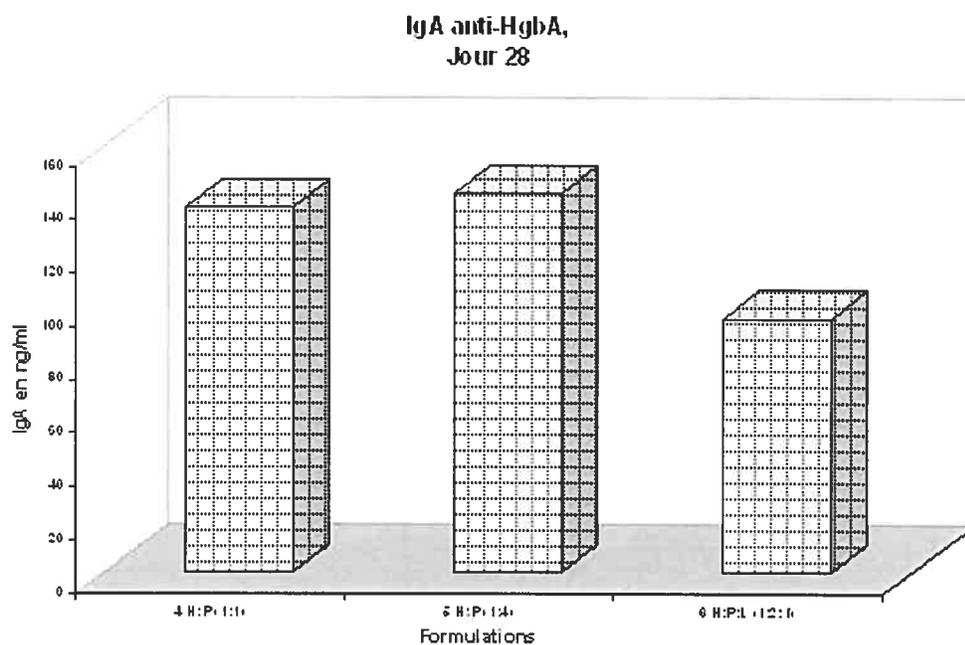


Figure 5. Réponse sérique en ng/ml des IgA anti-HgbA chez les porcelets immunisés par les formulations 4, 5 et 6. (H = HgbA; P = Proteosomes<sup>TM</sup>; L = LPS)

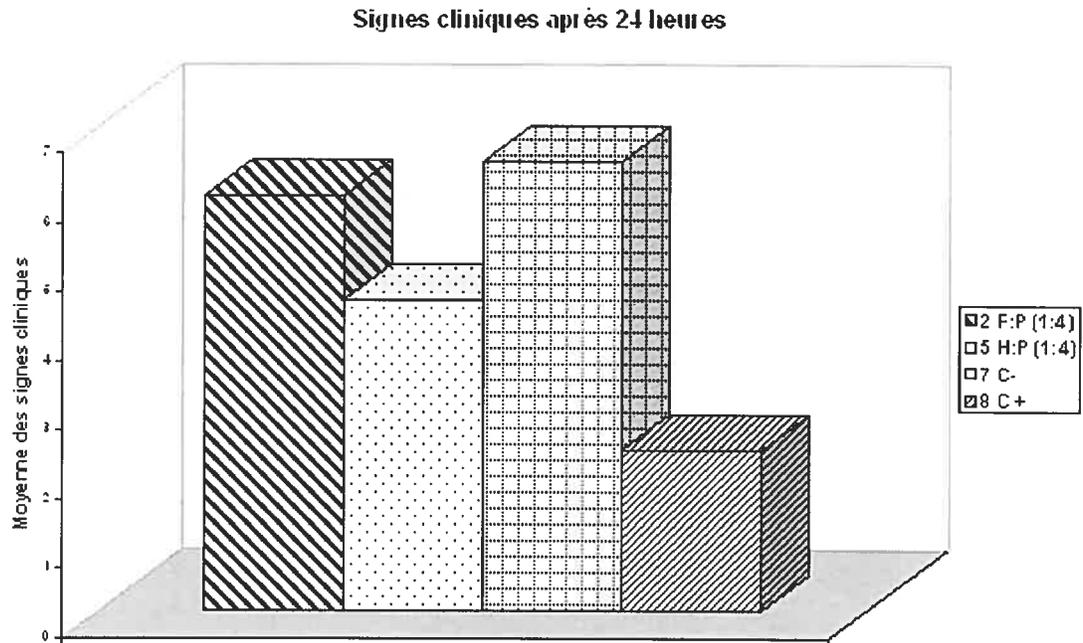


Figure 6. Signes cliniques observés après 24 heures chez les porcelets immunisés par les formulations 2, 5, 7 et 8 infectés expérimentalement avec la souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* AP37. (résultats moyens sur 9; somme de 3 échelles de 0 à 3) (F = FhuA; H = HgbA; P = Proteosomes<sup>TM</sup>; C = Contrôle).

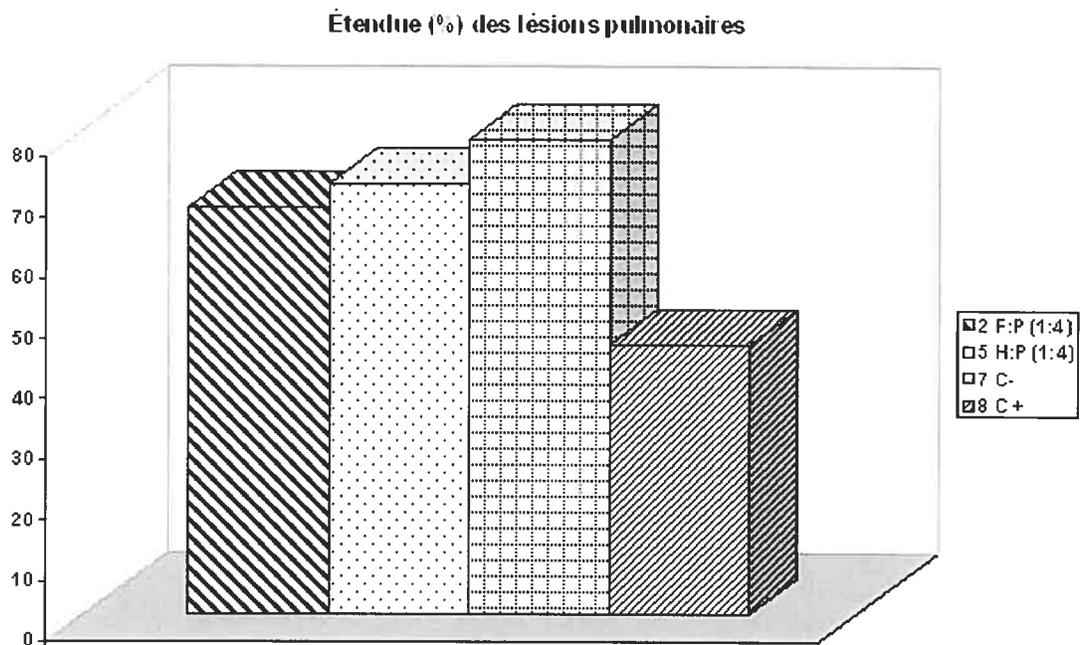


Figure 7. Lésions pulmonaires observées chez les porcelets immunisés par les formulations 2, 5, 7 et 8 infectés expérimentalement avec la souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* AP37. (F = FhuA; H = HgbA; P = Proteosomes<sup>TM</sup>; C = Contrôle).

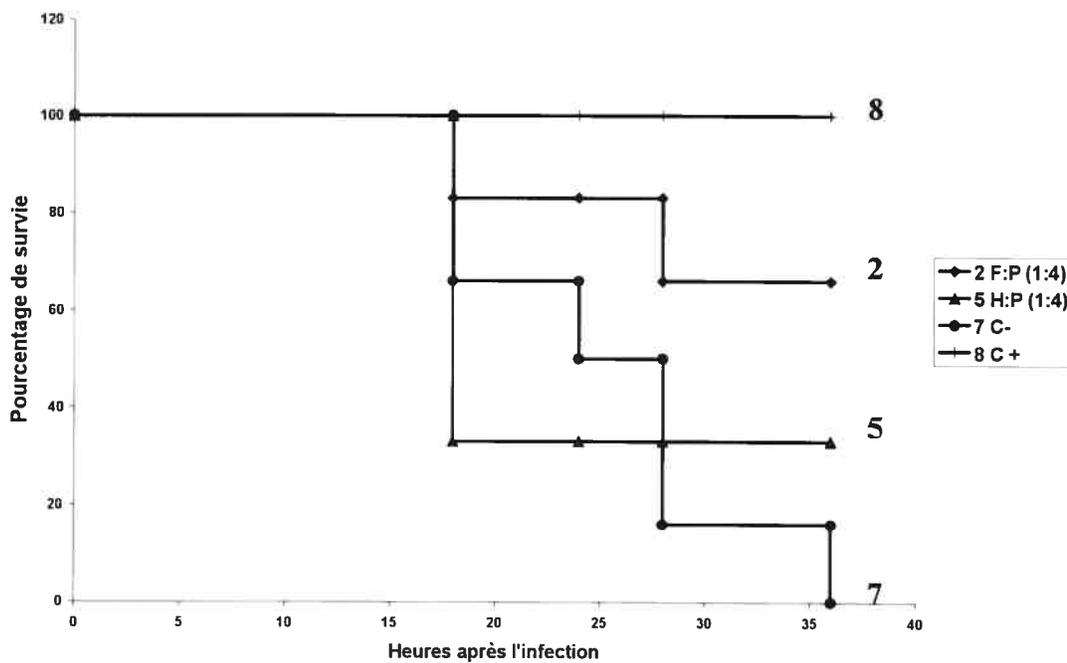


Figure 8. Survie des porcelets immunisés par les formulations 2, 5, 7 et 8 infectés expérimentalement avec la souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* AP37. (F = FhuA; H = HgbA; P = Proteosomes<sup>TM</sup>; C = Contrôle).

