

Université de Montréal

Potentiel des lipopolysaccharides d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*  
sérotypé 1 dans l'induction d'une protection chez l'animal et étude de  
leur rôle dans la pathogénie à l'aide de mutants

par

Stéphane Rioux

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Microbiologie et Immunologie

Décembre, 1997

©Stéphane Rioux, 1997



W  
4  
U58  
1998  
U.050

Université de Montréal

Précédent des travaux de recherche effectués par l'auteur en vue de l'obtention du grade de  
Philosophie (Ph.D.) en Microbiologie et Immunologie  
à la Faculté de Médecine  
Université de Montréal

par  
Stéphane Rivest

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophie (Ph.D.)  
en Microbiologie et Immunologie

Décembre 1997



Stéphane Rivest, 1997

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Potentiel des lipopolysaccharides d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*  
sérotypé 1 dans l'induction d'une protection chez l'animal et étude de  
leur rôle dans la pathogénie à l'aide de mutants

présentée par:

Stéphane Rioux

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

-Dr Réal Lallier, Directeur du Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal (président-rapporteur);

-Dr Mario Jacques, Professeur titulaire, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal (directeur de recherche);

-Dr Daniel Dubreuil, professeur agrégé, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal (co-directeur de recherche);

-Dre Josée Harel, professeure agrégée, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal (examineur interne);

-Dr Denis Martin, professeur, Unité de recherche en vaccinologie, Centre hospitalier universitaire de Québec (pavillon CHUL) (examineur externe).

Thèse acceptée le: ..... 21.05.1998 .....

## **SOMMAIRE**



*Actinobacillus pleuropneumoniae* est un important pathogène des voies respiratoires du porc. Notre équipe a précédemment démontré que le lipopolysaccharide (LPS) est l'adhésine majeure d'*A. pleuropneumoniae*. Le premier objectif du présent travail consistait à évaluer le rôle protecteur de l'adhésine lipopolysaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 chez la souris et le porc. Après une hydrolyse acide et une chromatographie, les fractions représentant les LPS de haut poids moléculaire ont été conjuguées à l'albumine bovine sérique (conjugué O-polysaccharide-ABS). Des groupes de souris ont été immunisés avec différentes préparations vaccinales comprenant le conjugué O-polysaccharide-ABS et le LPS détoxiqué. Différents adjuvants ont aussi été utilisés afin d'induire une meilleure réponse immunologique aux antigènes polysaccharidiques. Après l'infection des souris par voie intranasale avec une souche d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ou sérotype 5, nous avons observé les plus hauts taux de survivants avec le conjugué O-polysaccharide-ABS mélangé au Quil A et le LPS détoxiqué mélangé à une émulsion eau/huile. Cependant, la protection induite avec les différentes préparations vaccinales était spécifique de sérotype puisque les souris infectées avec la souche de sérotype 5 ont été tuées. Par la suite, nous avons immunisé des porcs avec les deux préparations qui avaient donné les meilleurs résultats chez la souris. Après l'infection des porcs par voie intranasale, nos résultats indiquent qu'une bonne protection est obtenue avec le LPS détoxiqué, tandis que l'immunisation avec le conjugué O-polysaccharide-ABS n'a induit aucune protection. Nos résultats indiquent également qu'il n'y a pas de concordance entre l'efficacité vaccinale déterminée chez la souris et le porc. Etant donné que l'injection d'une seule molécule (le LPS détoxiqué) semble aussi efficace que la bactérie entière, ceci confirme notre hypothèse concernant le rôle important joué par les LPS dans la pathogénie et la protection contre les infections causées par *A. pleuropneumoniae*.

Le deuxième objectif de ce travail consistait à obtenir des mutants d'*A. pleuropneumoniae* au niveau de la biosynthèse des LPS dans le but de confirmer leur rôle dans la pathogénie et de surcroît identifier la région de cette molécule complexe impliquée dans l'adhérence. Après avoir obtenu deux mutants spontanés possédant des LPS rugueux (le LPS du sérotype 1 est de type semi-rugueux), nous avons évalué leur adhérence sur des coupes congelées de trachée de porcelet et leur virulence chez la souris. Un des mutants spontanés adhérait de façon similaire à la souche mère, tandis que l'autre adhérait beaucoup moins, suggérant que l'antigène O, absent chez ces mutants, ne semble pas être nécessaire à l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae*. De plus, ces mutants étaient beaucoup moins virulents chez la souris, indiquant que le LPS est un facteur de virulence important d'*A. pleuropneumoniae*. Ces résultats ont été confirmés à l'aide de mutants isogéniques. De fait, après mutagenèse à l'aide du transposon mini-Tn10, sept mutants possédant des LPS rugueux et un mutant possédant une bande additionnelle au niveau de la région du noyau oligosaccharidique-lipide A ont été obtenus. Ces mutants étaient moins virulents chez la souris et plus sensibles à l'activité bactéricide du sérum. Les mutants possédant des LPS rugueux ont adhéré d'une façon similaire ou en plus grand nombre que la souche mère, tandis que la souche mutée dont la région du noyau oligosaccharidique-lipide A est modifiée adhérait significativement moins que la souche mère. Ces résultats indiquent que l'antigène O ne semble pas être essentiel à l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* tandis qu'un noyau oligosaccharidique complet serait important. Chez le mutant adhérent moins aux cellules des voies respiratoire du porc, le transposon était inséré dans la région promotrice du gène *galU*, le gène structural de l'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransférase. Ce gène est impliqué dans la production de l'UDP-glucose qui est utilisé lors de la synthèse du noyau externe chez d'autres bactéries Gram-négatif. De plus, ce mutant

était moins virulent chez le porc comparativement à la souche mère. L'ensemble de nos résultats démontre clairement que le LPS est un facteur de virulence important d'*A. pleuropneumoniae* et est impliqué dans l'adhérence de ce micro-organisme aux cellules de l'hôte.

**MOTS CLES:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, lipopolysaccharides, vaccin, mutant, adhérence, virulence.

## TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	I
TABLE DES MATIERES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIV
DEDICACE.....	XV
REMERCIEMENTS.....	XVI
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVUE DE LA LITTERATURE.....	4
1. Généralités.....	5
2. La pleuropneumonie porcine.....	5
3. Facteurs de virulence.....	7
3.1 Capsule polysaccharidique.....	7
3.2 Lipopolysaccharides.....	8
3.2.1 Structure des lipopolysaccharides.....	8
3.2.2 Fonctions des lipopolysaccharides.....	10
3.2.3 Biosynthèse des lipopolysaccharides.....	12
3.3 Exotoxines.....	18
3.4 Protéines de la membrane externe.....	20
3.5 Autres facteurs contribuant à la virulence.....	21
4. Contrôle de la pleuropneumonie porcine.....	22
4.1 Antibiothérapie.....	22
4.2 Vaccination.....	23

5. Réponse immune du porc.....	32
6. Mutants d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	34
6.1 Mutants de la capsule.....	35
6.2 Mutants des toxines RTX.....	35
6.3 Mutants sensibles à la température.....	36
6.4 Autres mutants d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	36

### III. MATERIEL, METHODES ET RESULTATS.....38

#### Article 1:

**Rioux, S.,** D. Dubreuil, C. Bégin, C. Laferrière, D. Martin et M. Jacques. 1997. Evaluation of protective efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 lipopolysaccharide-protein conjugate in mice. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **20**:63-74.....39

#### Article 2:

**Rioux, S.,** C. Girard, J. D. Dubreuil et M. Jacques. 1998. Evaluation of the protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 detoxified lipopolysaccharides or O-polysaccharide-protein conjugate in pigs. *Research in Veterinary Sciences* (sous presse).....52

#### Article 3:

**Rioux, S.,** C. Bégin, J. D. Dubreuil et M. Jacques. 1997. Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr. Microbiol.* **35**:139-144.....68

#### Article 4:

**Rioux, S.,** J. Harel, J. Frey, J. Nicolet, M. Kobisch, J. D. Dubreuil et M. Jacques. Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide

mutants of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 1. Soumis pour publication dans <i>Infection and Immunity</i> .....	75
IV. DISCUSSION.....	111
V. CONCLUSION.....	122
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	124
VII. ANNEXES.....	XVIII

## LISTE DES TABLEAUX

**Revue de littérature.**

## Tableau I.

Résumé des résultats obtenus avec différentes préparations vaccinales d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.....27

## Tableau II.

Protection passive obtenue avec différents anticorps dirigés contre *Actinobacillus pleuropneumoniae*.....30

## Tableau III.

Protection obtenue avec différents mutants d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.....31

**Article 1.**

## Table 1.

Protection of mice immunized with different *A. pleuropneumoniae* serotype 1 vaccine preparations and challenged with a serotype 1 strain or a serotype 5 strain.....47

**Article 2.**

## Table 1.

Protection of pigs immunized with different vaccine preparations and challenged with virulent *A. pleuropneumoniae* serotype 1 isolate FMV87-682.....67

**Article 3.**

## Table 1.

Adherence to piglet tracheal frozen sections and virulence in mice of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain and LPS mutants.....72

**Article 4.**

## Table 1.

Adherence to piglet tracheal frozen sections, serum resistance and virulence in mice of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain 4074 NaI<sup>r</sup> and LPS mutants.....103

## Table 2.

Virulence in pigs of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain 4074 NaI<sup>r</sup> and LPS mutant #5.1.....104



## LISTE DES FIGURES

### Revue de la littérature.

#### Figure 1.

Biosynthèse du lipide A et du noyau oligosaccharidique. Les gènes impliqués dans la synthèse sont indiqués en italique. Modifiée selon Raetz (1996).....13

#### Figure 2.

Biosynthèse de l'antigène O. Les gènes impliqués dans la synthèse sont indiqués en italique. La nouvelle unité de l'antigène O est indiquée en caractères gras. X et Y représentent des sucres (hexoses). Modifiée selon Raetz (1996).....17

### Article 1.

#### Figure 1.

Fractionation of hydrolysed LPS of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 on a Sephadex G-25 column in the presence of pyridinium acetate. Fractions (in milliliters) were analysed for neutral sugars and grouped into three peaks (1-3). High molecular mass fractions (peak 1) were used for the preparation of the O-polysaccharide-BSA conjugate.....42

#### Figure 2.

Immunoblot showing the coupling between *A. pleuropneumoniae* serotype 1 high molecular mass O-polysaccharides and bovine serum albumin (BSA). The immunoblot was probed with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. Lane 1, BSA; lane 2, O-polysaccharide-BSA conjugate; lane 3, hydrolysed lipopolysaccharides; lane 4,

extracted lipopolysaccharides. Molecular mass markers (in kDa) are indicated on the left.....46

**Article 3.**

Figure 1.

Immunoblot (A) and silver-stained SDS-PAGE profiles (B) of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain and spontaneous LPS mutants. The immunoblot was probed with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. Lane 1, parent strain; lane 2, mutant F19; lane 3, mutant 33.1. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Arrow indicates the core-lipid A region.....71

Figure 2.

Immunoblot of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain and spontaneous LPS mutants separated by Tricine SDS-PAGE. The immunoblot was probed with serum from a pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae*. Lane 1, parent strain; lane 2, mutant F19; lane 3, mutant 33.1. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Arrow indicates the core-lipid A region.....71

Figure 3.

Transmission electron micrographs of thin sections of *A. pleuropneumoniae* immunostabilized with a mouse monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* capsular antigen, and stained with ruthenium red. (A) parent strain; (B) mutant F19; (C) mutant 33.1. Bar = 200 nm.....72

**Article 4.****Figure 1.**

Silver-stained SDS-PAGE profiles of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain (4074 NaI<sup>r</sup>) and LPS mutants. Lane 1, parent strain; lane 2, mutant #1.1; lane 3, mutant #15.1; lane 4, mutant #24.1; lane 5, mutant #27.1; lane 6, mutant #36.1; lane 7, mutant #44.1; lane 8, mutant #51.1; lane 9, mutant #5.1. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Arrow indicates the high-molecular-mass LPS absent in lanes 2 to 8.....105

**Figure 2.**

Immunoblot of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain (4074 NaI<sup>r</sup>) and LPS mutants. The immunoblot was probed with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. Lane 1, parent strain; lane 2, mutant #1.1; lane 3, mutant #15.1; lane 4, mutant #24.1; lane 5, mutant #27.1; lane 6, mutant #36.1; lane 7, mutant #44.1; lane 8, mutant #51.1; lane 9, mutant #5.1. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Note the absence of reactivity of the antibody in lanes 2 to 8.....106

**Figure 3.**

Silver-stained Tricine-SDS-PAGE profiles (A) and immunoblot (B) of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI<sup>r</sup> (lane 1) and LPS mutant #5.1 (lane 2). The immunoblot was probed with an antiserum obtained from a pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae*. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Arrow indicates the core-lipid A region.....107

## Figure 4.

Amplification of the mini-Tn10 transposon in all LPS mutants using standard PCR. Lane 1, mutant #1.1; lane 2, mutant #5.1; lane 3, mutant #15.1; lane 4, mutant #24.1; lane 5, mutant #27.1; lane 6, mutant #36.1; lane 7, mutant #44.1; lane 8, mutant #51.1; lane 9, parent strain 4074 Nal<sup>r</sup>; lane 10, plasmid pLOF/Km. Molecular size standards (in kilobases) are indicated on the left. Arrow indicates the expected 836 bp amplification product.....108

## Figure 5.

Random insertion of the Tn10 element in the *A. pleuropneumoniae* LPS mutants as determined by Southern blot analysis. Lane 1, mutant #1.1; lane 2, mutant #5.1; lane 3, mutant #15.1; lane 4, mutant #24.1; lane 5, mutant #27.1; lane 6, mutant #36.1; lane 7, mutant #44.1; lane 8, mutant #51.1; lane 9, parent strain 4074 Nal<sup>r</sup>; lane 10, plasmid pLOF/Km. Molecular size standards (in kilobases) are indicated on the left.....109

## Figure 6.

Nucleotide sequence of the region containing the *A. pleuropneumoniae galU* (bp 53 to 937) and ORF2 (bp 975 to 1490) genes. The sequence was determined from LPS mutant #5.1. The end of the mini-Tn10 is boxed and the start codons are underlined. The Shine-Delgarno sequence (RBS) for *galU* is underlined and the putative stop codons shown in bold type. The arrows indicate the putative termination sequence.....110