## Expérience II

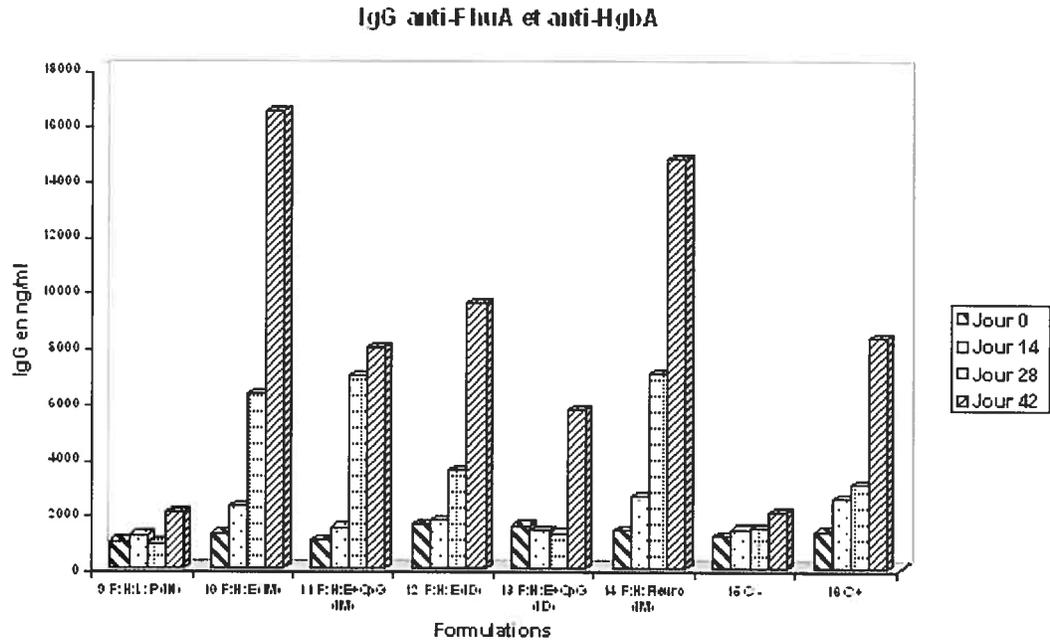


Figure 9. Réponse sérique en ng/ml des IgG anti-FhuA et anti-HgbA chez les porcelets immunisés par les formulations 9 à 16. (F = FhuA; H = HgbA; L = LPS; E = Emulsigen; Pleuro = Pleurostar<sup>TM</sup>; C = Contrôle; IN = Intranasale; IM = Intramusculaire; ID = Intradermique).

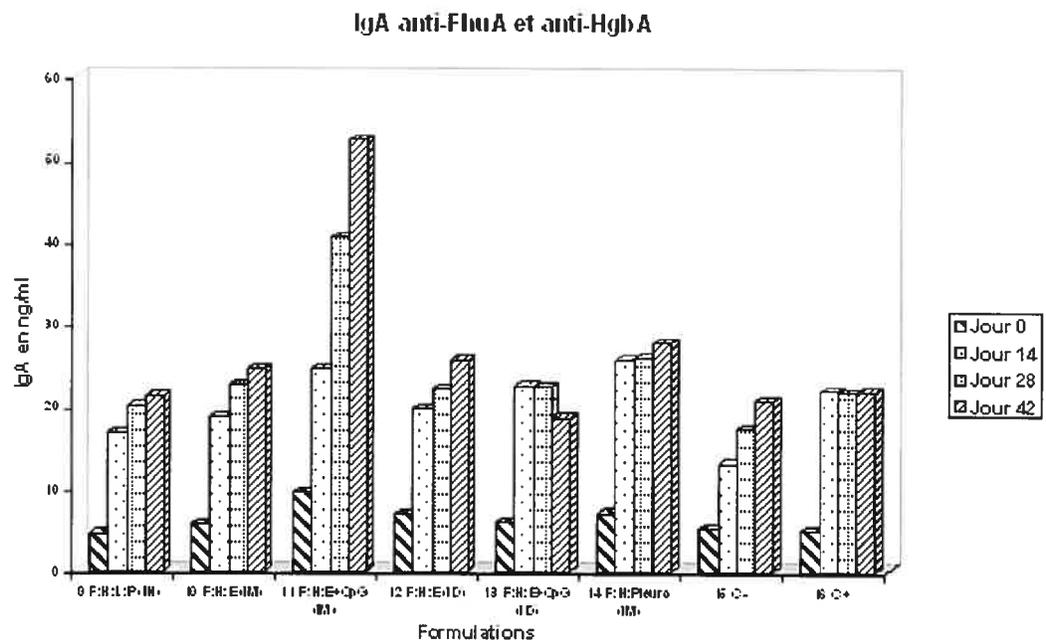


Figure 10. Réponse sérique en ng/ml des IgA anti-FhuA et anti-HgbA chez les porcelets immunisés par les formulations 9 à 16. (F = FhuA; H = HgbA; L = LPS; E = Emulsigen; Pleuro = Pleurostar<sup>TM</sup>; C = Contrôle; IN = Intranasale; IM = Intramusculaire; ID = Intradermique).

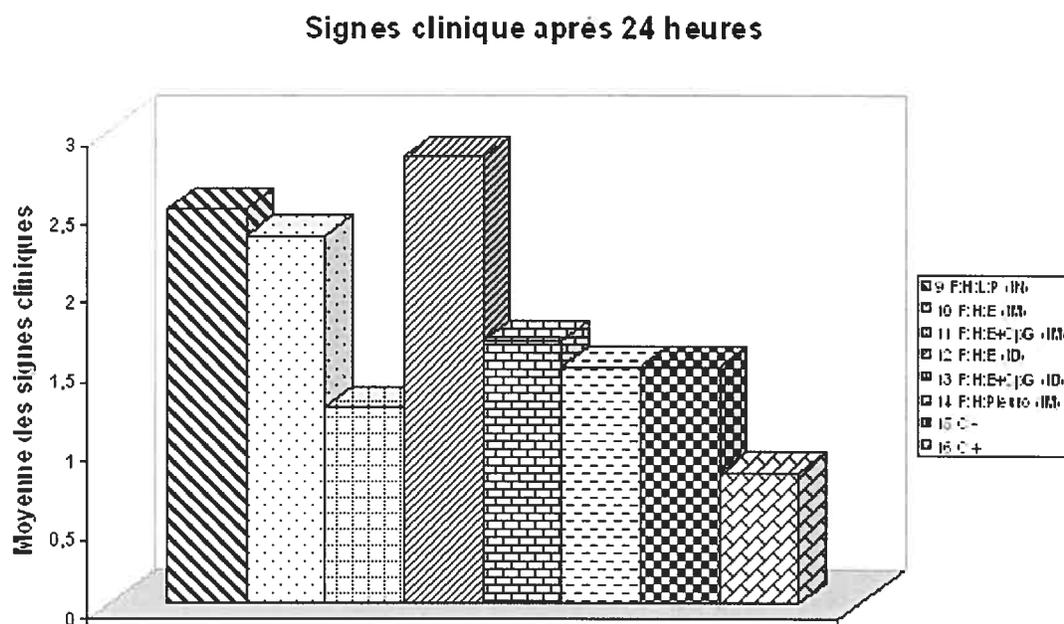
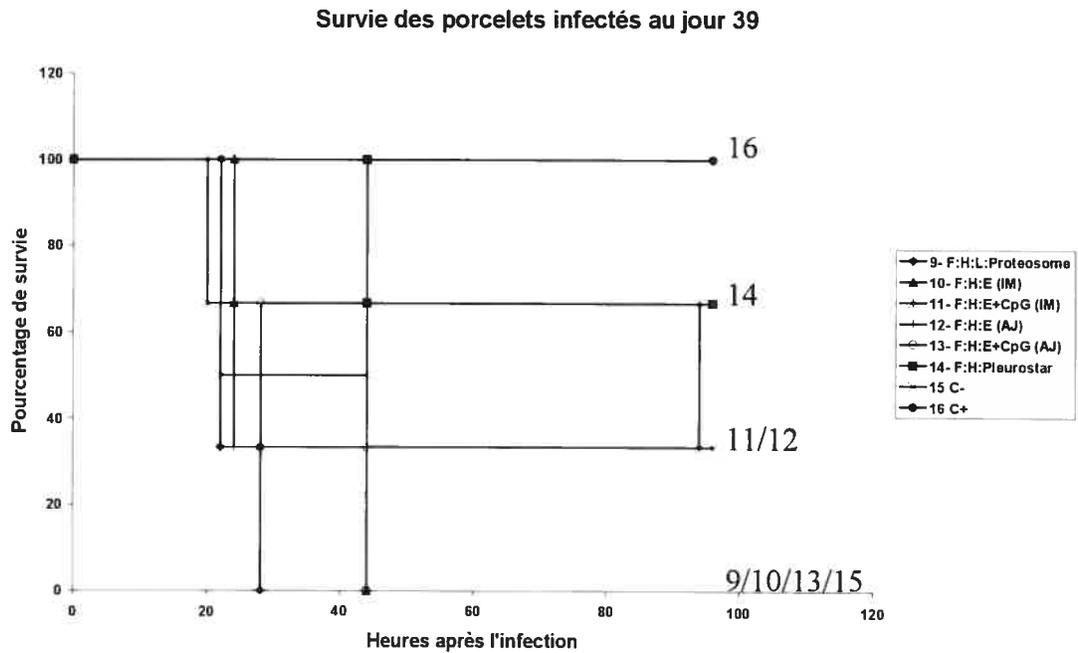