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ABS:** albumine bovine sérique
- ACP:** acyl carrier protein
- ADN:** acide désoxyribonucléique
- ADP:** adénosine diphosphate
- AIF:** adjuvant incomplet de Freund
- Apx:** *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxins
- ATP:** adénosine triphosphate
- CMP:** cytidine monophosphate
- Gal:** D-galactose
- GlcNAc:** N-acétyle-D-glucosamine
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peroxyde d'hydrogène
- IL:** interleukine
- kb:** kilobase
- kDa:** kilodalton
- KDO:** acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique
- LPS:** lipopolysaccharide
- NAD:** nicotinamide adénine dinucléotide
- NO:** monoxyde d'azote
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** ion superoxyde
- OMP:** outer membrane proteins
- RTX:** repeats in the structural toxin
- SPF:** specific pathogen free
- TNF:** tumor necrosis factor
- UDP:** uridine diphosphate
- UMP:** uridine monophosphate
- Und-P:** undécaprénol-phosphate

A ma nièce Stéphanie  
A mes neveux Simon, Maxime et William

## REMERCIEMENTS

J'adresse un merci tout particulier à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet. Je tiens à exprimer plus particulièrement ma reconnaissance envers:

- le Dr Mario Jacques, professeur titulaire, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal et directeur de mon projet de doctorat pour la confiance et les excellents conseils qu'il m'a offerts pendant la direction de ce travail ainsi que pour son soutien financier;
- le Dr Daniel Dubreuil, professeur agrégé, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal et co-directeur de mon projet de doctorat pour ses précieux conseils et sa disponibilité;
- la Dre Josée Harel, professeure agrégée, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal pour ses conseils judicieux;
- le Dr Denis Martin, professeur, Unité de recherche en vaccinologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec pour ses nombreux conseils sur le projet de vaccination;
- les Drs Jacques Nicolet et Joachim Frey, professeurs, Institut de bactériologie vétérinaire, Université de Berne (Suisse) pour leurs conseils et leurs critiques pertinentes;

- la Dre Christiane Girard, professeure agrégée, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal pour son inestimable collaboration;
  
- la Dre Marylène Kobisch, chef de l'unité de recherche de mycoplasmologie et bactériologie, Centre national d'études vétérinaires et alimentaires à Ploufragan (France) pour sa collaboration;
  
- le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, le Centre de Coopération Interuniversitaire Franco-Québécoise, la Faculté de médecine vétérinaire et la Faculté des études supérieures pour leur appui financier.



---

## **I. INTRODUCTION**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine. Cette maladie, répandue mondialement, cause des pertes économiques très importantes à l'industrie porcine. L'adhérence de micro-organismes à la surface des cellules de l'hôte représente une étape importante de la pathogenèse d'infections bactériennes (Cundell et Tuamanen, 1995). Il a été démontré que l'adhésine majeure d'*A. pleuropneumoniae* est son lipopolysaccharide (LPS) (Jacques, 1996). Plus récemment, la partie polysaccharidique du LPS a été identifiée comme étant responsable de l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcine (Paradis et coll., 1994). De plus, les LPS peuvent lier l'hémoglobine porcine et pourraient donc être impliqués dans l'acquisition du fer chez ce micro-organisme (Bélanger et coll., 1995; Archambault et coll., 1997).

Les vaccins contenant des bactéries inactivées (bactérines) sont utilisés pour prévenir et contrôler la maladie mais différentes molécules de la bactérie (capsule, OMP, toxines RTX) ont également été évaluées afin de déterminer leur rôle dans la protection (Tableau I, p. 27). Ces différentes préparations vaccinales peuvent réduire la mortalité et la morbidité mais ne préviennent pas l'infection et n'offrent pas une bonne protection croisée contre les autres sérotypes. Il semble donc qu'une approche vaccinale intéressante consisterait en l'utilisation de l'adhésine majeure d'*A. pleuropneumoniae*, soit les LPS, dans le but de bloquer l'étape initiale de l'infection (i.e. la colonisation des voies respiratoires) avant même que les toxines produites par le micro-organisme aient le temps d'agir au niveau pulmonaire.

A notre connaissance, aucune étude utilisant des souches d'*A. pleuropneumoniae* mutées au niveau de la biosynthèse des LPS n'a été réalisée

jusqu'ici. De tels mutants permettraient de clarifier le rôle et le mécanisme d'action des LPS dans la pathogenèse de l'infection à *A. pleuropneumoniae*.

Le présent projet a pour but: (1) d'évaluer le rôle protecteur des adhésines lipopolysaccharidiques d'*A. pleuropneumoniae* chez la souris et le porc; (2) d'obtenir des mutants d'*A. pleuropneumoniae* au niveau de la biosynthèse des LPS afin de confirmer leur rôle dans la pathogénie et, de plus, identifier la région de cette molécule complexe impliquée dans l'adhérence.

## **II. REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## 1. Généralités

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (anciennement connu sous le nom de: *Haemophilus pleuropneumoniae*, *H. parahaemolyticus*) est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine (Nicolet, 1992), maladie décrite pour la première fois en 1957 (Pattison et coll., 1957). Ce micro-organisme est un coccobacille, Gram-négatif, capsulé, anaérobie facultatif et hémolytique (hémolyse  $\beta$  sur gélose sang) (Nicolet, 1992). Deux biotypes ont été décrits: le biotype 1 requiert pour sa croissance du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), une co-déhydrogénase de la chaîne respiratoire, tandis que le biotype 2 est NAD-indépendant (Pohl et coll., 1983). Jusqu'à présent, 12 sérotypes du biotype 1, incluant le sérotype 5 qui a été subdivisé en sous-groupe a et b (Nielsen, 1986b), et 2 sérotypes du biotype 2 ont été décrits selon les différences entre l'antigénicité et la structure de leurs polysaccharides capsulaires (Fodor et coll., 1989; Nielsen, 1986a). Récemment, Jolie et coll. (1994) ont subdivisé le sérotype 1 en sous-groupe a et b selon des différences antigéniques localisées au niveau des lipopolysaccharides et de la capsule. La prévalence des sérotypes varie selon les pays. Au Québec, ce sont les sérotypes 1 et 5 du biotype 1 qui sont prédominants (Mittal, 1992).

## 2. La pleuropneumonie porcine

La pleuropneumonie porcine, répandue mondialement, cause des pertes économiques très importantes à l'industrie porcine. Elle est caractérisée par 3 formes: suraiguë, aiguë et chronique. La forme suraiguë se caractérise par des animaux très malades faisant avec de la fièvre (41,5°C) et de l'anorexie. De plus, une courte période de diarrhée et de vomissement est souvent observée. La phase terminale est caractérisée par une dyspnée sévère et l'animal est cyanosé. Juste avant la mort, des écoulements sanguinolents et mousseux du

nez et de la gueule sont observés. La mort survient entre 24 à 36 heures. La forme aiguë est caractérisée par une évolution de la maladie moins rapide et par des symptômes respiratoires sévères incluant de la dyspnée et de la toux. En plus, les animaux ont une fièvre modérée (40,5-41°C) et souffrent d'anorexie. La forme aiguë peut évoluer vers un stade léthal (mort en ~48 heures) ou vers la forme chronique. Cette dernière est plus difficile à caractériser cliniquement, car les porteurs sont souvent asymptomatiques. Cependant, ils souffrent d'anorexie sévère ce qui résulte en une diminution du gain de poids (Nicolet, 1992).

Les lésions résultant de l'infection sont principalement localisées dans le tractus respiratoire. Une pleurésie fibrineuse massive généralisée ou locale caractérise les formes suraiguë et aiguë de l'infection. La cage thoracique est riche en liquide séro-sanguinolent. Tous les lobes pulmonaires peuvent être affectés mais les lésions sont plus fréquentes au niveau des lobes diaphragmatiques. La forme suraiguë se caractérise par une pneumonie à caractère hémorragique. Le poumon est ferme au toucher et de couleur variable, allant du rouge clair au rouge foncé. Dans la forme aiguë, une pleuropneumonie fibrino-hémorragique ou fibrino-nécrotique peut se développer. La partie atteinte du poumon est friable et de couleur rouge foncé et les foyers affectés sont parfois confluents. L'aspect des lésions de la forme chronique est variable. On peut rencontrer des adhérences pleurales locales avec ou sans abcès de grosseur variable dans les lobes diaphragmatiques. Ces abcès sont entourés d'une capsule de tissu conjonctif (Nicolet, 1992).

La morbidité et la létalité varient selon la virulence de la souche infectante et la présence de facteurs prédisposants (ex: température et ventilation). En général, lorsque *A. pleuropneumoniae* est introduit dans un

troupeau susceptible, la maladie est extrêmement invasive. Si tous les groupes d'âge peuvent être atteints, ce sont les jeunes animaux qui sont le plus menacés. Ainsi, les cas aigus sont le plus souvent observés chez les cochons de lait dans les exploitations d'élevages (Europe), alors qu'à l'engraissement ce sont les animaux nouvellement introduits dans le troupeau qui manifestent la maladie (Canada). La principale source d'infection demeure le porc lui-même. Ce sont des animaux apparemment sains (porteurs asymptomatiques) qui sont la cause la plus fréquente de la transmission de l'infection entre les troupeaux.

La transmission qui se produit entre les porcs est due, à courte distance, soit à des aérosols, soit par contact direct entre les porcs, soit par des voies indirectes (souillures de l'environnement) qui sont particulièrement actives lors de manifestations aiguës de la maladie où l'agent infectieux est excrété massivement dans les sécrétions nasales. Aussi, l'augmentation des facteurs de stress comme l'entassement, le transport, les changements brusques de température ou une mauvaise ventilation augmentent l'incidence de la maladie (Nicolet, 1987; 1992).

### **3. Facteurs de virulence**

#### **3.1 Capsule polysaccharidique**

*A. pleuropneumoniae* est généralement capsulé mais l'épaisseur du matériel capsulaire varie selon l'isolat et l'âge de la culture (Jacques et coll., 1988). Les cellules d'*A. pleuropneumoniae* retrouvées dans les poumons de porcs infectés sont aussi recouvertes d'une couche de polysaccharides capsulaires (Jacques et coll., 1988; Jensen et Bertram, 1986). La composition et la structure de la capsule ont été déterminées pour les souches de référence de chaque sérotypes (Perry et coll., 1990). Ainsi, il a été démontré que la

capsule de cet organisme est composée d'unités répétitives d'oligosaccharides et qu'elle est chargée négativement due aux résidus d'acide carboxylique ou de phosphate (Perry et coll., 1990). La capsule est la première structure qui protège la bactérie de différents mécanismes de défense de l'hôte, comme la phagocytose et l'effet bactéricide du sérum (Inzana et Mathison, 1987; Inzana et coll., 1988; Rycroft et Cullen, 1990; Ward et Inzana, 1994). Jacques et coll. (1988) ont démontré, en utilisant la microscopie électronique, que l'épaisseur de la capsule variait selon le sérotype, c'est-à-dire que les sérotypes plus virulents possédaient une capsule plus épaisse. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi les sérotypes ne possèdent pas tous le même degré de virulence. De plus, Paradis et coll. (1996) ont démontré que la croissance sous des conditions réduites en fer, condition comparable à ce qu'on retrouve *in vivo*, n'affecte pas la production de la capsule.

Récemment, Ward et Inzana (1997) ont identifié, cloné et séquencé une portion du locus (*cpxDCBA*) impliqué dans l'exportation des polysaccharides capsulaires d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5a. Ils ont utilisé une sonde homologue au locus impliqué dans la biosynthèse de la capsule d'*Haemophilus influenzae* type b, un micro-organisme apparenté.

## **3.2 Lipopolysaccharides**

### **3.2.1 Structures des lipopolysaccharides**

Le lipopolysaccharide (LPS ou endotoxine) d'*A. pleuropneumoniae* est une molécule complexe comprenant trois régions distinctes: le lipide A, le noyau oligosaccharidique et l'antigène O. Le lipide A, partie toxique du LPS, est la région la moins variable. Elle est principalement constituée d'un sucre (diglucosamine), de groupes phosphates et de longues chaînes d'acides gras. Celui-ci sert à ancrer le LPS dans la membrane externe du micro-organisme



(Rietschel et Brade, 1992). Le lipide A des LPS d' *A. pleuropneumoniae* peut lier l'hémoglobine porcine et possiblement être impliqué dans l'acquisition de fer chez ce micro-organisme (Bélangier et coll., 1994; 1995). Il a été aussi démontré que la liaison de l'hémoglobine avait un effet sur les propriétés physiques et biologiques du LPS d' *A. pleuropneumoniae* (Archambault et coll., 1997).

Le noyau oligosaccharidique est composé d'un noyau interne et d'un noyau externe. Le noyau interne comporte deux sucres inhabituels: l'heptose et l'acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique (KDO). Le KDO comporte huit atomes de carbone et relie la partie polysaccharidique au lipide A. Le noyau externe est, quant à lui, composé d'hexoses. Le noyau est structurellement plus uniforme que l'antigène O, ce dernier étant le segment le plus variable de l'endotoxine.

L'antigène O est composé d'unités répétées d'oligosaccharides. La composition et la structure de ces unités oligosaccharidiques ont été déterminées pour tous les sérotypes (Perry et coll., 1990). Dépendant de la présence ou de l'absence de l'antigène O, les LPS d' *A. pleuropneumoniae* sont classifiés en 3 profils électrophorétiques: lisse (sérotypes 2, 4, 5 et 7), semi-rugueux (sérotypes 1 et 5) et rugueux (sérotypes 3 et 6) (Bélangier et coll., 1990, Byrd et Kadis, 1989; Fenwick et coll., 1986b; Perry et coll., 1990). Même si la composition de l'antigène O est spécifique au sérotype, leur longueur peut différer entre les souches, donnant des profils différents à l'intérieur du même sérotype (Altman et coll., 1990).

### 3.2.2 Fonctions des lipopolysaccharides

L'adhérence de micro-organismes à la surface des cellules de l'hôte représente la première étape de la pathogenèse d'infections bactériennes. Les bactéries possèdent des molécules ou structures de surface (appelées adhésines) capables de se lier de façon spécifique à d'autres molécules (appelées récepteurs) situées à la surface des muqueuses de l'hôte (Cundell et Tuamanen, 1995). L'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* serait facilitée par un appareil muco-ciliaire trachéo-bronchique endommagé, par un synergisme avec *Mycoplasma hyopneumoniae* qui agirait comme facteur favorisant la destruction de l'appareil muco-ciliaire mais également par son action immunosuppressive (Yagihashi et coll., 1984), par une infection massive qui dépasserait les capacités d'épuration de l'appareil muco-ciliaire ou par le contournement de la barrière muco-ciliaire par la bactérie. Cette dernière possibilité demande un environnement favorable (température et humidité) à la formation d'aérosols suffisamment fins pour conserver la bactérie en suspension et permettre son passage directement de l'air inspiré aux poumons (Vaillancourt et coll., 1987).

Il a été démontré que le LPS est l'adhésine majeure d'*A. pleuropneumoniae* (pour une revue voir Jacques, 1996). De plus, l'adhérence semble être reliée au profil électrophorétique des LPS car les isolats faisant partie des sérotypes possédant des LPS lisses adhéraient fortement aux anneaux de trachée de porcelet tandis que ceux faisant partie des sérotypes ayant des LPS semi-rugueux adhéraient faiblement (Bélanger et coll., 1990). Aussi, la capacité d'*A. pleuropneumoniae* d'adhérer aux cellules du tractus respiratoire porcin apparaît être plus important que l'affinité pour le mucus (Bélanger et coll., 1992). Plus récemment, il a été démontré que la partie lipidique du LPS n'était pas responsable de l'adhérence d'*A.*

*pleuropneumoniae* mais, qu'au contraire, la partie polysaccharidique était responsable de son adhérence aux cellules des voies respiratoires du porc (Paradis et coll., 1994).

Diverses activités biologiques du LPS ont été amplement étudiées (Rietschel et Brade, 1992). Il a été démontré que les anticorps dirigés contre les LPS seraient impliqués dans un mécanisme de résistance à l'activité bactéricide du sérum. Ces anticorps diminueraient l'adhérence du facteur C9 à la surface bactérienne (Ward et Inzana, 1994). Udeze et coll. (1987) et Idris et coll. (1992) ont aussi suggéré que l'effet du LPS est relié à la réponse inflammatoire et que cette réponse n'est pas associée au développement de lésions nécrotiques et hémorragiques. Les LPS n'agissent sur l'organisme que lorsqu'ils sont libérés par les bactéries, lors de la lyse ou lors de la multiplication des micro-organismes. Une fois libérés, les LPS via le lipide A stimulent le relâchement de médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire par différentes cellules, incluant les macrophages. Les macrophages activés produisent alors trois groupes de puissants médiateurs: des protéines (TNF, IL1, IL6 et IL8), des radicaux libres oxygénés ( $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et NO) et des lipides (prostaglandine  $\text{E}_2$ ). Lorsque ces médiateurs sont libérés en petite quantité, ils produisent des effets bénéfiques (fièvre modérée, stimulation générale du système immunitaire et destruction du micro-organisme) mais lorsqu'ils sont libérés en grande quantité, ils produisent des effets néfastes (fièvre élevée, hypotension, coagulation sanguine disséminée et choc léthal) sur l'organisme (Rietschel et Brade, 1992).

### 3.2.3 Biosynthèse des lipopolysaccharides

Une nouvelle nomenclature des gènes impliqués dans la biosynthèse des polysaccharides bactériens a été proposée par Reeves et coll. (1996). Ce système de nomenclature est basé sur le principe que les gènes ayant la même fonction porteront le même nom. Mais étant donné que cette nomenclature n'est pas encore très utilisée, j'utiliserai la nomenclature courante pour expliquer la biosynthèse des LPS.

La biosynthèse des LPS est très complexe. Etant donné que celle des LPS d'*A. pleuropneumoniae* n'est pas connue, la biosynthèse des LPS d'*Escherichia coli* K-12 et de *Salmonella enterica* sérovar *Typhimurium* LT2 sera utilisée pour expliquer ce système complexe. Au moins 50 gènes sont requis pour la biosynthèse et l'assemblage des LPS (Schnaitman et Klena, 1993).

L'uridine diphospho-N-acétyle-D-glucosamine (UDP-GlcNac) joue un rôle primordial dans l'assemblage des polymères de surfaces bactériens. L'UDP-GlcNac sert entre autre, chez *E. coli* K-12, à initier la formation du lipide A (Galloway et Raetz, 1990). La biosynthèse des LPS sera donc initiée par le transfert d'une chaîne d'acide gras (R-3-hydroxymyristoyl-ACP) à l'UDP-GlcNac par une enzyme codée par le gène *lpxA* (Anderson et coll., 1987; 1993; Coleman et Raetz, 1988), pour donner le UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-GlcNac (Figure 1, p. 13). Suivant la déacylation de cette molécule par une déacétylase codée par le gène *envA* (*lpxC*), le précurseur du sucre du lipide A (UDP-2,3-diacylglucosamine) sera formé par l'incorporation d'une autre chaîne d'acide gras à l'UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-GlcNac (Kelly et coll., 1993). Cette réaction est catalysée par une N-acyltransférase codée par le gène *firA* (*lpxD*). Certaines des molécules du précurseur du sucre

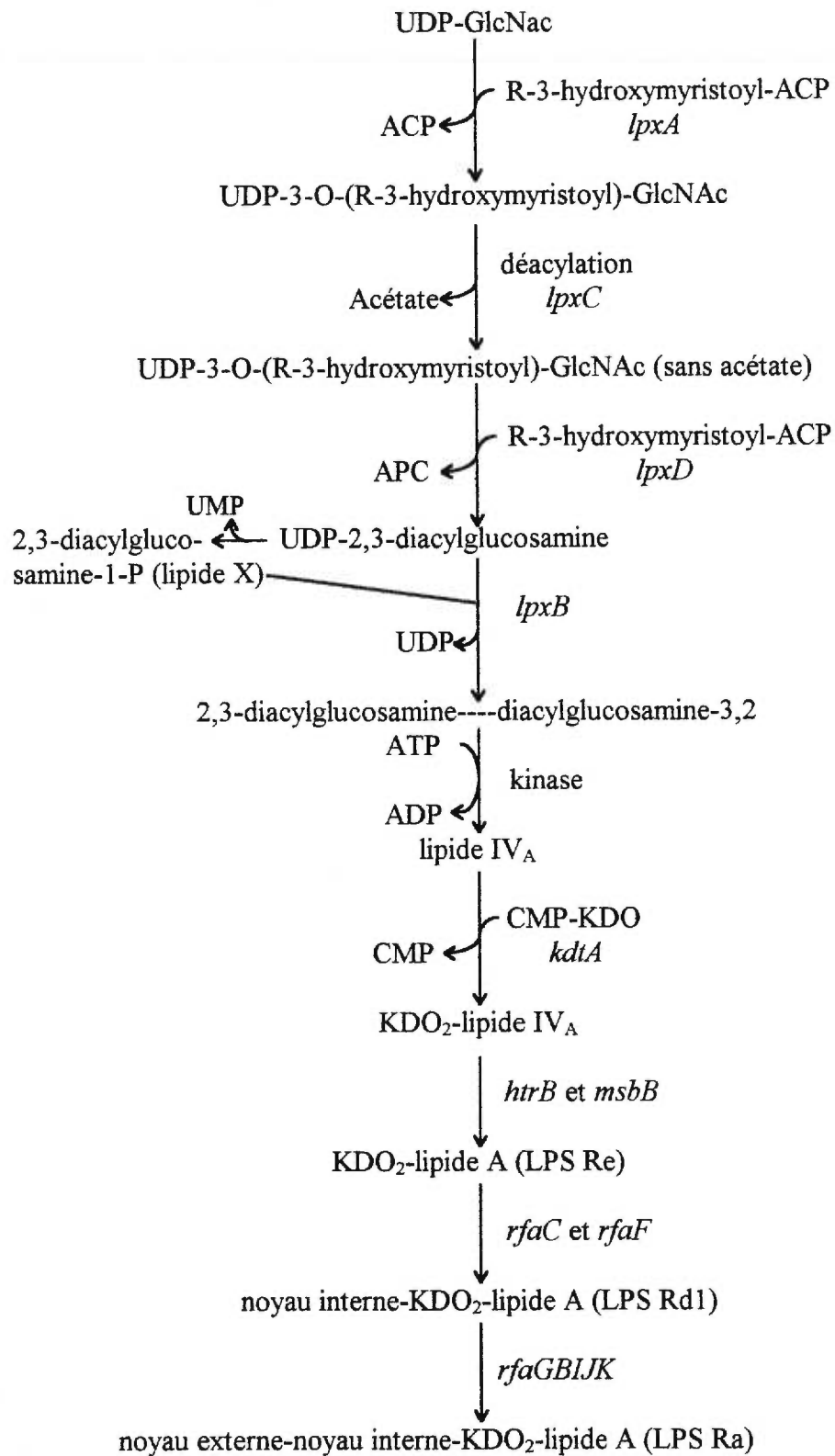


Figure 1. Biosynthèse du lipide A et du noyau oligosaccharidique. Les gènes impliqués dans la synthèse sont indiqués en italique. Modifiée selon Raetz (1996).

du lipide A seront clivées à la liaison pyrophosphate pour générer le lipide X (2,3-diacylglucosamine-1-phosphate) (Raetz, 1996). La formation du disaccharide du lipide A implique la liaison du lipide X avec une molécule du précurseur dans une réaction catalysée par une disaccharide synthétase codée par le gène *lpxB* (Crowell et coll., 1987). Il en résulte un lien  $\beta,1'-6$  entre les deux glucosamines retrouvés dans les molécules de lipide A de tous les LPS connus (Ray et coll., 1984). Après l'incorporation d'un phosphate à la position 4' générant le lipide IV<sub>A</sub>, celui-ci liera deux molécules de KDO, issues du CMP-KDO, et ainsi formera la molécule KDO<sub>2</sub>-lipide IV<sub>A</sub>. Comme dernière étape, des molécules de laurate et myristate sont incorporées au lipide IV<sub>A</sub> par deux enzymes, la lauroytransférase (codée par *htrB*) (Clementz et coll., 1995) et l'acyltransférase (codée par le gène *msbB*) (Clementz et coll., 1995). Le résultat final est le KDO<sub>2</sub>-lipide A (LPS Re).

Par la suite, les différents sucres composant le noyau oligosaccharidique seront synthétisés et liés à cette molécule. Cependant, les enzymes qui incorporent les sucres et les autres constituants au noyau oligosaccharidique ne sont pas bien caractérisés. Ceci est dû aux structures des substrats utilisés par les enzymes et les produits générés par celles-ci qui ne sont pas bien connus et, aussi, des substrats synthétiques requis pour compléter l'étude de la biosynthèse qui ne sont pas disponibles commercialement. La biosynthèse du noyau oligosaccharidique est sous le contrôle de l'opéron *rfa*. La région *rfa* d'*E.coli* consiste en 14 gènes organisés en 2 opérons majeurs qui sont transcrits en direction opposée (Raetz, 1996). Un petit opéron contenant les gènes *kdtA* et *orf18* est situé immédiatement à côté de l'opéron *rfa*. L'un des opéron majeur commence avec le gène *rfaD*, code pour quatre gènes (*DFCL*) et est sous un contrôle de type thermique (Raina et Georgopoulos, 1991). Les gènes *rfaD*, *rfaC* et *rfaF*, impliqués dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique

interne, codent pour une ADP-heptose épimérase (Coleman, 1983), la première heptosyltransférase (Sirisena et coll., 1992) et la deuxième heptosyltransférase (Sirisena et coll., 1992) respectivement. Ces deux dernières enzymes transfèrent un heptose sur la molécule KDO<sub>2</sub>-lipide A. L'autre opéron commence avec le gène *rfaQ* qui est régulé par le gène *rfaH* (Raetz, 1996). Les gènes *rfaGBIJK* sont impliqués dans la biosynthèse de la région externe du noyau oligosaccharidique. Ils sont impliqués dans l'attachement séquentiel de glucose et de galactose (Shnaitman et Klena, 1993). Le rôle des gènes *rfaQ*, -*S*, -*Y*, -*Z* et -*K* d'*E. coli* et de *Salmonella* sont incertains (Parker et coll., 1992; Sirinera et coll., 1992). Dans *S. typhimurium* LT2, le gène *rfaK* coderait pour une enzyme qui lie un GlcNAc au noyau externe (Shnaitman et Klena, 1993). Cette liaison serait requise pour l'attachement de l'antigène O (Shnaitman et Klena, 1993). Plusieurs gènes qui participent à la biosynthèse du noyau oligosaccharidique sont situés à l'extérieur de l'opéron *rfa*. Parmi ces gènes, il y a le gène *rfaH* qui contrôle le gène *rfaQ*, le gène *rfaE* qui est requis pour la fabrication de l'ADP-heptose, substrat utilisé pour l'attachement des résidus heptose à la région KDO<sub>2</sub>-lipide A et, finalement le gène *galU* qui serait impliqué dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique externe comme cela a été démontré chez *Shigella flexneri* (Sandlin et coll., 1995) et *Haemophilus influenzae* (Hood et coll., 1996).

La biosynthèse de l'antigène O est contrôlée par les gènes de l'opéron *rfb* (Raetz, 1996). Puisque la structure de l'antigène O est très variable, la séquence nucléotidique de cette région est aussi très variable parmi les bactéries Gram-négatif. Les quatre premiers gènes de cet opéron (*BDAC*) codent pour une enzyme qui génère le sucre dTDP-rhamnose tandis que les gènes suivants, c'est-à-dire les gènes *IFGHJ*, codent pour les enzymes qui fabriquent le 3,6-didésoxyhexose (Shaitman et Klena, 1993). Ces deux sucres

sont utilisés comme substrat dans la biosynthèse de l'antigène O. Celui-ci est synthétisé indépendamment du lipide A et du noyau oligosaccharidique sur un transporteur lipidique, le undécaprénol-phosphate (und-P) (Whitfield, 1995). Le cycle de la biosynthèse de l'antigène O est initié, pour *S. typhimurium*, par le transfert d'une molécule de galactose-1-phosphate au und-P par une enzyme codée par le gène *rfbP* (Figure 2, p. 17) (Raetz, 1996). Ensuite, il y a une suite de glycosylations séquentielles catalysées par des transférases codées par les gènes *rfbN*, *rfbU* et *rfbV* (Raetz, 1996). Par la suite, il y a polymérisation de la chaîne de l'antigène O. Une caractéristique importante de cette polymérisation réside dans le fait que les unités oligosaccharidiques nouvellement synthétisées sont introduites au bout réducteur de la chaîne en croissance, c'est-à-dire que la molécule und-P liée à plusieurs unités oligosaccharidiques ((X-Y-gal)<sub>n</sub>-PP-und) est utilisée comme substrat de la polymérase (Figure 2, p. 17). Cette polymérisation est sous le contrôle du gène *rfc* (*rol*). Puis, l'antigène O est transféré et lié au noyau oligosaccharidique-lipide A sur la membrane cytoplasmique du côté périplasmique. La réaction de ligation est codée par le gène *rfaL* (Whitfield, 1995). Finalement, le LPS complet est transféré sur la surface bactérienne par un mécanisme inconnu (Whitfield, 1995). Cependant, il existerait d'autres mécanismes concernant la ligation de l'antigène O à la région du noyau oligosaccharidique-lipide A. Il semblerait que l'antigène O pourrait se lier à la région noyau oligosaccharidique-lipide A du côté cytoplasmique de la membrane cytoplasmique et, par la suite, la molécule complète du LPS serait transférée sur la membrane externe de la bactérie par un mécanisme inconnu (Paulsen et coll., 1997).