Figure 11. Signes cliniques observés après 24 heures chez les porcelets immunisés par les formulations 9 à 16 infectés expérimentalement avec la souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* AP37. (résultats moyens sur 9; somme de 3 échelles de 0 à 3). (F = FhuA; H = HgbA; L = LPS; E = Emulsigen; Pleuro = Pleurostar<sup>TM</sup>; C = Contrôle; IN = Intranasale; IM = Intramusculaire; ID = Intradermique).

(A)



(B)

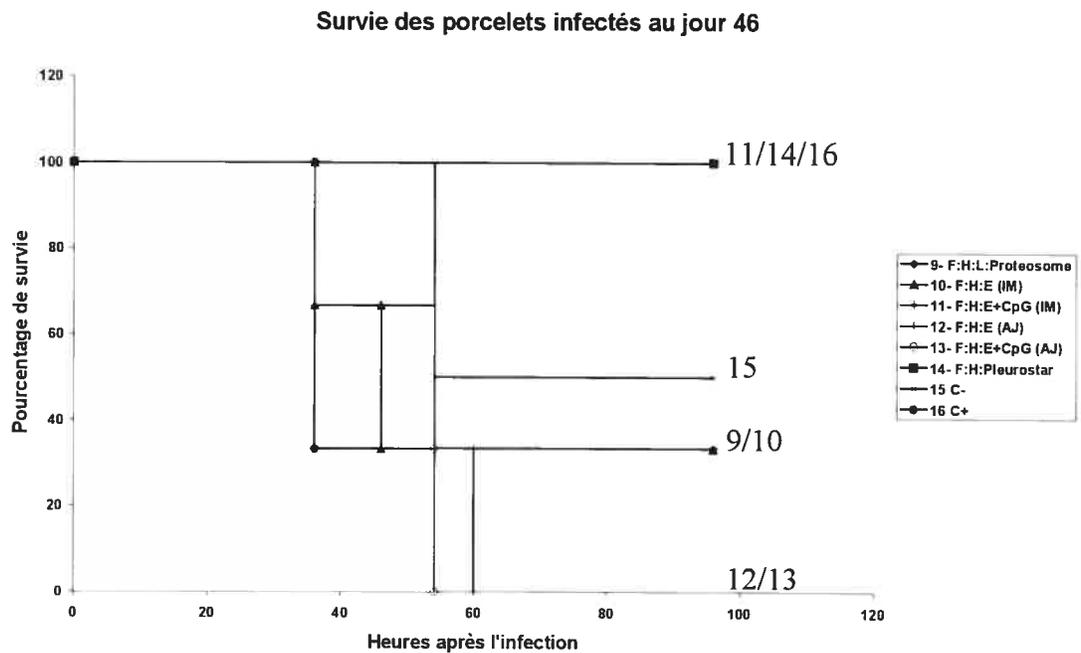


Figure 12. Survie des porcelets immunisés par les formulations 9 à 16 infectés expérimentalement avec la souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* AP37 (A) jour 39 et (B) jour 46. (F = FhuA; H = HgbA; L = LPS; E = Emulsigen; Pleuro = Pleurostar<sup>TM</sup>; C = Contrôle; IN = Intranasale; IM = Intramusculaire; ID = Intradermique).

## Microscopie électronique à transmission

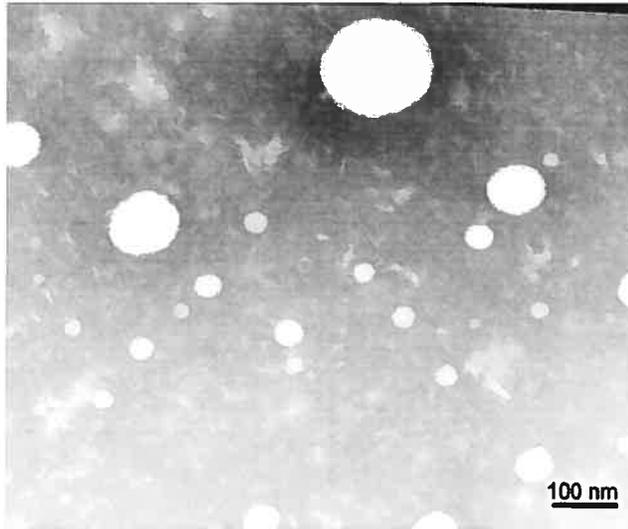


Figure 13. Photo de microscopie électronique à transmission des vésicules présentes dans la formulation vaccinale FhuA- Proteosomes<sup>TM</sup> 1:4 (groupe 2).

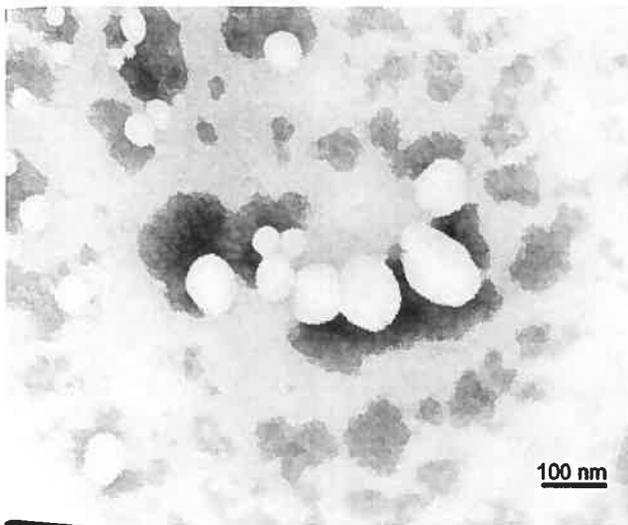


Figure 14. Photo de microscopie électronique à transmission des vésicules présentes dans la formulation vaccinale HgbA- Proteosomes<sup>TM</sup> 1:4 (groupe 5).

# DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

Les bactéries possèdent de nombreux facteurs de virulence qui sont régulés notamment par la disponibilité des nutriments comme le fer, la température ou encore la quantité d'oxygène dans le milieu. Afin d'acquérir le fer, indispensable à leur croissance, la plupart des bactéries à Gram négatif ont développé, au niveau de la membrane externe, de nombreux systèmes d'acquisition généralement régulés négativement par le fer (Crosa, 1997). L'énergie nécessaire à la translocation du fer à travers la membrane externe est fournie par la force proton motrice de la membrane cytoplasmique grâce au complexe TonB-ExbB-ExbD (Moeck and Coulton, 1998).

*A. pleuropneumoniae*, une bactérie à Gram négatif divisée en 15 sérotypes, est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une grave maladie des voies respiratoires (Bossé *et al.*, 2002). Des vaccins sont déjà commercialisés, mais la plupart se montrent incapables d'induire une protection croisée contre tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et de nombreux problèmes d'innocuité ont été rapportés (Fenwick and Henry, 1994; Haesebrouck *et al.*, 1997).

Dans un milieu carencé en fer *A. pleuropneumoniae* est capable d'utiliser comme source de fer la transferrine porcine, l'hémoglobine et l'hème, ainsi que des sidérophores exogènes comme le ferrichrome, indiquant la présence de récepteurs au niveau de la membrane externe. Le premier récepteur à avoir été étudié est celui de la transferrine. Il est constitué de deux protéines TbpA et TbpB (Gerlach *et al.*, 1992a; Gonzalez *et al.*, 1995). Récemment deux nouveaux récepteurs ont été décrits par notre groupe: celui du ferrichrome (FhuA) (Mikael *et al.*, 2002; Mikael *et al.*, 2003) et celui de l'hémoglobine (HgbA) (Pawelek and Coulton, 2004; Srikumar *et al.*, 2004). FhuA est une protéine de 75 kDa codée par le gène *fhuA* (2 088 bp) qui fait partie de l'opéron *fhuCDBA*. HgbA est une protéine de 105 kDa codée par le gène *hgbA*, un cadre de lecture de 2 885 bp. Les gènes *fhuA* et *hgbA* sont retrouvés chez les sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae*. Comme la plupart des récepteurs du fer, HgbA est régulé négativement par ce dernier mais FhuA ne l'est pas.