Jusqu'à récemment, seulement deux processus étaient connus pour la polymérisation de l'antigène O. Il y a celui Rfc-dépendant (voir ci-haut) et celui Rfc-indépendant. Le Rfc-indépendant est caractérisé par une réaction



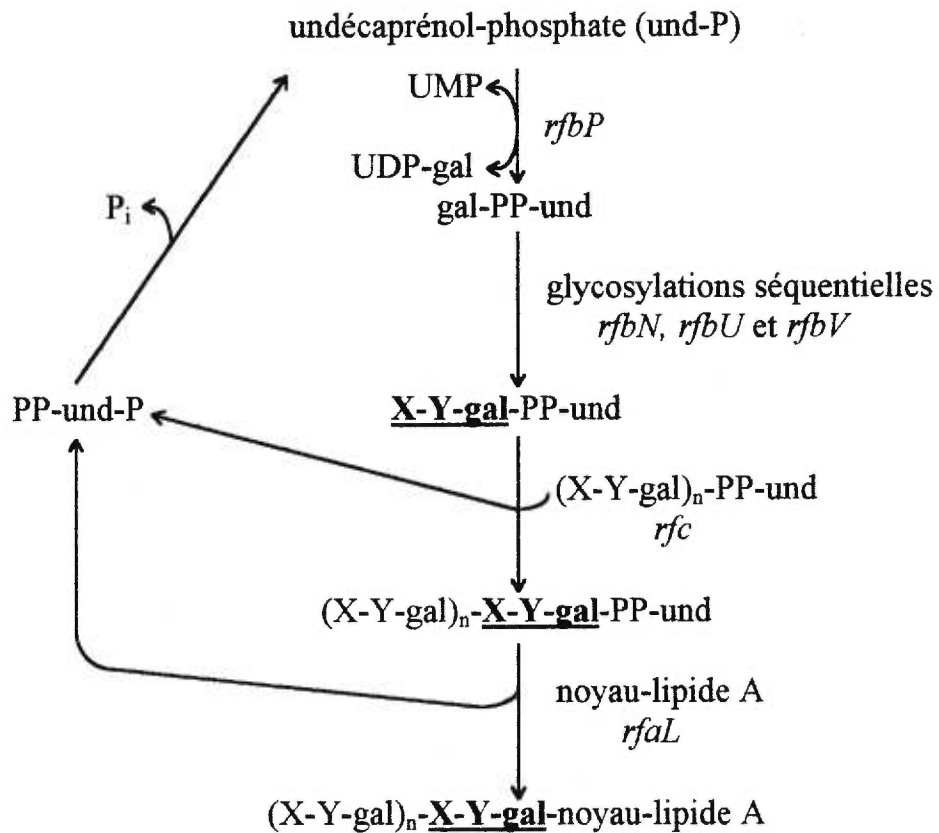


Figure 2. Biosynthèse de l'antigène O. Les gènes impliqués dans la synthèse sont indiqués en italique. La nouvelle unité de l'antigène O est indiquée en caractères gras. X et Y représentent des sucres (hexoses). Modifiée selon Raetz (1996).

initiée par l'enzyme Rfe (voir ci-bas), par une polymérisation qui se produit par un transfert séquentiel sur le bout non-réduit de résidus glycosylés et par une seule molécule de und-P (Whitfield et coll., 1997). Récemment, Keenleyside et Whitfield (1996) ont mis à jour un troisième processus qui est retrouvé chez *S. enterica* sérovar *Borrez*. Ce processus nécessite l'enzyme Rfe et il est Rfc-indépendant. Etant donné que ce ne sont pas tous les antigènes O qui contiennent du galactose, une autre enzyme que RfbP est nécessaire pour initier la biosynthèse de l'antigène O. Cette enzyme, une N-acétylglucosamine-1-phosphatetransférase codée par le gène *Rfe*, est utilisée chez plusieurs micro-organismes soit *E. coli*, *S. flexneri* et *S. dysenteriae* type 1 (Whitfield, 1995).

Etant donné la très grande connaissance de la biosynthèse des LPS de *Salmonella*, différents LPS mutés au niveau du noyau oligosaccharidique sont disponibles commercialement. Ces LPS sont appelés Re (muté dans *rfaE*, *rfaD*, *rfaC*), Rd<sub>2</sub> (muté dans *rfaF*), Rd<sub>1</sub> (muté dans *rfaG*), Rc (muté dans *rfaP*) et Ra (muté dans *rfaL*, *rfaT*) (Sirisena et coll., 1992).

### 3.3 Exotoxines

Les neutrophiles et les macrophages du tissu pulmonaire peuvent être affectés par certaines toxines. *A. pleuropneumoniae* élabore différentes toxines labiles à la chaleur qui peuvent détruire ces constituants du système immunitaire et, par conséquent, favoriser sa multiplication. Ces différentes toxines, membres de la famille des toxines RTX (repeats in the structural toxin), sont connues sous les noms ApxI, ApxII et ApxIII pour *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxins (Frey et coll., 1993; Frey, 1995). Ces toxines contiennent des régions répétées riches en glycine et leur toxicité envers les macrophages et les neutrophiles est due à la formation de pores (Frey et coll.,

1993; Lalonde et coll., 1989; Maier et coll., 1996). Ces trois toxines sont des protéines dont le poids moléculaire est 105 kDa (ApxI), entre 103 et 105 kDa (ApxII) et 120 kDa (ApxIII). ApxI est synthétisée par les souches des sérotypes 1, 5a, 5b, 9, 10 et 11. Celle-ci est hautement hémolytique et possède une très grande activité cytotoxique pour les macrophages alvéolaires et les neutrophiles porcins. De plus, elle est inductible par le calcium. Pour ce qui est d'ApxII, elle est synthétisée par tous les sérotypes sauf le sérotype 10. Elle est faiblement hémolytique et modérément cytotoxique. Enfin, ApxIII est fabriquée par les sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8. Cette protéine est non-hémolytique mais hautement cytotoxique (Frey et coll., 1993; Inzana, 1991; Tascón et coll., 1996). Récemment, Frey et coll. (1997) ont découvert une nouvelle toxine RTX chez *A. pleuropneumoniae*. Cette toxine serait présente chez tous les sérotypes et posséderait un poids moléculaire variant entre 154 et 186 kDa. En plus, elle serait exprimée seulement dans des conditions *in vivo*.

Les gènes impliqués dans la biosynthèse de ces toxines sont retrouvés dans une seule unité transcriptionnelle, CABD, et sont exprimés à partir d'un promoteur commun situé en amont du gène *C*. Le gène *A* est celui de la protéine structurale, le gène *C* code pour une protéine activatrice qui est impliquée dans la conversion de la protoxine en toxine active. Les gènes *B* et *D* codent pour des protéines associées à la membrane qui sont essentielles dans le processus de la sécrétion des toxines (Welch et Pellett, 1988). Les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ApxI sont regroupés sous l'opéron *apxI*. Les gènes de cette opéron sont désignés *apxIC*, *apxIA*, *apxIB* et *apxID*. Concernant les gènes de la toxine ApxII, ils font partie de l'opéron *apxII*. Les gènes de l'opéron *apxII* sont désignés *apxIIC* et *apxIIA*. Aucun gène de sécrétion n'a été identifié dans cet opéron. La toxine ApxIII est codée par l'opéron *apxIII*. Les

gènes de cet opéron sont désignés *apxIIIC*, *apxIIIA*, *apxIIIB* et *apxIIID* (Frey, 1995).

Récemment, Kamp et coll. (1997) ont démontré clairement, par l'inoculation de porcs avec des préparations purifiées, que les toxines ApxI, ApxII et ApxIII sont les facteurs de virulence responsables du développement des symptômes cliniques et des lésions caractéristiques de la pleuropneumonie porcine.

### 3.4 Protéines de la membrane externe

On retrouve, chez les sérotypes 1 à 9 d'*A. pleuropneumoniae*, trois à cinq protéines majeures et 10 à 20 protéines mineures au niveau de la membrane externe (Inzana, 1991). En plus, sous des conditions de croissance pauvres en fer, *A. pleuropneumoniae* exprime des protéines de la membrane externe régulées par le fer (Deneer et Potter, 1989a; Morton et Williams, 1989; Niven et coll., 1989). Niven et coll. (1989) ont démontré qu'*A. pleuropneumoniae* peut croître sur un milieu qui est pauvre en fer en présence de la transferrine porcine mais pas en présence de la transferrine bovine ou humaine. La capacité de cette bactérie de lier, via des protéines de 56 et 105 kDa (Gonzalez et coll., 1990), la transferrine porcine pour obtenir le fer de l'hôte pourrait expliquer la spécificité que cette bactérie possède vis-à-vis du porc. Jusqu'à tout récemment, aucun sidérophore n'avait été trouvé chez *A. pleuropneumoniae* (Niven et coll., 1989). Cependant, Diarra et coll. (1996) ont démontré que des souches d'*A. pleuropneumoniae* des sérotypes 1 et 5 sécrétaient à l'intérieur d'un milieu de culture pauvre en fer, un sidérophore qui n'appartient pas à la famille des cathécoles et des hydroxamates (familles connues et bien caractérisées de sidérophores). Cette étude est la première démontrant qu'*A. pleuropneumoniae* produit des sidérophores.

Une protéine de 42 kDa a aussi été retrouvée chez des souches d'*A. pleuropneumoniae* des sérotypes 1, 2, 3, 5, 6 et 7 lorsque le maltose est ajouté au milieu de culture (Deneer et Potter, 1989b). Cette protéine serait impliquée dans le transport du maltose et permettrait une meilleure croissance *in vitro*. Cependant, aucun rôle dans la virulence n'a été associé à cette protéine. Une autre protéine de la membrane externe d'environ 50 kDa a été caractérisée chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Cette protéine est une lipoprotéine A et elle est appelée OmlA. Des porcs immunisés avec cette protéine sont protégés contre une infection avec une souche d'un même sérotype (Gerlach et coll., 1993). Ce qui suggère qu'elle a peut-être un rôle important dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae*. Récemment, Frey et coll. (1996) ont cloné une protéine de 14 kDa d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 2 qui appartient à la famille des lipoprotéines PAL. Cette protéine, hautement immunogène, est exprimée par tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. De plus, elle est analogue aux lipoprotéines PAL associées au peptidoglycane d'*E. coli* et à la protéine P6 d'*H. influenzae*. Le rôle exact de cette protéine reste à déterminer.

### 3.5 Autres facteurs contribuant à la virulence

Une équipe de chercheurs a réussi à identifier des fimbriae chez des isolats d'*A. pleuropneumoniae* après croissance sur gélose sang (Utrera et Pijoan, 1991). Cependant, ces fimbriae étaient rapidement perdus après quelques passages sur ce milieu. Aucun rôle n'a été associé à cette structure dans la virulence de la bactérie.

Le mucus contient des immunoglobulines A sécrétoires (IgAs) qui assurent une protection au niveau des muqueuses du porc. Pour contourner ce problème, *A. pleuropneumoniae* synthétise une protéase capable de cliver ces immunoglobulines et ainsi faciliter la colonisation des voies respiratoires

(Euzeby, 1993). Negrete-Abascal et coll. (1994) ont démontré que certaines protéases d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 dégradent aussi la gélatine, l'hémoglobine et les immunoglobulines IgA porcines. Ces protéases pourraient être impliquées dans les lésions pulmonaires en clivant directement les protéines de l'hôte.

Un facteur de perméabilité a été retrouvé dans le surnageant de culture chez des isolats des sérotypes 1 et 5 d'*A. pleuropneumoniae* (Lallier et coll., 1987). Ce facteur est non-hémolytique, non-protéolytique et cause de l'oedème dermique chez le lapin. Son rôle reste à être clarifié.

#### **4. Contrôle de la pleuropneumonie porcine**

##### **4.1 Antibiothérapie**

L'intervention thérapeutique n'est favorable que dans la phase aiguë de l'infection et se base sur l'administration d'antibiotiques. Le choix de l'antibiotique se portera sur la substance la plus active et possédant les propriétés pharmacocinétiques les plus favorables. En règle générale, ce sont les bêtalactamines (pénicillines et céphalosporines), les tétracyclines, le chloramphénicol, le triméthoprim et sa combinaison avec un sulfamidé qui sont les plus actifs (Nicolet, 1992). De nouveaux antibiotiques ont fait leur apparition. Des dérivés de quinolones, comme par exemple l'enrofloxacin ou des antibiotiques semi-synthétiques comme les céphalosporines ont été très efficaces lors d'une infection expérimentale (Kobisch et coll., 1990; Stephano et coll., 1990). De plus, le tilmicosin mélangé à la nourriture est aussi efficace contre la pleuropneumonie porcine (Moore et coll., 1996).

Cependant, la résistance aux antibiotiques est de plus en plus répandue. La résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine et aux sulfonamides est associée à de petits plasmides. Hirsh et coll. (1982) ont démontré, chez certaines souches américaines, que la résistance à l'ampicilline et aux sulfadiazines était reliée à la présence du plasmide pVM105 tandis que, pour d'autres souches, la résistance à la streptomycine et aux sulfadiazines était reliée aux plasmides pVM104 et pVM106. Ces plasmides ont été aussi retrouvés chez des souches ontariennes (Gilbride et coll., 1989). Concernant les souches québécoises, Vaillancourt et coll. (1988) ont rapporté qu'il y avait une augmentation de la résistance à l'érythromycine tandis que tous les isolats demeuraient sensibles à la tétracycline. Cependant, Nadeau et coll. (1988) ont démontré qu'il y avait 68% d'isolats résistants à la tétracycline et qu'aucune résistance n'a été observée pour l'érythromycine.