Le but de notre étude était d'acquérir une meilleure connaissance de FhuA et HgbA, deux récepteurs du fer, ainsi que d'évaluer leur efficacité en tant qu'agent protecteur contre la pleuropneumonie porcine.

Bien que de nombreuses informations sur FhuA (Mikael *et al.*, 2002; Mikael *et al.*, 2003) et HgbA (Pawelek and Coulton, 2004; Srikumar *et al.*, 2004) soient déjà disponibles nous avons voulu étudier de façon plus détaillée ces deux récepteurs afin de mieux comprendre leur rôle dans la pathogenèse. Étant donné que *fhuA* et *hgbA* sont conservés parmi les sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae* nous avons vérifié que ces gènes sont également présents chez les sérotypes 13, 14 et 15 ainsi que chez 13 souches de champ d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Des analyses PCR, avec des amorces basées sur les séquences matures de *fhuA* et *hgbA*, ainsi qu'un séquençage d'ADN suivi d'une analyse des séquences par un dendrogramme ont permis de démontrer que les gènes *fhuA* et *hgbA* sont très bien conservés parmi tous les sérotypes des deux biotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

Précédemment, deux mutants isogéniques ont été construits dans notre laboratoire. Le premier mutant, DG02, possède une délétion de 1015 pb dans la séquence codante de *fhuA* (Mikael *et al.*, 2003) et le deuxième mutant,  $\Delta hgbA$ , possède une délétion de 650 pb dans la séquence codante d'*hgbA* (Srikumar *et al.*, 2004). La spécificité de FhuA et HgbA à leurs substrats n'étant pas précisément connue, nous avons décidé d'évaluer, par un test de promotion, l'utilisation de nombreuses sources de fer ainsi que des sidérophores par la souche parentale S4074 et par les mutants DG02 et  $\Delta hgbA$ . Nous avons constaté que les deux mutants étaient capables d'utiliser les mêmes sources de fer que la souche parentale, mis à part le ferrichrome pour DG02 et l'hémoglobine pour  $\Delta hgbA$ . Ces résultats nous ont amenés à la conclusion que FhuA et HgbA étaient très spécifiques de leurs substrats respectifs, le ferrichrome et l'hémoglobine.

Étant donné que *fhuA* est exprimé de façon constitutive (Mikael *et al.*, 2003) et que, contrairement aux gènes codant pour les autres récepteurs impliqués dans l'acquisition du fer, il n'est pas régulé par le fer nous avons supposé que FhuA pourrait avoir d'autres fonctions. Afin de déterminer ces fonctions, nous avons utilisé une nouvelle technique le «Phenotype MicroArrays» (Biolog Inc., Hayward, CA) qui permet de tester simultanément environ 2 000 phénotypes de croissance. Le test est effectué dans des plaques de 96 puits contenant différents nutriments ou inhibiteurs. La respiration cellulaire est mesurée grâce à un indicateur de réduction (Bochner *et*

*al.*, 2001; Bochner, 2003). Après avoir comparé le mutant DG02 avec la souche parentale S4074 nous avons constaté que la seule différence reposait sur le fait que le mutant n'était pas capable d'utiliser certains dipeptides comme source d'azote (5 des 280 testés). Ces dipeptides sont Ala-Glu, Val-Glu, Gln-Glu, Gln-Tyr, and Ser-Gln. Ainsi, en plus d'être le récepteur du ferrichrome (un hexapeptide cyclique composé de trois molécules de glycine et de trois molécules de N-acétyl-N-hydroxyornithine) FhuA pourrait jouer un rôle dans le transport de dipeptides spécifiques.

Étant donné que HgbA est régulé négativement par le fer mais que FhuA ne l'est pas, il est probable que HgbA joue un rôle dans la virulence alors que FhuA n'y participe pas. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons comparé la virulence des mutants DG02 et  $\Delta hgbA$  par rapport à celle de la souche parentale S4074 grâce à des infections expérimentales sur des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés. Les résultats ont indiqué que les deux mutants étaient capables d'induire les symptômes et lésions spécifiques d'une infection par *A. pleuropneumoniae* mais la virulence du mutant  $\Delta hgbA$  était atténuée par rapport à celle du mutant DG02 et de la souche parentale S4074. Cette observation est basée sur le fait que les porcelets infectés par le mutant  $\Delta hgbA$  avaient un taux de mortalité plus faible, moins de fièvre, des signes cliniques moins sévères et moins de lésions pulmonaires que ceux infectés par le mutant DG02 ou par la souche parentale S4074. De plus les porcelets infectés par le mutant  $\Delta hgbA$  avaient un gain de poids journalier comparable à celui des porcelets du groupe contrôle et le mutant  $\Delta hgbA$  n'était pas capable de coloniser le tractus respiratoire supérieur. Nos résultats sont en accord avec ceux de Baltes et ses collaborateurs (Baltes *et al.*, 2003) qui ont démontré qu'un mutant *fhuA* d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 7 induit une maladie semblable à celle causée par la souche sauvage d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 7. Il faut également noter que *A. pleuropneumoniae* possède de multiples systèmes d'acquisition du fer, il n'est donc pas surprenant que l'inactivation d'un seul de ces systèmes ne soit pas suffisante pour conférer l'avirulence à une souche. Notre hypothèse semble être confirmée: HgbA pourrait jouer un rôle dans la virulence alors que FhuA ne semble pas y participer.

En 2002, Baltés et ses collaborateurs (Baltés *et al.*, 2002) ont cherché à déterminer le rôle joué par le récepteur de la transferrine dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae*. Ils ont démontré que les deux protéines formant le récepteur de la transferrine sont d'importants facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae* car, lors d'une infection expérimentale, ni un mutant  $\Delta tbpB$  ni un mutant  $\Delta tbpA$  n'a été capable d'induire la maladie ou des lésions. De plus ils n'ont pas pu être isolés des poumons, des amygdales ou encore des ganglions lymphatiques et aucune réponse immune n'a été détectée 21 jours après l'infection. À la lumière de tous ces résultats nous pouvons supposer que, contrairement à HgbA et FhuA, les fonctions du récepteur de la transferrine ne peuvent pas être accomplies par d'autres systèmes d'acquisition du fer. Ainsi, le récepteur de la transferrine est un facteur de virulence essentiel à la survie d'*A. pleuropneumoniae*.

Pour compléter notre connaissance de FhuA et HgbA il serait bon de comprendre le rôle exact joué par ces récepteurs du fer dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae*, mais la redondance des systèmes d'acquisition du fer chez *A. pleuropneumoniae* rend l'identification du rôle d'un des systèmes difficile. Afin de contourner ce problème, et pour compléter nos connaissances de FhuA et HgbA, nous pourrions construire des mutants multiples (*fhuA* et/ou *hgbA* avec d'autres systèmes d'acquisition du fer) et les utiliser dans différentes expériences comme des tests de promotion ou des infections expérimentales.

Malgré toutes les connaissances que nous possédons sur FhuA une question fondamentale reste tout de même en suspens: pourquoi *A. pleuropneumoniae* synthétise de façon constitutive un récepteur aussi sophistiqué et spécifique à son ligand que FhuA alors qu'elle ne produit pas de ferrichrome ni ne le trouve dans le milieu ?

Dans des études précédentes, des analyses de Western blot ont permis de démontrer que *fhuA* et *hgbA* étaient exprimés *in vivo* (Mikael *et al.*, 2002; Srikumar *et al.*, 2004). Nous avons démontré par des analyses PCR que *fhuA* et *hgbA* étaient présents chez les 15 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Par un séquençage d'ADN suivi d'une analyse des séquences par un dendrogramme, nous avons constaté que la séquence de *fhuA* des sérotypes 13 et 14 du biotype II est très homologue à celle des sérotypes du biotype I. Ces informations nous ont laissés supposer que FhuA et

HgbA pourraient être d'excellents composants d'un vaccin sous-unitaire contre la pleuropneumonie porcine.

Précédemment dans notre laboratoire deux plasmides, PLM202 (Mikael *et al.*, 2002) et pRSC04 (Srikumar *et al.*, 2004), ont été construits et transformés dans une souche d'*E. coli*. Ces deux plasmides portent respectivement la séquence mature de FhuA et HgbA. Grâce à l'induction de l'expression de ces deux plasmides par de l'IPTG nous avons obtenu une grande quantité de FhuA et d'HgbA purifiées que nous avons utilisée dans de nombreuses formulations vaccinales.