Le mécanisme de résistance à l'ampicilline a été associé au plasmide ROB-1- $\beta$ -lactamase (Chang et coll., 1992). Récemment, Wasteson et coll. (1996) ont démontré que la résistance à l'érythromycine était reliée aux gènes *erm* qui se situent sur un transposon conjugatif tandis que pour la résistance à la tétracycline, le gène *tet B* n'est pas relié à un plasmide conjugatif mais peut être associé au chromosome. Au Japon, Ishii et coll. (1993) ont démontré que des plasmides de 4,3 et 8,1 Kb codent pour la résistance à la streptomycine et aux sulfonamides tandis que des plasmides de 5,2 et 6,6 Kb codent pour la résistance au chloramphénicol et aux streptomycine-sulfonamides-kanamycine, respectivement.

#### 4.2 Vaccination

Pour ce qui est de la vaccination, elle demeure l'outil de contrôle le plus utile pour l'instant mais un vaccin qui permettrait une protection efficace contre

tous les sérotypes n'est pas encore au point. Des études d'immunisation ont démontré que la vaccination de porcs avec une bactérine (cellule entière inactivée/tuée) protège contre une infection par un isolat du même sérotype mais non contre une infection par un sérotype différent (Tableau I, p. 27). Des extraits cellulaires et des surnageants de culture ont aussi été évalués afin de déterminer leur effet protecteur (Tableau I, p. 27). Ces antigènes étaient composés de polysaccharides, de LPS et de protéines. De plus, une activité hémolytique a été observée dans les surnageants de culture. Différentes molécules (e.g. capsule, protéines de la membrane externe, toxines RTX) ont également été évaluées séparément afin de déterminer leur rôle dans la protection (Tableau I, p. 27). Ces différentes préparations vaccinales peuvent réduire la mortalité et la morbidité mais ne préviennent pas l'infection et n'offrent pas une bonne protection croisée contre les autres sérotypes. Le même résultat a été aussi observé dans les essais de protections passives (Tableau II, p. 30) et dans les immunisations avec différents mutants d'*A. pleuropneumoniae* (Tableau III, p. 31). Tel qu'observé dans les différents travaux, le type d'adjuvant peut augmenter l'efficacité du vaccin. Ainsi, différents adjuvants peuvent entrer dans leur composition même si certains adjuvants peuvent produire des lésions au site de vaccination (Straw et coll., 1985). Il existe les émulsions eau/huile dont la plus connue est certainement l'adjuvant incomplet de Freund. Cet adjuvant consiste en une émulsion d'un antigène solubilisé dans une solution aqueuse et d'une huile minérale de basse viscosité. Un autre adjuvant de ce type est le TiterMax. Cet adjuvant contient une huile métabolisable et des polymères non-ioniques composés de chaînes hydrophiles et hydrophobes qui permettent la liaison de l'antigène. Il existe aussi les adjuvants à base d'huile végétale, comme l'huile d'arachide. Récemment, les émulsions eau-huile-eau ont fait leur apparition. Ces adjuvants consistent en une réémulsion d'une émulsion eau-huile



conventionnelle avec le détergent Tween 80. Cet adjuvant est plus facile à administrer et plus stable. Il y a aussi les adjuvants huile/eau. Le «Ribi adjuvant system» appartient à ce type d'adjuvant. Celui-ci est composé d'une huile métabolisable et d'un dérivé du LPS qui est non toxique, c'est-à-dire le monophosphoryle lipide A qui permet l'activation des cellules T et des macrophages. L'écorce d'un arbre de l'amérique du sud, le *Quillaja saponaria*, contient une classe de composés nommés saponine ou Quil A, lesquels sont d'excellents adjuvants. Finalement, des adjuvants à base de composés d'aluminium sont aussi disponibles commercialement ( $\text{Al}(\text{OH})_3$  et  $\text{AlPO}_4$ ). Ces adjuvants sont très sécuritaires chez l'humain et, par conséquent, très utilisés dans les vaccins commerciaux (Edelman, 1980; Johnson, 1994). Jusqu'à maintenant, une protection optimale contre une infection par un sérotype homologue ou hétérologue semblait s'observée seulement à la suite d'une infection naturelle avec *A. pleuropneumoniae* (Nielsen, 1979; 1984). Par contre, Crujisen et coll. (1995) ont démontré que des porcs convalescents (à la suite d'une infection expérimentale) étaient protégés contre une réinfection avec une souche homologue, mais lorsque ces porcs étaient réinfectés avec une souche hétérologue, la protection obtenue était variable. Finalement, Fenwick et Osburn (1986) ont établi qu'il y avait une forte réponse immunitaire contre les LPS suivant une infection, mais que celle-ci n'était pas importante après une immunisation à l'aide d'une bactérine. Cette observation pourrait signifier que le manque de protection obtenue avec la bactérine pourrait être dû à un manque d'anticorps dirigés contre le LPS. De plus, Oishi et coll. (1993) ont démontré que des souris ayant reçu un anticorps monoclonal dirigé contre le LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 2 étaient protégées contre une infection avec une souche du même sérotype. Saze et coll. (1994) ont également démontré que des souris étaient protégées contre une souche du même sérotype

suite à une immunisation passive avec des anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène O du LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ou 2.

Ayant précédemment identifié l'adhésine majeure d'*A. pleuropneumoniae*, il nous semble intéressant d'évaluer le rôle protecteur de cette adhésine lipopolysaccharidique chez la souris et le porc. Nous supposons que l'immunisation avec le LPS permettra de bloquer la colonisation des voies respiratoires avant même que les toxines produites par le micro-organisme aient le temps d'agir au niveau pulmonaire.

Tableau I. Résumé des résultats obtenus avec différentes préparations vaccinales d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

Antigènes	Sérotypes	Adjuvants	Modèle	Observations*	Référence
Bactérie	1 et 5	AlPO <sub>4</sub>	Porc	Bonne protection homologue mais signes cliniques sévères	Higgins et coll., 1985
Bactérie	1A ou 1B	-	Porc	1A: protection homologue et hétérologue partielles contre 1B 1B: seulement protection homologue partielle	Jolie et coll., 1995
Bactérie	1, 3, 5 et 9	Emulsigen	Porc	Bonne protection homologue	Tarasiuk et coll., 1994
Bactérie	2	Al(OH) <sub>3</sub>	Porc	Bonne protection homologue mais lésions présentes	Kume et coll., 1985
Bactérie	5	Al(OH) <sub>3</sub>	Souris	Protection homologue partielle	Sebunya et Saunders, 1982
Bactérie et bactéries vivantes	1,2,5 et 7	Al(OH) <sub>3</sub>	Porc	Bonne protection homologue avec bactéries vivantes	Furesz et coll., 1997
Bactérie (immunisation par aérosol)	2	Quil A	Porc	Bonne protection homologue et lésions présentes	Loftager et coll., 1993
App mort ou vivant (Immunisation par aérosol)	9	-	Porc	Bonne protection homologue et lésions présentes	Hensel et coll., 1995a
App mort ou vivant (Immunisation orale)	9	-	Porc	Bonne protection homologue et lésions présentes	Hensel et coll., 1995b
Bactérie	E. coli J5	-	Porc	Bonne protection mais présence de lésions	Fenwick et coll., 1986a
Extrait cellulaire avec CaCl <sub>2</sub> ou LiCl et une préparation d'hémolysines	1	AlPO <sub>4</sub> ou Al(OH) <sub>3</sub>	Porc et souris	Souris: Protection homologue et hétérologue significative avec LiCl/AlPO <sub>4</sub> + hémolysine Porc: Bonne protection homologue avec hémolysine + LiCl/Al(OH) <sub>3</sub>	Beaudet et coll., 1994

Tableau I. Suite.

Extrait cellulaire purifié par chromatographie	1	Ampligen ou Emulsigen plus	Porc	Bonne protection homologue	Willson et coll., 1995
Surageant de culture précipité	1	Emulsigen	Porc	Bonne protection homologue	Fedorka-Cray et coll., 1990
Surageant de culture précipité	1	Emulsigen	Porc	Bonne protection homologue mais signes cliniques et lésions	Fedorka-Cray et coll., 1993
Surageant de culture précipité	1,2 ou 5	adjuvant huileux ISA-70	Souris	Bonne protection homologue et protection hétérologue partielle	Oishi et coll., 1995
Bactérine, capsule, LPS ou ApxI	1 ou 5	Adjuvant incomplet de Freund	souris	Protection homologue et hétérologue partielles. Bactérine + ApxI: bonne protection homologue	Bhatia et coll., 1991
Hémolysine de 104 kDa (ApxI)	1	Quil A	Porc	Bonne protection homologue mais lésions présentes	Devenish et coll., 1990
ApxI et ApxII purifiées par chromatographie	1	AIPO <sub>4</sub>	Porc	Bonne protection homologue mais lésions présentes	Haga et coll., 1997
Hémolysine purifiée (ApxI)	5	complet de Freund	Souris et porc	<b>Souris:</b> Bonne protection homologue <b>Porc:</b> Aucune protection	Inzana et coll., 1991
OMP et ApxI	1	Huile d'arachide/lécithine/ glycérite	Porc	Bonne protection homologue et aucune protection hétérologue (sérotypage 5). Lésions présentes	Madsen et coll., 1995
Protéines recombinantes: cytolysine de 103kDa (ApxII) et protéine de 60 kDa	7	Amphigen + Tween 80 + Span 80	Porc	Bonne protection homologue et aucune protection hétérologue (sérotypage 1)	Rossi-Campos et coll., 1992
Protéine recombinante OmlA	1	Emulsigen plus	Porc	Bonne protection homologue mais présence de lésions	Gerlach et coll., 1993
OMP	5	Adjuvant incomplet de Freund et Al(OH) <sub>3</sub>	Porc	Bonne protection homologue	Rapp et Ross, 1988
Membrane externe non traité, traité avec protéinase K ou périodate	5	Adjuvant incomplet de Freund	Porc	Bonne protection homologue avec traitement protéinase K mais lésions présentes	Chiang et coll., 1991

Tableau I. Suite.

Capsule extraite avec NaCl ou Cetavlon	1	Al(OH) <sub>3</sub>	Souris et Porc	Souris: Bonne protection homologue avec l'extrait Cetavlon Porc: le combiné des 2 extraits réduit la mortalité	Rosendal et coll., 1986
ApXI-CP et ApXI-LPS	1	Adjuvants complet et incomplet de Freund	Porc	Bonne protection homologue et lésions présentes	Byrd et coll., 1992

\*Bonne protection: > 50% de survivants; Protection partielle: < 50% de survivants.

Tableau II. Protection passive obtenue avec différents anticorps dirigés contre *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Antigènes	Sérotypes	Adjuvants	Modèle	Observations <sup>a</sup>	Référence
IgG venant d'un sérum d'un porc exposé à un mutant atténué (capsule)	1	-	Porc	Bonne protection homologue	Bossé et coll., 1992
Anticorps monoclonaux contre le LPS	1 ou 2	-	Souris	Bonne protection homologue	Saze et coll., 1994
Anticorps monoclonaux contre la capsule et le LPS (sérototype 2 seulement)	1, 2 ou 5	-	Souris	Bonne protection homologue	Oishi et coll., 1993
Antisérum de lapin contre hémolysine semi-purifiée	5	-	Souris	Bonne protection homologue	Inzana et coll., 1991
Anticorps monoclonaux contre ApxI, II, III et capsule	1, 2 et 5	-	Souris	Bonne protection homologue	Oishi et coll., 1995

<sup>a</sup>Bonne protection: > 50% de survivants; Protection partielle: < 50% de survivants.

Tableau III. Protection obtenue avec différents mutants d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

Antigènes	Sérotypes	Adjuvants	Modèle	Observations <sup>a</sup>	Référence
Mutant sensible à la température	1	-	Souris	Protection homologue partielle	Byrd et Hooke, 1997a; 1997b
Mutant sensible à la température	1	-	Souris et porc	Bonne protections homologue et hétérologue (sérotypage 5) et présence de lésions	Inzana et coll., 1993b
Mutant hémolysine (Apx I)	5	-	Souris et porc	Aucune protection	Inzana et coll., 1991
Mutant capsule	1 et 5	Mucine 7%, microagarose, adjuvant incomplet de Freund	Porc	Bonne protection homologue et hétérologue mais présence de lésions	Inzana et coll., 1993a

<sup>a</sup>Bonne protection: > 50% de survivants; Protection partielle: < 50% de survivants.

## 5. Réponse immune du porc

La réponse immune du porc dirigée contre *A. pleuropneumoniae* n'est pas très bien comprise. Cependant, différents groupes de chercheurs ont étudié cette réponse immunitaire. Des anticorps dirigés contre les hémolysines (Devenish et coll., 1990), les lipopolysaccharides (Fenwick et Henry, 1994), les polysaccharides capsulaires (Fenwick et Henry, 1994) et certaines protéines de la membrane externe (Deneer et Potter, 1989a; Rapp et Ross, 1986) semblent être associés à une protection partielle. Etant donné que les bactérines offrent seulement une protection partielle tandis que les animaux survivants à une infection naturelle semblent être protégés complètement, Furesz et coll. (1997) ont comparé les réponses humorale et cellulaire du porc suite à une infection ou une immunisation avec une souche d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Cette étude démontre que les porcs infectés par la bactérie vivante (par voie intranasale) produisent un haut taux d'anticorps (IgG) dirigés contre les hémolysines et les LPS tandis qu'aucun anticorps n'est dirigé contre les polysaccharides capsulaires. Les porcs immunisés avec une bactérine produisent peu d'anticorps dirigés contre ces mêmes facteurs de virulence. De plus, ils ont aussi observé une différence dans la réponse à médiation cellulaire. Celle-ci a été mesurée par la technique d'hypersensibilité de type retardé. Les résultats obtenus démontrent également une forte différence entre les porcs infectés avec la bactérie vivante et ceux immunisés avec une bactérine. Ainsi, ils ont démontré qu'il y avait une différence significative entre la réponse à médiation cellulaire dirigée contre les hémolysines observée chez les deux groupes; une réponse plus importante ayant été détectée chez les animaux infectés avec la bactérie vivante. Une réponse cellulaire dirigée contre les LPS et les polysaccharides capsulaires a été également observée chez les porcs infectés avec la bactérie vivante. Finalement, aucune réponse cellulaire n'a été observée contre les protéines de la membrane externe.



De plus, ces différentes observations sont associées à la protection car 100% des porcs du groupe immunisé avec la bactérine ont été tués tandis que les porcs du groupe infecté par la bactérie vivante ont survécu à l'infection.

Une autre étude a démontré que la réponse immune dirigée contre *A. pleuropneumoniae* produisait des anticorps de type IgA. Ainsi, Bossé et coll. (1992) ont démontré qu'il y avait une production d'IgA dirigé contre les hémolysines, les polysaccharides capsulaires et les LPS dans les poumons de porcs ayant été infectés par voie intranasale avec *A. pleuropneumoniae*. Comme mentionné auparavant, Fenwick et Osburn (1986) ont établi également qu'il y avait une forte réponse immunitaire contre les LPS suivant une infection, mais que celle-ci n'était pas importante après une immunisation à l'aide d'une bactérine.

La différence de la réponse immune naturellement acquise suite à l'infection et celle observée après vaccination peut s'expliquer de différentes façons: (1) la préparation de bactéries mortes (bactérine) ne contient pas ou très peu d'hémolysines (Furesz et coll., 1997); (2) même si la bactérine contient des LPS et des polysaccharides capsulaires, l'action de la formaldéhyde peut dénaturer ces antigènes, ce qui signifie que les anticorps produits ne reconnaissent pas les antigènes natifs (Furesz et coll., 1997); (3) les particules obtenues par la voie d'aérosol peuvent pénétrer dans l'espace alvéolaire, ce qui permet aux antigènes d'être en contact avec les vaisseaux sanguins et lymphatiques, ce qui induit une meilleure réponse locale et systémique (Furesz et coll., 1997).

Les études citées auparavant concernent l'immunité spécifique, c'est-à-dire l'immunité cellulaire et l'immunité humorale. Cependant, l'immunité non

spécifique protège également le porc contre les micro-organismes. Les macrophages du tissu pulmonaire ont une importance capitale dans les mécanismes de défense. Ainsi, la phagocytose par les macrophages joue un rôle primordial vis-à-vis des germes capsulés tels que *A. pleuropneumoniae* (Inzana et coll., 1988). Le système du complément exerce une activité bactéricide prononcée sur les bactéries Gram-négatif. Toutefois, *A. pleuropneumoniae* résiste à cet effet bactéricide du système du complément du porc, ce qui expliquerait en partie le pouvoir pathogène de cette bactérie (Inzana et coll., 1988). Les granulocytes neutrophiles peuvent aussi protéger les porcs contre une infection bactérienne. Les granulocytes neutrophiles sont des cellules phagocytaires mais contrairement aux macrophages ils ne sont pas capables d'une phagocytose répétée et ils meurent rapidement en libérant leurs enzymes hydrolytiques ce qui concourt à entretenir le processus inflammatoire. Cependant, ils peuvent être affectés par des toxines, ainsi *A. pleuropneumoniae* élabore une cytotoxine qui détruit les granulocytes et favorise la multiplication du germe (Rosendal et coll., 1988). Finalement, d'autres systèmes non spécifiques de défense existent chez le porc, c'est-à-dire l'appareil muco-ciliaire, les interférons, le lysozyme et les cellules NK. Ces systèmes sont efficaces contre les bactéries Gram-négatif dont *A. pleuropneumoniae*.

## **6. Mutants d'*Actinobacillus pleuropneumoniae***

Plusieurs facteurs de virulence ont été incriminés dans la pathogénie de l'infection à *A. pleuropneumoniae*. Même si quelques évidences incriminent certains facteurs de virulence, leur rôle exact reste à déterminer. Le système de mutagenèse par transposition décrit par Tascón et coll. (1993), ceux de mutagenèse dirigée développés par Mulks et Buysse (1995) et par Jansen et coll. (1995) devraient permettre éventuellement de bien comprendre le rôle des différents facteurs de virulence. A ce jour, différents mutants d'*A.*

*pleuropneumoniae* ont été obtenus par mutagénèse chimique, mutagénèse spontanée, mutagénèse dirigée et par transposition.

### 6.1 Mutants de la capsule

Des mutants de la capsule d'*A. pleuropneumoniae* des sérotypes 1 et 5, obtenus après plusieurs passages sur milieux de culture, étaient beaucoup moins virulents que la souche mère (Inzana et coll., 1988; Rosendal et MacInnes, 1990). En plus, un mutant d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5 obtenu par un traitement avec l'éthyl méthanesulfonate était aussi beaucoup moins virulent que la souche mère (Inzana et coll., 1993a). Ceci suggère le rôle important de la capsule dans la pathogénie d'*A. pleuropneumoniae*.

### 6.2 Mutants des toxines RTX

Un mutant d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5 obtenu suite à un traitement chimique à la nitrosoguanidine ne synthétisant plus la toxine ApxI et ne sécrétant plus la toxine ApxII était avirulent chez le porc et la souris (Inzana et coll., 1991; Reimer et coll., 1995). Cullen et Rycroft (1994) ont démontré grâce à un mutant chimique d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 2 muté au niveau des toxines ApxII et ApxIII que celui-ci pouvait être phagocyté tandis que la souche mère causait immédiatement la mort des macrophages alvéolaires. Tascón et coll. (1994) ont démontré clairement que les toxines ApxI et ApxII étaient des facteurs de virulence majeurs chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Ils ont obtenu un mutant non-hémolytique en utilisant un système de mutagénèse par transposition. Chez ce mutant, le gène *apxIB* était désactivé et, par conséquent, les toxines ApxI et ApxII n'étaient pas sécrétées. Ce mutant était avirulent chez le porc tandis qu'un autre mutant produisant seulement l'ApxII (muté dans le gène *apxIA*) était légèrement virulent chez le porc et

causait des lésions pulmonaires. En plus, des mutants d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 mutés au niveau des toxines ApxI et/ou ApxII ont été obtenus par la méthode de mutagenèse dirigée (Jansen et coll., 1995). Les mutants ApxI<sup>-</sup> ApxII<sup>+</sup> et ApxI<sup>+</sup> ApxII<sup>-</sup> provoquent la mort des neutrophiles tandis que le mutant ApxI<sup>-</sup> ApxII<sup>-</sup> ne provoquent pas leur mort. Ceci confirme le rôle important des toxines Apx dans la pathogénie d'*A. pleuropneumoniae*.

### 6.3 Mutants sensibles à la température

Des mutants sensibles à la température produit par traitement à l'éthyl méthanesulfonate et un enrichissement à la pénicilline ont été obtenus chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (Inzana et coll., 1993b) tandis que Byrd et Hooke (1997b) ont aussi obtenu un mutant sensible à la température du sérotype 1 par un traitement à la nitrosoguanidine et un enrichissement avec la pénicilline et la D-cyclosérine. Ces mutants étaient beaucoup moins virulents chez le porc (mutant à l'éthyl méthanesulfonate) et chez la souris (mutant à la nitrosoguanidine). Ces mutants représenteraient donc de bons candidats pour un vaccin vivant contre la pleuropneumonie porcine.

### 6.4 Autres mutants d'*A. pleuropneumoniae*

Un mutant d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 muté au niveau de l'uréase a été obtenu par mutagenèse par transposition (Tascón et coll., 1997). Ce mutant était virulent chez le porc, confirmant que l'activité uréase n'est pas requise pour le développement de la pleuropneumonie porcine. Aussi, un mutant auxotrophe pour la riboflavine était moins virulent chez le porc, démontrant pour la première fois qu'une mutation au niveau de gènes impliqués dans la biosynthèse de la riboflavine conduit à l'atténuation d'*A. pleuropneumoniae* (Fuller et coll., 1996).

Comme nous pouvons le constater, aucune souche d'*A. pleuropneumoniae* mutée au niveau de la biosynthèse des LPS n'a été obtenue jusqu'à maintenant. De tels mutants permettraient de confirmer le rôle du LPS dans l'adhérence et la virulence d'*A. pleuropneumoniae*.

### **III. MATERIEL, METHODES ET RESULTATS**

## Article 1

Evaluation of protective efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
serotype 1 lipopolysaccharide-protein conjugate in mice

**Stéphane Rioux**, Daniel Dubreuil, Caroline Bégin, Craig Laferrière,  
Denis Martin et Mario Jacques

Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. **20**:63-74, 1997.

Ce premier article représente les essais d'immunoprotection effectués chez la souris. Ces résultats ont permis d'atteindre le premier objectif de mon projet de doctorat, c'est-à-dire évaluer le rôle protecteur de différentes préparations vaccinales contenant du LPS.



Pergamon

Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. Vol. 20, No. 1, pp. 63–74, 1997

Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd

Printed in Great Britain. All rights reserved

0147-9571/97 \$17.00 + 0.00

PII: S0147-9571(96)00022-7

## EVALUATION OF PROTECTIVE EFFICACY OF AN *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* SEROTYPE 1 LIPOPOLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE IN MICE

STÉPHANE RIOUX,<sup>1</sup> DANIEL DUBREUIL,<sup>1</sup> CAROLINE BÉGIN,<sup>1</sup> CRAIG  
LAFERRIÈRE,<sup>2,3</sup> DENIS MARTIN<sup>2\*</sup> and MARIO JACQUES<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6, <sup>2</sup>National Laboratory for Immunology, Laboratory Centre for Disease Control, Tunney's Pasture, Ottawa, Ontario, Canada K1A 0L2, <sup>3</sup>Present address: Institute of Biological Sciences, National Research Council, 100 Sussex Drive, Ottawa, Ontario, Canada K1A 0R6

(Received for publication 16 July 1996)

**Abstract**—*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia. The major adhesin of *A. pleuropneumoniae* has previously been identified as a lipopolysaccharide (LPS), and more recently, we demonstrated that high molecular mass LPS were involved in *A. pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. We postulated that immunization with a LPS-based vaccine may confer a protective immunity. The high molecular mass O-polysaccharides obtained after acid hydrolysis and chromatographic separation were conjugated to bovine serum albumin (BSA) as a protein carrier. Groups of mice were injected twice with the following antigen preparations: whole-cell preparation, outer membrane preparation, O-polysaccharide-BSA conjugate, hydrolyzed LPS and phenol/water extracted LPS. A combination of different adjuvants was also used during these immunization procedures to induce a stronger immunological response to the polysaccharide antigen. Two weeks after the second injection, the mice were challenged intranasally with either homologous *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain or a serotype 5 strain. The highest survival rate, up to 80%, compared to the control groups ( $P < 0.05$ ), was recorded when the mice were injected twice with 15 µg of carbohydrates of O-polysaccharide-BSA conjugate mixed with the saponin-derived adjuvant Quil A. Survival rates of between 60 and 70%, twice those observed in the control groups immunized with PBS, were recorded in mice injected with the O-polysaccharide-BSA conjugate mixed with other adjuvant preparations such as alhydrogel, peanut oil and Freund's incomplete adjuvant. However, the protection induced by the conjugate antigen preparation was serotype specific, because mice challenged with a serotype 5 strain were killed. Taken together, these results confirm the important role of *A. pleuropneumoniae* LPS in pathogenesis. © 1996 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

**Key words:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, lipopolysaccharides, vaccine.

**Résumé**—*Actinobacillus pleuropneumoniae* est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine. Nous avons démontré que l'adhésine majeure d'*A. pleuropneumoniae* est son lipopolysaccharide (LPS) et, plus récemment, que les LPS de haut poids moléculaire étaient impliqués dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcin. Nous postulons donc comme hypothèse que l'immunisation avec le LPS pourrait induire une immunité protectrice. Les fractions de haut poids moléculaire, obtenues après hydrolyse acide et chromatographie, ont été conjuguées à l'albumine bovine sérique (ABS). Par la suite, des groupes de souris ont été immunisés deux fois avec les préparations suivantes: préparation de bactéries entières, préparation de membranes externes, conjugué O-polysaccharide-ABS, LPS hydrolysé ou LPS extrait au phénol. Une

\*Present address: Unité de Vaccinologie, Laboratoire et Service d'Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Ste Foy, Québec, Canada G1V 4M3

†Author for correspondence. Tel.: (514) 773-8521 ext. 8348; Fax: (514) 778-8108.



combinaison d'adjuvants différents a été utilisée durant le protocole d'immunisation afin d'induire une meilleure réponse immunologique aux antigènes polysaccharidiques. Deux semaines après la deuxième immunisation, les souris ont été infectées par voie intranasale avec une souche d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ou sérotype 5. Le plus haut taux de survivants (80%), comparé au groupe contrôle ( $P < 0.05$ ), a été observé lorsque les souris étaient immunisées avec le conjugué O-polysaccharide-ABS (15 µg de sucres) mélangé avec le Quil A. Un taux de survivant situé entre 60 et 70%, soit deux fois celui observé avec le groupe contrôle, a été observé lorsque le conjugué O-polysaccharide-ABS était mélangé avec l'hydrogel, l'huile d'arachide ou l'adjuvant incomplet de Freund. Cependant, la protection induite par le conjugué était spécifique de sérotype puisque les souris infectées avec la souche de sérotype 5 ont été tuées. Nos résultats confirment toutefois le rôle important des LPS d'*A. pleuropneumoniae* dans la pathogénie. © 1996 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

*Mots-clefs:* *Actinobacillus pleuropneumoniae*, lipopolysaccharides, vaccin.

## INTRODUCTION

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia [1], a worldwide disease causing tremendous economic loss to the swine industry. Twelve serotypes of *A. pleuropneumoniae* have been recognized based on capsular antigens [2]. In Québec, serotype 1 is the most predominant followed by serotype 5 [3]. The pathogenesis of porcine pleuropneumonia is not well understood but several cytotoxic and haemolytic activities have been described [4–7]. We have shown that lipopolysaccharides (LPS) are the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to porcine respiratory tract cells and mucus [8–10]. More recently, we demonstrated that high molecular mass LPS, with the longest O chains, were involved in *A. pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells [11]. In addition, *A. pleuropneumoniae* LPS have been shown to bind pig haemoglobin [12].