Afin d'optimiser la composition et le mode d'administration de notre vaccin, nous avons décidé d'effectuer deux essais. Pour notre premier essai nous avons voulu comparer la protection induite par FhuA à celle induite par HgbA dans une formulation administrée par la voie intranasale. Pour notre deuxième essai nous avons intégré les deux protéines dans les formulations en présence ou en absence de CpG afin de comparer différentes voies d'immunisation (intranasale, intradermique ou intramusculaire) ainsi que différents adjuvants (Proteosomes<sup>TM</sup>, Emulsigen). Les CpG sont des séquences d'ADN bactérien immunostimulatrices définies par la présence de motifs CpG non méthylés dans leur structure (Pisetsky, 1996). Les CpG peuvent être intégrées dans une formulation vaccinale afin d'augmenter la réponse immunitaire. Le Proteosome<sup>TM</sup> (ID Biomedical Inc., Laval, QC) est un adjuvant mucosal composé de protéines très hydrophobes de la membrane externe de *Neisseria meningitidis* qui vont former des vésicules de 60-100 nm de diamètre (Curtis *et al.*, 1990). L'Emulsigen est un adjuvant du type huile dans l'eau qui peut être administré par voie intradermique ou par voie intramusculaire.

Afin de tester l'efficacité de protection des différentes formulations nous les avons administrés trois fois à deux semaines d'intervalles à des porcelets exempts de microorganismes pathogènes. Une fois les porcelets immunisés nous les avons infectés expérimentalement par une souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Nous avons évalué la réponse immunitaire induite par les formulations vaccinales grâce à des tests ELISA sur les IgG et les IgA sériques.

Les résultats du premier essai ont démontré que les deux protéines, administrés par voie intranasale, étaient capables d'induire une protection partielle contre la pleuropneumonie porcine. Dans le deuxième essai nous avons constaté que

le niveau d'IgG obtenu après une immunisation avec l'adjuvant Proteosomes<sup>TM</sup> était le plus bas alors que le niveau d'IgA était comparable à celui obtenu avec les autres formulations. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que Proteosomes<sup>TM</sup> est un adjuvant mucosal et que les immunisations administrées par voie intranasale induisent généralement plus la production d'IgA que la production d'IgG. Nous avons également constaté qu'après 46 jours d'immunisation FhuA et HgbA sont capables de protéger les porcelets contre *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 aussi efficacement que les vaccins déjà commercialisés.

De façon générale nous avons constaté que le niveau d'IgA sérique était toujours inférieur au niveau d'IgG sérique. Cette observation était prévisible étant donné que nous avons recherché la présence d'anticorps dans le sang où prédominent les IgG et non dans les sécrétions mucosales où prédominent les IgA. Nous avons également constaté que le niveau d'IgG était nettement supérieur lors du deuxième essai mais que le niveau d'IgA était comparable pour les deux essais. Ceci pourrait indiquer que l'Emulsigen serait un meilleur adjuvant pour induire une production d'IgG mais que les deux adjuvants sont comparables en ce qui concerne la production d'IgA. De plus, une comparaison des signes cliniques a montré qu'après 24 heures les signes étaient plus importants chez les porcelets immunisés avec une seule protéine que ceux immunisés par les deux, indiquant qu'une combinaison de FhuA et HgbA dans le vaccin serait souhaitable. Il faut noter que la meilleure corrélation entre le niveau d'anticorps spécifiques et les résultats des infections expérimentales est obtenue avec les IgA et non pas avec les IgG. Cette corrélation semble être due au fait que la pleuropneumonie porcine est une maladie des voies respiratoires qui met en jeu, comme première ligne de défense, l'immunité mucosale.

Malgré tous ces résultats très prometteurs il reste encore de nombreuses mises au point à faire avant d'obtenir un vaccin commercialisable. Il faut quantifier l'antigène à utiliser, le nombre de doses à administrer ou encore l'adjuvant à utiliser afin d'obtenir un juste équilibre entre la protection optimale et le prix de revient. De plus, afin que notre vaccin soit compétitif il faut qu'il offre une protection croisée contre tous les sérotypes, ce qui n'est pas le cas de la plupart des vaccins déjà commercialisés. Pour ce faire nous allons devoir tester notre vaccin contre d'autres sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

# CONCLUSIONS

Dans ce mémoire nous avons voulu étudier d'une façon plus détaillée FhuA et HgbA, deux récepteurs du fer d'*A. pleuropneumoniae*, afin de mieux comprendre leur rôle dans la pathogenèse. De plus, nous avons voulu évaluer l'effet protecteur de ces deux protéines contre une souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1.

Grâce à des analyses PCR et à un test de promotion nous avons pu démontrer que FhuA et HgbA étaient bien conservés parmi tous les biotypes et sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et qu'ils étaient très spécifiques de leur ligands respectifs, le ferrichrome et l'hémoglobine. Des infections expérimentales avec des mutants isogéniques nous ont permis d'évaluer le rôle joué par FhuA et HgbA dans la virulence. La virulence du mutant HgbA ( $\Delta hgbA$ ) est atténuée par rapport à celle du mutant FhuA (DG02) ou de la souche mère sauvage S4074, indiquant que HgbA pourrait jouer un rôle dans la virulence. Chez *A. pleuropneumoniae*, la redondance des systèmes de transport du fer rend difficile l'identification du rôle d'un des systèmes. La construction de mutants multiples (*fhuA* et/ou *hgbA* avec d'autres systèmes d'acquisition du fer) et leur utilisations dans des tests de promotion ou des infections expérimentales permettrait l'évaluation du rôle de FhuA et d'HgbA dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae*.

Afin d'évaluer l'effet protecteur de FhuA et HgbA nous avons intégré ces deux récepteurs dans différentes formulations vaccinales. Après avoir immunisé des porcelets exempts de microorganismes pathogènes nous les avons infectés expérimentalement par une souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Nos résultats indiquent que FhuA et HgbA sont immunogènes et capables d'induire une protection contre *A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Ainsi FhuA et HgbA représentent de bons candidats pour un vaccin sous-unitaire contre la pleuropneumonie porcine. Afin de prouver que le vaccin offre une protection croisée contre tous les sérotypes nous devons évidemment le tester avec des sérotypes hétérologues.

# BIBLIOGRAPHIE

- Adhikari, P., Kirby, S.D., Nowalk, A.J., Veraldi, K.L., Schryvers, A.B., and Mietzner, T.A. (1995) Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport operon. *J Biol Chem* **270**: 25142-25149.
- Adhikari, P., Berish, S.A., Nowalk, A.J., Veraldi, K.L., Morse, S.A., and Mietzner, T.A. (1996) The *fbpABC* locus of *Neisseria gonorrhoeae* functions in the periplasm-to-cytosol transport of iron. *J Bacteriol* **178**: 2145-2149.
- Altman, E., Brisson, J.R., and Perry, M.B. (1986) Structure of the O-chain of the lipopolysaccharide of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochem Cell Biol* **64**: 1317-1325.
- Anderson, J.E., Sparling, P.F., and Cornelissen, C.N. (1994) Gonococcal transferrin-binding protein 2 facilitates but is not essential for transferrin utilization. *J Bacteriol* **176**: 3162-3170.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215-237.
- Angerer, A., Gaisser, S., and Braun, V. (1990) Nucleotide sequences of the *sfuA*, *sfuB*, and *sfuC* genes of *Serratia marcescens* suggest a periplasmic-binding-protein-dependent iron transport mechanism. *J Bacteriol* **172**: 572-578.
- Angerer, A., Klupp, B., and Braun, V. (1992) Iron transport systems of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **174**: 1378-1387.
- Archambault, M., Olivier, M., Foiry, B., Diarra, M.S., Paradis, S.É., and Jacques, M. (1997) Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. *J Endotoxin Res* **4**: 53-65.
- Archambault, M., Rioux, S., and Jacques, M. (1999) Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. *FEMS Microbiol Lett* **173**: 17-25.
- Archambault, M., Labrie, J., Rioux, C.R., Dumas, F., Thibault, P., Elkins, C., and Jacques, M. (2003) Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can J Vet Res* **67**: 271-277.

- Bagg, A., and Neilands, J.B. (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**: 5471-5477.
- Baker, E.N., Baker, H.M., and Kidd, R.D. (2002) Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework. *Biochem Cell Biol* **80**: 27-34.
- Baltes, N., Hennig-Pauka, I., and Gerlach, G.F. (2002) Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 283-287.
- Baltes, N., Tonpitak, W., Hennig-Pauka, I., Gruber, A.D., and Gerlach, G.F. (2003) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 siderophore receptor FhuA is not required for virulence. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 41-48.
- Baltes, N., and Gerlach, G.F. (2004) Identification of genes transcribed by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in necrotic porcine lung tissue by using selective capture of transcribed sequences. *Infect Immun* **72**: 6711-6716.
- Bandara, A.B., Lawrence, M.L., Veit, H.P., and Inzana, T.J. (2003) Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. *Infect Immun* **71**: 3320-3328.
- Beddek, A.J., Sheehan, B.J., Bossé, J.T., Rycroft, A.N., Kroll, J.S., and Langford, P.R. (2004) Two TonB Systems in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Their Roles in Iron Acquisition and Virulence. *Infect Immun* **72**: 701-708.
- Bélanger, M., Dubreuil, D., Harel, J., Girard, C., and Jacques, M. (1990) Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect Immun* **58**: 3523-3530.
- Bélanger, M., Bégin, C., and Jacques, M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun* **63**: 656-662.
- Berish, S.A., Mietzner, T.A., Mayer, L.W., Genco, C.A., Holloway, B.P., and Morse, S.A. (1990) Molecular cloning and characterization of the structural gene for the major iron-regulated protein expressed by *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* **171**: 1535-1546.

- Berish, S.A., Subbarao, S., Chen, C.Y., Trees, D.L., and Morse, S.A. (1993) Identification and cloning of a *fur* homolog from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **61**: 4599-4606.
- Blackall, P.J., Klaasen, H.L., van den Bosch, H., Kuhnert, P., and Frey, J. (2002) Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol* **84**: 47-52.
- Bochner, B.R., Gadzinski, P., and Panomitros, E. (2001) Phenotypic microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res* **11**: 1246-1255.
- Bochner, B.R. (2003) New technologies to assess genotype-phenotype relationships. *Nat Rev Genet* **4**: 309-314.
- Boekema, B.K., Van Putten, J.P., Stockhofe-Zurwieden, N., and Smith, H.E. (2004) Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **72**: 691-700.
- Bossé, J.T., and MacInnes, J.I. (1997) Genetic and biochemical analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease. *Infect Immun* **65**: 4389-4394.
- Bossé, J.T., Gilmour, H.D., and MacInnes, J.I. (2001) Novel genes affecting urease activity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol* **183**: 1242-1247.
- Bossé, J.T., Janson, H., Sheehan, B.J., Beddek, A.J., Rycroft, A.N., Simon Kroll, J., and Langford, P.R. (2002) *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* **4**: 225-235.
- Boyd, J., Oza, M.N., and Murphy, J.R. (1990) Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria toxin iron-dependent regulatory element (*dtxR*) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5968-5972.
- Braun, V., and Wolff, H. (1973) Characterization of the receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of *Escherichia coli* B. *FEBS Lett* **34**: 77-80.
- Braun, V., Hantke, K., and Koster, W. (1998) Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met Ions Biol Syst* **35**: 67-145.
- Braun, V. (2001) Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 67-79.

- Braun, V., and Braun, M. (2002) Active transport of iron and siderophore antibiotics. *Curr Opin Microbiol* **5**: 194-201.
- Buchanan, S.K., Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., and Deisenhofer, J. (1999) Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**: 56-63.
- Calderwood, S.B., and Mekalanos, J.J. (1987) Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J Bacteriol* **169**: 4759-4764.
- Camejo, G., Halberg, C., Manschik-Lundin, A., Hurt-Camejo, E., Rosengren, B., Olsson, H., Hansson, G.I., Forsberg, G.B., and Ylhen, B. (1998) Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages. *J Lipid Res* **39**: 755-766.
- Camilli, A., and Mekalanos, J.J. (1995) Use of recombinase gene fusions to identify *Vibrio cholerae* genes induced during infection. *Mol Microbiol* **18**: 671-683.
- Chang, C.F., Chang, L.C., Chang, Y.F., Chen, M., and Chiang, T.S. (2002) Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella choleraesuis* recovered from Taiwanese swine. *J Vet Diagn Invest* **14**: 153-157.
- Chen, C.Y., Berish, S.A., Morse, S.A., and Mietzner, T.A. (1993) The ferric iron-binding protein of pathogenic *Neisseria spp.* functions as a periplasmic transport protein in iron acquisition from human transferrin. *Mol Microbiol* **10**: 311-318.
- Chiers, K., van Overbeke, I., De Laender, P., Ducatelle, R., Carel, S., and Haesebrouck, F. (1998) Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. *Vet Q* **20**: 65-69.
- Chin, N., Frey, J., Chang, C.F., and Chang, Y.F. (1996) Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **143**: 1-6.
- Cornelissen, C.N., and Sparling, P.F. (1994) Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol Microbiol* **14**: 843-850.

- Coulton, J.W. (1982) The ferrichrome-iron receptor of *Escherichia coli* K-12. Antigenicity of the FhuA protein. *Biochim Biophys Acta* **717**: 154-162.
- Coy, M., and Neilands, J.B. (1991) Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry* **30**: 8201-8210.
- Crosa, J.H. (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Micobiol Rev* **53**: 517-530.
- Crosa, J.H. (1997) Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 319-336.
- Cruz, W.T., Nedialkov, Y.A., Thacker, B.J., and Mulks, M.H. (1996) Molecular characterization of a common 48-Kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **64**: 83-90.
- Curtis, L.R., Richard, I.J., Bärbel, K., Jerald, C.S., Wendell, D.Z., George, H.L., and Mette, S. (1990) Preparation of Proteosome-based vaccines- Correlation of immunogenicity with physical characteristics. *Journal of Immunological Methods* **135**: 101-109.
- D'Silva, C.G., Archibald, F.S., and Niven, D.F. (1995) Comparative study of iron acquisition by biotype 1 and biotype 2 strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* **44**: 11-23.
- Daban, M., Medrano, A., and Querol, E. (1996) Cloning, sequencing and expression of the transferrin-binding protein 1 gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biochem J* **315 (Pt 1)**: 257-264.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Giovannini, F., and Neilands, J.B. (1988) Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **173**: 537-546.
- Delepelaire, P., and Wandersman, C. (1998) The SecB chaperone is involved in the secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein through an ABC transporter. *Embo J* **17**: 936-944.
- Deneer, H.G., and Potter, A.A. (1989a) Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* **6**: 425-432.

- Deneer, H.G., and Potter, A.A. (1989b) Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **57**: 798-804.
- Diarra, M.S., Dolence, J.A., Dolence, E.K., Darwish, I., Miller, M.J., Malouin, F., and Jacques, M. (1996) Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl Environ Microbiol* **62**: 853-859.
- Dom, P., and Haesebrouck, F. (1992) Comparative virulence of NAD-dependent and NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Zentralbl Veterinarmed B* **39**: 303-306.
- Dom, P., Haesebrouck, F., and De Baetselier, P. (1992a) Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites. *Am J Vet Res* **53**: 1113-1118.
- Dom, P., Haesebrouck, F., Kamp, E.M., and Smits, M.A. (1992b) Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolysins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infect Immun* **60**: 4328-4334.
- Dom, P., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., and Charlier, G. (1994) In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infect Immun* **62**: 1262-1267.
- Dubreuil, J.D., Letellier, A., Stenbaek, E., and Gottschalk, M. (1996) Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 strains using a monoclonal-based polystyrene agglutination test. *Can J Vet Res* **60**: 69-71.
- Dubreuil, J.D., Jacques, M., Mittal, K.R., and Gottschalk, M. (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim Health Res Rev* **1**: 73-93.
- Elkins, C., Totten, P.A., Olsen, B., and Thomas, C.E. (1998) Role of the *Haemophilus ducreyi* Ton system in internalization of heme from hemoglobin. *Infect Immun* **66**: 151-160.
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., and Poxton, I.R. (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* **4**: 837-851.

- Escolar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1998) Binding of the Fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* **283**: 537-547.
- Fecker, L., and Braun, V. (1983) Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **156**: 1301-1314.
- Fenwick, B., and Henry, S. (1994) Porcine pleuropneumonia. *J Am Vet Med Assoc* **204**: 1334-1340.
- Fenwick, B.W., Osburn, B.I., and Olander, H.J. (1986) Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res* **47**: 1433-1441.
- Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W., Diederichs, K., and Welte, W. (1998) Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**: 2215-2220.
- Ferguson, A.D., Braun, V., Fiedler, H.P., Coulton, J.W., Diederichs, K., and Welte, W. (2000) Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Sci* **9**: 956-963.
- Ferguson, A.D., Koding, J., Walker, G., Bos, C., Coulton, J.W., Diederichs, K., Braun, V., and Welte, W. (2001) Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer-membrane protein FhuA. *Structure (Camb)* **9**: 707-716.
- Ferguson, A.D., Chakraborty, R., Smith, B.S., Esser, L., van der Helm, D., and Deisenhofer, J. (2002) Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* **295**: 1715-1719.
- Fontecave, M., Coves, J., and Pierre, J.L. (1994) Ferric reductases or flavin reductases? *Biometals* **7**: 3-8.
- Fourel, G., Phalipon, A., and Kaczorek, M. (1989) Evidence for direct regulation of diphtheria toxin gene transcription by an Fe<sup>2+</sup>-dependent DNA-binding repressor, DtoxR, in *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun* **57**: 3221-3225.