Vaccines containing chemically inactivated bacterial cells of *A. pleuropneumoniae* are currently used to control and to prevent the disease. Many investigators have previously reported the protective effect of capsular antigen, outer membrane proteins, and RTX toxins of *A. pleuropneumoniae* [13–18]. However, all these antigen preparations did not prevent the subclinical or pathological manifestations of the disease, and induce only a protective response restricted to the serotype. In contrast, optimal protection of pigs against infection by homologous and heterologous serotypes seemed to occur following natural infection with *A. pleuropneumoniae* [19]. A previous study established that a significant immune response to LPS occurred as a result of *A. pleuropneumoniae* infection but was not important after immunization with whole-cell preparation [20]. Bossé *et al.* [21] noticed that levels of LPS-specific IgG and IgA in pulmonary secretions rose after aerosol challenge with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain CM5. The antibodies against LPS produced during natural infections can be used for serodiagnosis of porcine pleuropneumonia [22–25]. The purpose of the present study was to evaluate the protection of animals against *A. pleuropneumoniae* following immunization with its high molecular mass lipopolysaccharidic adhesin when conjugated to a protein carrier.

## MATERIALS AND METHODS

### *Bacterial isolates and growth conditions*

*A. pleuropneumoniae* serotype 1 (FMV87–682) and serotype 5 (2245) isolates were obtained from the clinical diagnostic laboratory, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St Hyacinthe, Québec, Canada. Bacteria were grown on BHI

(Difco Laboratories, Detroit, MI) agar plates supplemented with 15 µg/ml nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD). Plates were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 18–24 h.

#### *Extraction and isolation of lipopolysaccharides*

A modification of the phenol/water extraction procedure described by Westphal *et al.* [26] was used for the isolation of the LPS. After phenol extraction, the aqueous phases were pooled, adjusted to 0.5 M NaCl, and three volumes of cold acetone were added in order to precipitate the LPS. The solution was kept overnight at –20°C, and centrifuged at 8000 *g* for 20 min. The supernatant was discarded, and the opaque pellet was resuspended in distilled water. After extensive dialysis against distilled water, the solution was digested with RNase (0.1 mg/ml), DNase (0.1 mg/ml), and proteinase K (2 U/ml). Finally, the solution was lyophilized, and stored at –20°C.

#### *LPS hydrolysis and polysaccharides fractionation*

LPS (10 mg dry weight) was hydrolysed at 100°C for 2 h in 1 ml of 1% (vol/vol) acetic acid previously saturated with nitrogen. After neutralization with 5 N NaOH, the insoluble lipid A fraction was removed from the soluble polysaccharide fractions by centrifugation (12 000 *g* for 10 min) [27]. Finally, the polysaccharides were lyophilized, and stored at –20°C. The polysaccharides were then fractionated according to the procedure described by Altman *et al.* [28]. Briefly, 50 mg of hydrolysed LPS were resuspended in 4 ml of 0.05 M pyridinium acetate (pH 4.7) and subjected to gel filtration chromatography on a column (2 × 100 cm) of Sephadex G-25. Fractions of eluate (5 ml each) were collected automatically and analysed colorimetrically for neutral sugars [29]. The high molecular

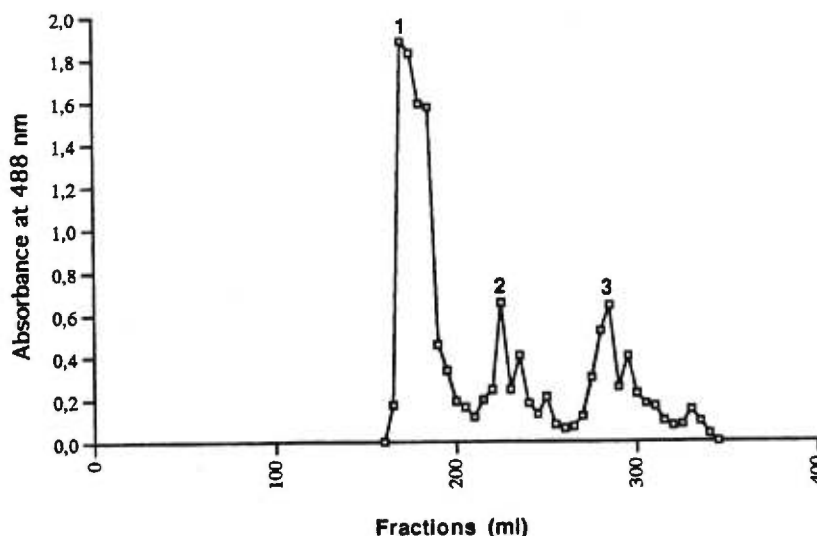


Fig. 1. Fractionation of hydrolysed LPS of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 on a Sephadex G-25 column in the presence of pyridinium acetate. Fractions (in milliliters) were analysed for neutral sugars and grouped into three peaks (1–3). High molecular mass fractions (peak 1) were used for the preparation of the O-polysaccharide-BSA conjugate.

mass fractions (peak no. 1 in Fig. 1) were used for the preparation of a O-polysaccharide-protein conjugate.

#### *Preparation of O-polysaccharide-protein conjugate by reductive amination*

For production of bovine serum albumin (BSA) conjugate, 8 mg of O-polysaccharides were dissolved in 1 ml of 0.2 M borate buffer (pH 9.1) and mixed with 2.6 mg BSA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). The solution was incubated at 37°C for 1 h, then 1.5 mg NaCNBH<sub>3</sub> were added to initiate the coupling reaction. The mixture was kept at 37°C for 7 days. On day 3, an additional 1.5 mg of NaCNBH<sub>3</sub> were added. After 7 days, the solution was loaded on a Superose 6 column (Pharmacia Baie D'urfee, Quebec, Canada), eluted with phosphate-buffered saline (PBS; 0.01 M containing 150 mM NaCl, pH 7.4), and monitored at 280 nm. The fractions containing both proteins and sugars were dialysed against distilled water and lyophilized.

#### *Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)*

For the confirmation of the chemical coupling between *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-polysaccharides and BSA, samples were suspended in solubilization buffer containing 10% (vol/vol) glycerol, 5% (vol/vol)  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% (wt/vol) sodium dodecylsulfate (SDS), 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), and 0.025% (vol/vol) bromophenol blue and heated for 15 min at 100°C. Samples were separated on SDS-PAGE gels by using a stacking gel of 4.5% (wt/vol) polyacrylamide and a separating gel of 10% (wt/vol) polyacrylamide [30]. Samples were electrophoresed at 100 V (stacking gel) and 200 V (separating gel) using a Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Gels were either stained with Coomassie brilliant blue R-250 or transferred to nitrocellulose.

#### *Immunoblotting*

Immunoblots were carried out as described by Towbin *et al.* [31]. The samples separated by electrophoresis were transferred using a Milliblot graphite electroblotter I (Millipore Corporation, Bedford, MA) to a nitrocellulose membrane (0.2  $\mu$ m; Bio-Rad) for 15 min at 220 mA. The membranes were first incubated for 1 h with a blocking solution consisting of 2% (wt/vol) skim milk in Tris-saline buffer (TSB; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4), followed by an incubation of 2 h with monoclonal antibodies against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen (5.1 G8F10; kindly supplied by Eva I. Stenbaek, Department of Biochemistry and Immunology, National Veterinary Laboratory, Copenhagen V, Denmark). The membranes were then washed in TSB, and incubated for 1 h with a goat anti-mouse IgG (H + L) horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad). The reaction was revealed by the addition of 4-chloro-1-naphthol and hydrogen peroxide (Sigma) following the method described by Hawkes [32].

#### *Outer membrane preparation*

Extraction of outer membrane from the bacteria was performed as described by Hamel *et al.* [33]. Briefly, whole cells were suspended in lithium chloride buffer (200 mM lithium chloride, 100 mM lithium acetate, pH 6.0), and shaken with 5 mm glass beads at 300 rpm for 2 h at 45°C. The solution was then centrifuged at 15 000 *g* for 20 min and the supernatant was collected and centrifuged at 70 000 *g* for 2 h. The pellet was suspended in PBS and the protein content was determined by a modified Lowry method [34].

#### *Whole-cell preparation*

For the preparation of whole-cell antigens, the bacterial growth from culture plates was washed off and suspended in PBS. The optical density (OD) was adjusted to 1.0 at 540 nm, and 0.3% (vol/vol) formaldehyde was added. The suspension was incubated at room temperature for 24 h and then kept at 4°C.

#### *Adjuvants*

Seven adjuvants were used in the present study: Freund's incomplete adjuvant (FIA; Difco Laboratories, Detroit, MI), water-in-oil (W/O), Quil A (Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada), Alhydrogel (Al(OH)<sub>3</sub>; Cedarlane), peanut oil, RIBI (MPL + TDM adjuvant system (Sigma)), and TiterMax (Vaxcel Inc., Norcross, GA). FIA was emulsified with an equal volume of antigen in solution using a vortex. The W/O emulsion [35] consisted of three components: a mineral oil (light white oil; Sigma) and two emulsifiers, Span 85 and Tween 85 (Sigma). The emulsion was prepared by mixing the mineral oil, Span 85, Tween 85, and antigen in an 18:1:1:20 ratio and emulsified using a vortex. Quil A (25 µg) was mixed with antigen in PBS (100 µl). Al(OH)<sub>3</sub> (25 µl) was mixed with antigen in PBS (75 µl). Peanut oil was emulsified in the same way as FIA. RIBI adjuvant was prepared according to the manufacturer's instructions by reconstituting a final volume of 2 ml with antigen/solution mixture. TiterMax was prepared according to the manufacturer's instructions.

#### *Immunoprotection studies*

Groups of five CD1 mice (Charles River Inc., St-Constant, Quebec, Canada), 6–7 weeks of age, were immunized with a total volume of 40–200 µl of PBS containing either 7.5 or 15 µg of carbohydrate of LPS, hydrolysed LPS, or O-polysaccharide-BSA conjugate as estimated by the method of Dubois [29] or with the outer membrane (10 µg of proteins) or the whole-cell preparations. Antigen preparations were injected with or without adjuvant. Depending on the adjuvant, various injection routes were used. TiterMax was injected according to the manufacturer's protocol. Briefly, 40 µl of antigen/TiterMax was injected subcutaneously (s.c.) at the base of the tail. RIBI was injected s.c. in two sites, 100 µl at each site. All other adjuvants were injected s.c. at the base of the neck in 100 µl volumes. A booster injection with antigen in adjuvant was administered 3 weeks after the first injection except for the TiterMax adjuvant where the animals were boosted with antigen in saline. Controls animals received sterile PBS with or without adjuvant. Mice were challenged 2 weeks after the last injection with a total of 50 µl of a 6-h-old culture (on PPLO (Difco) agar plates supplemented with 10% yeast extract and 5% horse serum) containing approximately 10<sup>8</sup> cfu of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (FMV87–682) or approximately 4 × 10<sup>8</sup> cfu of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 (2245) by the intranasal route. Intranasal inoculations were performed according to the method described by Rushton [36]. Mice were monitored for 1 week after the challenge. Serum samples were obtained from the mice at days 0, 21 and 35 before the bacterial challenge. Statistical analysis was carried out by the exact method of Fisher as described by St-Pierre *et al.* [37]. The survival rate obtained for each group of mice was compared to the control groups immunized with PBS.

*Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

ELISA was used to determine serum antibody titres against LPS (0.1  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ) in 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6), sonicated for 5 min, which was coated onto the wells of a Linbro EIA microtitration plates (Flow Laboratories Inc., Virginia, U.S.A.), and incubated overnight at 4°C. The plates were washed three times with PBS-Tween 20 (0.05% (v/v); pH 7.4). Sera were diluted in PBS-Tween 20, a volume of 50  $\mu\text{l}$  was added to the wells, and incubated for 1 h at 37°C. After incubation, the plates were washed as described, and 50  $\mu\text{l}$  of goat anti-mouse IgG + IgM conjugated to horseradish peroxidase (Bio/Can Scientific, Mississauga, Ontario, Canada) diluted 1:1000 in PBS-Tween 20 was added to each well. After 1 h of incubation at 37°C, plates were washed and 100  $\mu\text{l}$  of the chromogenic solution was added to each well. The solution contained 0.4 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; Sigma) dissolved in 50 mM citrate buffer (pH 4.0) with 0.5 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The OD was measured at 410 nm using an automated plate reader (Dynatech Laboratories Inc., Virginia, U.S.A.) when six target sera reached a value equal to 1.0. OD values were corrected by subtracting the value of controls consisting of normal serum on the same plate. A serum was arbitrarily declared negative if the corrected OD was less than 0.2.

## RESULTS

Previous work in our laboratory identified LPS as the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to porcine upper respiratory tract cells and mucus. The aim of the present study was to evaluate the protection of animals against *A. pleuropneumoniae* following immunization with its high molecular mass lipopolysaccharidic adhesins.

LPS from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 were first hydrolysed using acetic acid to remove the lipid A fraction. After gel filtration of the water-soluble polysaccharides on a Sephadex G-25 column, we recovered high molecular mass O-polysaccharides (Fig. 1, peak 1), core oligosaccharides (peak 2), and low molecular mass products (peak 3) as previously reported by Altman *et al.* [28]. The high molecular mass O-polysaccharides were used for the preparation of O-polysaccharide-protein conjugate by reductive amination. The coupling was then confirmed by immunoblotting (Fig. 2). A monoclonal antibody directed against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen reacted with LPS (lane 4) as well as with the O-polysaccharide-BSA conjugate (lane 2), whereas hydrolysed LPS (lane 3) were not detected because they do not migrate in an electrical field. Uncoupled BSA observed on SDS-PAGE after Coomassie blue staining (data not shown), was not detected by the monoclonal antibody (lane 1). Therefore, the detection of the O-polysaccharide-BSA conjugate by immunoblotting confirmed the chemical coupling.

An examination of Table 1 reveals that the level of serum antibodies against *A. pleuropneumoniae* LPS, as determined by ELISA, was not a good indicator of protection in the experimental mouse model used. The level of serum antibodies against BSA, as determined by ELISA, was increased in all animals immunized with the O-polysaccharide-BSA conjugate (data not shown).