- Frey, J., Bossé, J.T., Chang, Y.F., Cullen, J.M., Fenwick, B., Gerlach, G.F., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T.J., Jansen, R., and et al. (1993) *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolytins, pleurotoxin and their genes. *J Gen Microbiol* **139**: 1723-1728.
- Frey, J. (1995) Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol* **3**: 257-261.
- Frey, J., Beck, M., van den Bosch, J.F., Segers, R.P., and Nicolet, J. (1995) Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Mol Cell Probes* **9**: 277-282.
- Frey, J., Kuhnert, P., Villiger, L., and Nicolet, J. (1996) Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins. *Res Microbiol* **147**: 351-361.
- Fuller, T.E., Shea, R.J., Thacker, B.J., and Mulks, M.H. (1999) Identification of *in vivo* induced genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* **27**: 311-327.
- Fuller, T.E., Martin, S., Teel, J.F., Alaniz, G.R., Kennedy, M.J., and Lowery, D.E. (2000) Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microb Pathog* **29**: 39-51.
- Genco, C.A., and Dixon, D.W. (2001) Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* **39**: 1-11.
- Gerlach, G.F., Anderson, C., Potter, A.A., Klashinsky, S., and Willson, P.J. (1992a) Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **60**: 892-898.
- Gerlach, G.F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A.A., and Willson, P.J. (1992b) Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infect Immun* **60**: 3253-3261.
- Gerlach, G.F., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A., Potter, A.A., and Willson, P.J. (1993) Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun* **61**: 565-572.

- Ghigo, J.M., Létoffé, S., and Wandersman, C. (1997) A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 3572-3579.
- Gonzalez, G.C., Caamano, D.L., and Schryvers, A.B. (1990) Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol Microbiol* **4**: 1173-1179.
- Gonzalez, G.C., Yu, R.H., Rosteck, P.R., Jr., and Schryvers, A.B. (1995) Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. *Microbiology* **141 (Pt 10)**: 2405-2416.
- Gottschalk, M. (2004) Actualités sur la pleuropneumonie porcine (partie 1): biotypes et sérotypes. *Info GREMIP* **3**: 1-2.
- Graham, J.E., and Clark-Curtiss, J.E. (1999) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11554-11559.
- Gram, T., Ahrens, P., and Nielsen, J.P. (1996) Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. *Vet Microbiol* **51**: 95-104.
- Gray-Owen, S.D., and Schryvers, A.B. (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* **4**: 185-191.
- Griffiths, E., and Williams, P. (1999) *The iron-uptake systems of pathogenic bacteria, fungi and protozoa*. Chichester; Toronto: Wiley.
- Guerinot, M.L. (1994) Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* **48**: 743-772.
- Haesebrouck, F., Chiers, K., Van Overbeke, I., and Ducatelle, R. (1997) *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiol* **58**: 239-249.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., and Decostere, A. (2004) Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet Microbiol* **100**: 255-268.
- Hantke, K. (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* **182**: 288-292.

- Hantke, K. (1984) Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **197**: 337-341.
- Hantke, K. (1987) Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet* **210**: 135-139.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., and Holden, D.W. (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**: 400-403.
- Higgs, P.I., Larsen, R.A., and Postle, K. (2002) Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol Microbiol* **44**: 271-281.
- Inzana, T.J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski, R.P., and Anderson, P. (1988) Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun* **56**: 1880-1889.
- Jacques, M., Foiry, B., Higgins, R., and Mittal, K.R. (1988) Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol* **170**: 3314-3318.
- Jacques, M., and Mikael, L.G. (2002) Virulence factors of *Pasteurellaceae*, formidable animal pathogens. *ASM News* **68**: 174-179.
- Jacques, M. (2004) Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* **68**: 81-85.
- Jarosik, G.P., Sanders, J.D., Cope, L.D., Muller-Eberhard, U., and Hansen, E.J. (1994) A functional *tonB* gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* **62**: 2470-2477.
- Jarosik, G.P., and Hansen, E.J. (1995) Cloning and sequencing of the *Haemophilus influenzae exbB* and *exbD* genes. *Gene* **152**: 89-92.
- Jeannotte, M.E., Abul-Milh, M., Dubreuil, J.D., and Jacques, M. (2003) Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to phosphatidylethanolamine. *Infect Immun* **71**: 4657-4663.

- Jolie, R.A., Mulks, M.H., and Thacker, B.J. (1994) Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet Microbiol* **38**: 329-349.
- Karjalainen, T.K., Evans, D.G., Evans, D.J., Jr., Graham, D.Y., and Lee, C.H. (1991) Iron represses the expression of CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **11**: 317-323.
- Khun, H.H., Kirby, S.D., and Lee, B.C. (1998) A *Neisseria meningitidis* *fbpABC* mutant is incapable of using nonheme iron for growth. *Infect Immun* **66**: 2330-2336.
- Kirby, S.D., Gray-Owen, S.D., and Schryvers, A.B. (1997) Characterization of a ferric-binding protein mutant in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **25**: 979-987.
- Komal, J.P., and Mittal, K.R. (1990) Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet Microbiol* **25**: 229-240.
- Koster, W. (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* **152**: 291-301.
- Labrie, J., Rioux, S., Wade, M.M., Champlin, F.R., Holman, S.C., Wilson, W.W., Savoye, C., Kobisch, M., Sirois, M., Galarneau, C., and Jacques, M. (2002) Identification of genes involved in biosynthesis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants. *J Endotoxin Res* **8**: 27-38.
- Lairini, K., Stenbaek, E., Lacouture, S., and Gottschalk, M. (1995) Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet Microbiol* **46**: 369-381.
- Langford, P.R., Loynds, B.M., and Kroll, J.S. (1996) Cloning and molecular characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **64**: 5035-5041.
- Lavrrar, J.L., Christoffersen, C.A., and McIntosh, M.A. (2002) Fur-DNA interactions at the bidirectional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **322**: 983-995.

- Lebrun, A., Lacouture, S., Côté, D., Mittal, K.R., and Gottschalk, M. (1999) Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 7 and 4 using monoclonal antibodies: demonstration of common LPS O-chain epitopes with *Actinobacillus lignieresii*. *Vet Microbiol* **65**: 271-282.
- Lee, B.C. (1995) Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol Microbiol* **18**: 383-390.
- Legrain, M., Mazarin, V., Irwin, S.W., Bouchon, B., Quentin-Millet, M.J., Jacobs, E., and Schryvers, A.B. (1993) Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2. *Gene* **130**: 73-80.
- Letoffe, S., Ghigo, J.M., and Wandersman, C. (1994a) Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9876-9880.
- Letoffe, S., Ghigo, J.M., and Wandersman, C. (1994b) Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter. *J Bacteriol* **176**: 5372-5377.
- Litwin, C.M., and Calderwood, S.B. (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**: 137-149.
- Locher, K.P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J.P., and Moras, D. (1998) Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**: 771-778.
- MacLean, L.L., Perry, M.B., and Vinogradov, E. (2004) Characterization of the antigenic lipopolysaccharide O chain and the capsular polysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13. *Infect Immun* **72**: 5925-5930.
- Mahan, M.J., Slauch, J.M., Hanna, P.C., Camilli, A., Tobias, J.W., Waldor, M.K., and Mekalanos, J.J. (1993) Selection for bacterial genes that are specifically induced in host tissues: the hunt for virulence factors. *Infect Agents Dis* **2**: 263-268.

- Mahan, M.J., Tobias, J.W., Slauch, J.M., Hanna, P.C., Collier, R.J., and Mekalanos, J.J. (1995) Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 669-673.
- Mallett, C.P., Hale, T.L., Kaminski, R.W., Larsen, T., Orr, N., Cohen, D., and Lowell, G.H. (1995) Intranasal or intragastric immunization with proteosome-*Shigella* lipopolysaccharide vaccines protects against lethal pneumonia in a murine model of *Shigella* infection. *Infect Immun* **63**: 2382-2386.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055.
- Megraud, F., Neman-Simha, V., and Brugmann, D. (1992) Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. *Infect Immun* **60**: 1858-1863.
- Michael, F.S., Brisson, J.R., Larocque, S., Monteiro, M., Li, J., Jacques, M., Perry, M.B., and Cox, A.D. (2004) Structural analysis of the lipopolysaccharide derived core oligosaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5a and the genome strain 5b. *Carbohydr Res* **339**: 1973-1984.
- Mikael, L.G., Pawelek, P.D., Labrie, J., Sirois, M., Coulton, J.W., and Jacques, M. (2002) Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (*fhu*) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **148**: 2869-2882.
- Mikael, L.G., Srikumar, R., Coulton, J.W., and Jacques, M. (2003) *fhuA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron. *Infect Immun* **71**: 2911-2915.
- Moeck, G.S., and Coulton, J.W. (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* **28**: 675-681.
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R., Serrano, J.J., Garcia, C., and de la Garza, M. (1994) Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can J Vet Res* **58**: 83-86.

- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R., Guerrero, A.L., Garcia, R.M., Reyes, M.E., and de la Garza, M. (1998) Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Can J Vet Res* **62**: 183-190.
- Neilands, J.B. (1984) Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol Sci* **1**: 9-14.
- Neilands, J.B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**: 26723-26726.
- Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., and Fee, J.A. (1990) Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J Bacteriol* **172**: 1930-1938.
- Niven, D.F., and Lévesque, M. (1988) V-factor-dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008/76). *Int J Syst Bacteriol* **38**: 319-320.
- Niven, D.F., Donga, J., and Archibald, F.S. (1989) Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. *Mol Microbiol* **3**: 1083-1089.
- Ogunnariwo, J.A., and Schryvers, A.B. (1990) Iron acquisition in *Pasteurella haemolytica*: expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. *Infect Immun* **58**: 2091-2097.
- Ogunnariwo, J.A., Alcantara, J., and Schryvers, A.B. (1991) Evidence for non-siderophore-mediated acquisition of transferrin-bound iron by *Pasteurella multocida*. *Microb Pathog* **11**: 47-56.
- Paquelin, A., Ghigo, J.M., Bertin, S., and Wandersman, C. (2001) Characterization of HasB, a *Serratia marcescens* TonB-like protein specifically involved in the haemophore-dependent haem acquisition system. *Mol Microbiol* **42**: 995-1005.
- Pattison, I.H., Howell, D.G., and Elliot, J. (1957) A *Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J Comp Pathol* **67**: 320-330.

- Pawelek, P.D., and Coulton, J.W. (2004) Hemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: homology modelling reveals regions of potential interactions with hemoglobin and heme. *J Mol Graph Model* **23**: 211-221.
- Perry, M.B., Altman, E., Brisson, J.R., Beynon, L.M., and Richards, J.C. (1990) Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Hemophilus) pleuropneumoniae* strains. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious disease* **4**: 299-308.
- Perry, M.B., and MacLean, L.L. (2004) Structural characterization of the antigenic O-polysaccharide in the lipopolysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 14. *Carbohydr Res* **339**: 1399-1402.
- Perry, M.B., MacLean, L.L., and Vinogradov, E. (2005) Structural characterization of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15. *Biochem Cell Biol* **83**: 61-69.
- Perutz, M.F. (1960) Structure of hemoglobin. *Brookhaven Symp Biol* **13**: 165-183.
- Pisetsky, D.S. (1996) Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity* **5**: 303-310.
- Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiksen, W., and Manheim, W. (1983) Transfert of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comb.Nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonuceic acid relatedness. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**: 510-514.
- Postle, K. (1993) TonB protein and energy transduction between membranes. *J Bioenerg Biomembr* **25**: 591-601.
- Prescott, J.F., Baggot, J.D., and Walker, R.D. (2000) *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Ames: Iowa State University Press.
- Rapp, V.J., Munson, R.S., Jr., and Ross, R.F. (1986) Outer membrane protein profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **52**: 414-420.

- Ratledge, C., and Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**: 881-941.
- Retzer, M.D., Yu, R., Zhang, Y., Gonzalez, G.C., and Schryvers, A.B. (1998) Discrimination between apo and iron-loaded forms of transferrin by transferrin binding protein B and its N-terminal subfragment. *Microb Pathog* **25**: 175-180.
- Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Frey, J., Nicolet, J., Kobisch, M., Dubreuil, J.D., and Jacques, M. (1999) Isolation and characterization of mini-*Tn10* lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can J Microbiol* **45**: 1017-1026.
- Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Kobisch, M., Frey, J., Gottschalk, M., and Jacques, M. (2000) Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb Pathog* **28**: 279-289.
- Rodriguez-Barbosa, J.I., Gutierrez, C.B., Tascon, R.I., Suarez, J., De Noronha, F., and Rodriguez-Ferri, E.F. (1995) Characterization of monoclonal antibodies to O-antigen of lipopolysaccharide of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and their use in the classification of field isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* **11**: 35-44.
- Sanders, J.D., Cope, L.D., and Hansen, E.J. (1994) Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **62**: 4515-4525.
- Schaffer, S., Hantke, K., and Braun, V. (1985) Nucleotide sequence of the iron regulatory gene *fur*. *Mol Gen Genet* **200**: 110-113.
- Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T.J., MacInnes, J.I., Segers, R.P., and Frey, J. (1999) Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **145 (Pt 8)**: 2105-2116.
- Schaller, A., Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Forbes, W.A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Gottschalk, M., Nicolet, J., and Frey, J. (2001) Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. *Vet Microbiol* **79**: 47-62.

- Schmitt, M.P., Twiddy, E.M., and Holmes, R.K. (1992) Purification and characterization of the diphtheria toxin repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7576-7580.
- Schryvers, A.B., and Morris, L.J. (1988) Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **56**: 1144-1149.
- Serebrin, S., Rosendal, S., Valdivieso-Garcia, A., and Little, P.B. (1991) Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Res Vet Sci* **50**: 18-22.
- Sheehan, B.J., Langford, P.R., Rycroft, A.N., and Kroll, J.S. (2000) [Cu,Zn]-Superoxide dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are unattenuated in infections of the natural host. *Infect Immun* **68**: 4778-4781.
- Sheehan, B.J., Bossé, J.T., Beddek, A.J., Rycroft, A.N., Kroll, J.S., and Langford, P.R. (2003) Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host. *Infect Immun* **71**: 3960-3970.
- Shope, R.E., White, D.C., and Leidy, G. (1964) Porcine contagious pleuropneumonia. II. studies of the pathogenicity of the etiological agent, *Hemophilus Pleuropneumoniae*. *J Exp Med* **119**: 369-375.
- Sirois, M., Lemire, E.G., and Levesque, R.C. (1991) Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **29**: 1183-1187.
- Smoot, D.T., Mobley, H.L., Chippendale, G.R., Lewison, J.F., and Resau, J.H. (1990) *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun* **58**: 1992-1994.
- Srikumar, R., Mikael, L.G., Pawelek, P.D., Khamessan, A., Gibbs, B.F., Jacques, M., and Coulton, J.W. (2004) Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **150**: 1723-1734.
- Stevenson, A., Macdonald, J., and Roberts, M. (2003) Cloning and characterisation of type 4 fimbrial genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* **92**: 121-134.

- Stojiljkovic, I., and Hantke, K. (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *Embo J* **11**: 4359-4367.
- Stojiljkovic, I., Baumler, A.J., and Hantke, K. (1994) Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J Mol Biol* **236**: 531-545.
- Stojiljkovic, I., and Hantke, K. (1995) Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet* **247**: 199-205.
- Stojiljkovic, I., Hwa, V., de Saint Martin, L., O'Gaora, P., Nassif, X., Heffron, F., and So, M. (1995) The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol Microbiol* **15**: 531-541.
- Tao, X., and Murphy, J.R. (1992) Binding of the metalloregulatory protein DtxR to the diphtheria tox operator requires a divalent heavy metal ion and protects the palindromic sequence from DNase I digestion. *J Biol Chem* **267**: 21761-21764.
- Tascón, R.I., Vazquez-Boland, J.A., Gutierrez-Martin, C.B., Rodriguez-Barbosa, I., and Rodriguez-Ferri, E.F. (1994) The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol Microbiol* **14**: 207-216.
- Taylor, D.J. (1999) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In *Diseases of swine*. Straw, B.E., Allaire, S.D., Mengeling, W.L. and Taylor, D.J. (eds). Ames, Iowa: Iowa State University Press, pp. 343-354.
- Tonpitak, W., Thiede, S., Oswald, W., Baltés, N., and Gerlach, G.F. (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport: a set of *exbBD* genes is transcriptionally linked to the *tbpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron. *Infect Immun* **68**: 1164-1170.
- Utrera, V., and Pijoan, C. (1991) Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet Rec* **128**: 357-358.
- Van den Bosch, H., and Frey, J. (2003) Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs. *Vaccine* **21**: 3601-3607.

- Van Overbeke, I., Chiers, K., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F. (2001) Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **48**: 15-20.
- Vasil, M.L., and Ochsner, U.A. (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**: 399-413.
- Venturi, V., Weisbeek, P., and Koster, M. (1995) Gene regulation of siderophore-mediated iron acquisition in *Pseudomonas*: not only the Fur repressor. *Mol Microbiol* **17**: 603-610.
- Wandersman, C., and Stojiljkovic, I. (2000) Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* **3**: 215-220.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004) Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annu Rev Microbiol*.
- Wang, J., Mushegian, A., Lory, S., and Jin, S. (1996) Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by *in vivo* selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10434-10439.
- Ward, C.K., and Inzana, T.J. (1997) Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. *Infect Immun* **65**: 2491-2496.
- Ward, C.K., Lawrence, M.L., Veit, H.P., and Inzana, T.J. (1998) Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun* **66**: 3326-3336.
- White, D.C., Leidy, G., Jamieson, J.D., and Shope, R.E. (1964) Porcine contagious pleuropneumonia. III. interrelationship of *Hemophilus pleuropneumoniae* to other species of *Hemophilus*: nutritional, metabolic, transformation, and electron microscopy studies. *J Exp Med* **120**: 1-12.
- Willson, P. (2004) Needle free immunization. *Pig Progress* **20**: 26-27.

- Willson, P.J., Rossi-Campos, A., and Potter, A.A. (1995) Tissue reaction and immunity in swine immunized with *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines. *Can J Vet Res* **59**: 299-305.
- Zhang, Y., Tennent, J.M., Ingham, A., Beddome, G., Prideaux, C., and Michalski, W.P. (2000) Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **189**: 15-18.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D., and Storz, G. (1999) OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* **181**: 4639-4643.