To evaluate the protection obtained after active immunization, the mice were challenged intranasally with either *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (FMV87-682) 2 weeks after the second injection, whereas for the heterologous protection studies mice were challenged with *A. pleuropneumoniae* serotype 5 (2245) (Table 1). After challenge with the serotype

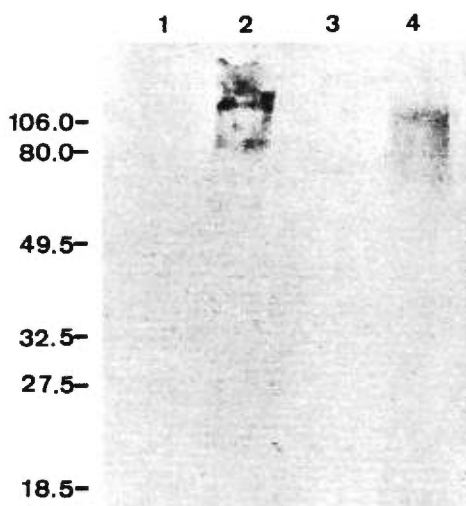


Fig. 2. Immunoblot showing the coupling between *A. pleuropneumoniae* serotype 1 high molecular mass O-polysaccharides and bovine serum albumin (BSA). The immunoblot was probed with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. Lane 1, BSA; lane 2, O-polysaccharide-BSA conjugate; lane 3, hydrolysed lipopolysaccharides; lane 4, extracted lipopolysaccharides. Molecular mass markers (in kDa) are indicated on the left.

1 strain, a survival rate of 20–30% was recorded for the control group receiving PBS. When LPS, hydrolysed LPS, or O-polysaccharide-BSA conjugate without adjuvant (7.5 or 15  $\mu\text{g}$  of carbohydrates) were used as the vaccine preparation, the percentage of survivors was 10–25%. Mice immunized with the water-soluble polysaccharides (15  $\mu\text{g}$  of carbohydrates) obtained following hydrolysis of LPS mixed with Quil A, 7.5  $\mu\text{g}$  of carbohydrates of O-polysaccharide-BSA conjugate mixed with Quil A or  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , or O-polysaccharide-BSA conjugate (15  $\mu\text{g}$  of carbohydrates) mixed with W/O emulsion, TiterMax or RIBI were not protected, and only 0–50% survivors were observed. However, following immunization with LPS (15  $\mu\text{g}$  of carbohydrates) mixed with Quil A, or O-polysaccharide-BSA conjugate (15  $\mu\text{g}$  of carbohydrates) mixed with  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , peanut oil or FIA the percentage of survivors increased to 60–67%. Immunization with O-polysaccharide-BSA (15  $\mu\text{g}$  of carbohydrates) mixed with Quil A induced a significant protection (80%;  $P < 0.05$ ). Finally, mice immunized with either whole-cell preparation mixed with  $\text{Al}(\text{OH})_3$  or an outer membrane preparation mixed with Quil A containing LPS as well as outer membrane proteins were protected (80% survivors) against a challenge with the homologous bacterial strain. Interestingly, a similar level of homologous protection was obtained when mice were immunized with the O-polysaccharide-protein conjugate or with a mixture of antigens found in the whole-cell and the outer membrane preparations.

After challenge with the serotype 5 strain, a survival rate of 33% was recorded for the control group receiving PBS. Immunization with the different vaccine preparations did not protect mice against a heterologous challenge with *A. pleuropneumoniae* serotype 5.

Table 1. Protection of mice immunized with different *A. pleuropneumoniae* serotype 1 vaccine preparations and challenged with a serotype 1 strain or a serotype 5 strain

Vaccine preparation	Adjuvant*	ELISA titre (log <sub>10</sub> )†	Serotype 1 strain		Serotype 5 strain	
			No. of surviving mice‡	% Survivors	No. of surviving mice‡	% Survivors
Control (PBS)	-	< 2.0	3/10	30	5/15	33
Control (PBS)	Quil A	ND	1/5	20	ND	ND
LPS (15)§	-	2.0	1/5	20	4/10	40
LPS (15)	Quil A	3.0 ± 0.71	3/5	60	1/5	20
Hydrolyzed LPS (15)	-	< 2.0	1/10	10	4/10	40
Hydrolyzed LPS (15)	Quil A	< 2.0	1/5	20	4/10	40
O-polysaccharide-BSA (7.5)	-	< 2.0	1/4	25	ND	ND
O-polysaccharide-BSA (15)	-	< 2.0	3/15	20	5/15	33
O-polysaccharide-BSA (15)	Quil A	2.0	2/5	40	ND	ND
O-polysaccharide-BSA (15)	Quil A	< 2.0	8/10	80¶	3/10	30
O-polysaccharide-BSA (15)	Al(OH) <sub>3</sub>	< 2.0	1/4	25	ND	ND
O-polysaccharide-BSA (15)	Al(OH) <sub>3</sub>	< 2.0	6/10	60	2/5	40
O-polysaccharide-BSA (15)	Peanut oil	< 2.0	6/10	60	2/5	40
O-polysaccharide-BSA (15)	FIA	< 2.0	6/9	67	1/5	20
O-polysaccharide-BSA (15)	W/O emulsion	< 2.0	3/10	30	1/5	20
O-polysaccharide-BSA (15)	TiterMax	ND	2/4	50	ND	ND
O-polysaccharide-BSA (15)	R1B1	ND	0/4	0	ND	ND
Outer membrane preparation	Quil A	2.6 ± 0.70	4/5	80	1/5	20
Whole-cell preparation	Quil A	2.4 ± 0.52	6/10	60	2/5	40
Whole-cell preparation	Al(OH) <sub>3</sub>	2.3 ± 0.48	8/10	80¶	1/4	25

\*FIA, Freund's incomplete adjuvant.

†Mean ± standard deviation; ND, not determined.

‡The total numbers of mice reported are the sum of animals tested in one or more separate experiments.

§Numbers correspond to the amount of carbohydrates (in µg).

¶P &lt; 0.05.



## DISCUSSION

Vaccination of animals with whole-cell preparations has been shown to produce little or no antibody response to the LPS of *A. pleuropneumoniae*, whereas animals convalescing from disease were found to have high antibody levels to these molecules [20]. Studies demonstrated that protection of swine was improved by vaccination with proteinase K-treated outer membrane of *A. pleuropneumoniae* and that immunization with core lipopolysaccharide of *Escherichia coli* J5 also provided protection against *A. pleuropneumoniae* infection [38, 39]. These findings, taken together, suggested that the partial and serotype-specific protective efficacy of bacterins might be due to the absence of high antibody titres against LPS which, as we previously demonstrated, are involved in the adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells and to mucus [8–10], an initial step in bacterial colonization. The purpose of the present study was to evaluate the protection of animals against *A. pleuropneumoniae* following immunization with its high molecular mass lipopolysaccharidic adhesin when conjugated to a protein carrier. The rationale for this approach is that, theoretically, LPS-specific antibodies would not only affect *A. pleuropneumoniae* adherence and colonization, but would also inhibit LPS-mediated release of mediators from immunocompetent cells and traffic soluble LPS as well as intact bacteria for clearance and detoxification.

This study was carried out in mice, an economical animal model, that has been used for *A. pleuropneumoniae* virulence testing and protective studies by others [40–44]. As observed in Table 1, the level of serum antibodies against *A. pleuropneumoniae* LPS, determined by ELISA, was not a good indicator of protection in the experimental mouse model used. Interestingly, other authors had observed that high antibody titres to *A. pleuropneumoniae* cells did not correlate well with protection from disease in pigs [15, 45–47].

Mice immunized with LPS mixed with Quil A were protected (60% survivors); nevertheless, LPS of *A. pleuropneumoniae*, like LPS of most Gram-negative bacteria, is a toxic molecule [20, 48, 49]. However, LPS can be rendered non-toxic by its hydrolysis and fractionation of polysaccharides and lipid A. When LPS from *A. pleuropneumoniae* were hydrolysed, the water-soluble polysaccharides (15 µg of carbohydrates) mixed with Quil A failed to protect mice.

To increase the immune response to the polysaccharides, high molecular mass O-polysaccharides were chemically coupled to a large immunogenic protein (BSA). Because bacterial polysaccharides are T-cell independent antigens [50], we anticipated that coupling between high molecular mass O-polysaccharides and BSA would produce a T-cell dependent polysaccharide–protein conjugate response which could lead to anti-polysaccharide antibody production, as well as a cellular immune response. The conjugates were used in conjunction with different types of adjuvant including Freund's incomplete adjuvant, aluminium hydroxide gel (alhydrogel), peanut oil, W/O emulsion (mineral oil/Span 85/Tween 85), monophosphoryl lipid A (RIBI), saponin (Quil A), and non-ionic block copolymers (TiterMax) [51].

Our results showed that a good protection against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was obtained by immunization with O-polysaccharide–BSA conjugate mixed with saponin-derived Quil A. One possible mechanism of protection can result from interference with the initial event in bacterial colonization (i.e. adherence to mucosal surfaces) by antibodies against the lipopolysaccharidic adhesins before the different toxins produced by this



microorganism could affect the lungs. Another possibility is the induction of a cellular immune response in the respiratory tract.

In summary, our results indicated that a similar level of protection was obtained when mice were immunized with a single class of molecules (O-polysaccharides) compared to a mixture of antigens found in the whole-cell bacterin preparation. Our results confirm the important role of *A. pleuropneumoniae* LPS in pathogenesis. Further studies will be needed to evaluate the protective efficacy of a polyvalent serotype 1 and 5 O-polysaccharides-BSA conjugate.

*Acknowledgements*—This work was supported by grants from a research partnership programme involving the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Agriculture Canada, and Fédération des Producteurs de Porcs du Québec. S. R. is the recipient of a studentship from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

#### REFERENCES

- Nicolet J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: *Disease of Swine*, 7th edn, Leman A. D., Straw B. E., Mengeling W. L., D'Allaire S. and Taylor D. J. (eds), pp. 401–408. Iowa State University Press, Ames, U.S.A. (1992).
- Nielsen R. (1986) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet. Scand.* **27**, 453–455.
- Mittal K. R. (1992) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* **32**, 135–148.
- Frey J., Beck M., Stucki U. and Nicolet J. (1993) Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* **123**, 51–58.
- Frey J., Bosse J. T., Chang Y.-F., Mullen J. M., Fenwick B., Gerlach G. F., Gygi D., Haesebrouck F., Inzana T. J., Jansen R., Kamp E. M., Macdonald J., MacInnes J. I., Mittal K. R., Nicolet J., Rycroft A. N., Segers R. P. A. M., Smits M. A., Stenbaek E., Struck D. K., van den Bosch J. F., Wilson P. J. and Young R. (1993) *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytotoxins, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1723–1728.
- Frey J. and Nicolet J. (1990) Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 232–236.
- Kamp E. M., Popma J. K., Anakotta J. and Smits M. A. (1991) Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **59**, 3079–3085.
- 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., Dubreuil D. and Jacques M. (1994) Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **62**, 868–873.
- Bélanger M., Rioux S., Foiry B. and Jacques M. (1992) Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**, 119–126.
- Paradis S.-E., Dubreuil D., Rioux S. and Jacques M. (1994) High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect. Immun.* **62**, 3311–3319.
- Bélanger M., Bégin C. and Jacques M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**, 656–662.
- Devenish J., Rosendal S. and Bossé J. T. (1990) Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **58**, 3829–3832.
- 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 (Om1A) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* **61**, 565–572.
- 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.
- Nielsen R. (1984) *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes-cross protection experiments. *Nord. Vet. Med.* **36**, 221–234.
- Rosendal S., Miniats O. P. and Sinclair P. (1986) Protective efficacy of capsule extracts of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs and mice. *Vet. Microbiol.* **12**, 229–240.

18. Rossi-Campo A., Anderson C., Gerlach G.-F., Klashinsky S., Potter A. A. and Willson P. J. (1992) Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine* **10**, 512-518.
19. Nielsen R. (1979) *Haemophilus parahaemolyticus* serotypes. Pathogenicity and cross-immunity. *Nord. Vet. Med.* **31**, 407-413.
20. Fenwick B. W. and Osburn B. I. (1986) Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect. Immun.* **54**, 575-582.
21. Bossé J. T., Johnson R. P., Nemeč M. and Rosendal S. (1992) Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* **60**, 479-484.
22. Gottschalk M., Altman E., Charland N., De Lasalle F. and Dubreuil J. D. (1994) Evaluation of a saline extract, capsular polysaccharides and long chain lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* **42**, 91-104.
23. Gottschalk M., De Lasalle F., Radacovici S. and Dubreuil J. D. (1994) Evaluation of long chain lipopolysaccharides (LC-LPS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* **38**, 315-327.
24. Radacovici S., Lallier R., Larivière S. and Dubreuil J. D. (1992) Biochemical characterization of an antigenic saline extract of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 and identification of a serotype-specific antigen for ELISA serodiagnosis. *Vet. Microbiol.* **30**, 369-385.
25. Radacovici S., Gottschalk M. and Dubreuil J. D. (1994) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotype 1): a readily obtainable antigen for ELISA serodiagnosis of pig pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* **39**, 219-230.
26. Westphal O., Lüderitz O., Eichenberger E. and Keiderling W. (1952) Über bakterielle Reizstoffe. I. Mitt: Reindarstellung eines Polysaccharid-Pyrogens aus *Bacterium coli*. *Z. Naturforsch. Teil B* **7**, 536-548.
27. Bada Alamedji R. and Dubreuil J. D. (1993) Comparaison de deux antigènes de nature polysaccharidique pour le diagnostic sérologique par ELISA de la pleuropneumonie porcine (sérotype 5). *J. Vet. Med. série B* **40**, 253-260.
28. Altman E., Brisson J. R. and Perry M. B. (1986) Structure of the O-chain of the lipopolysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochem. Cell. Biol.* **64**, 1317-1325.
29. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. and Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* **28**, 350-356.
30. Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* **227**, 680-685.
31. Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.
32. Hawkes R. (1982) Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecylsulfate-gel electrophoresis and protein blotting. *Analyt. Biochem.* **123**, 143-146.
33. Hamel J., Brodeur B. R., Larose Y., Tsang P. S., Belmaaza A. and Montplaisir S. (1987) A monoclonal antibody directed against a serotype-specific, outer-membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Med. Microbiol.* **23**, 163-170.
34. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L. and Tolbert N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analyt. Biochem.* **87**, 206-210.
35. Hall W., Molitor T. W., Joo H. S. and Pijoan C. (1989) Comparison of protective immunity and inflammatory responses of pigs following immunization with different *Actinobacillus pleuropneumoniae* preparations with and without adjuvants. *Vet. Immun. Immunopathol.* **22**, 175-186.
36. Rushton B. (1978) Induction of pneumonia in mice with *Pasteurella haemolytica*. *J. Comp. Pathol.* **88**, 477-480.
37. St-Pierre J., Cadieux M., Guérault A. and Quevillon M. (1976) Statistical tables to detect significance between frequencies in two small samples, with particular reference to biological assays. *Rev. Can. Biol.* **35**, 17-23.
38. Chiang Y.-W., Young T. F., Rapp-Gabrielson V. J. and Ross R. F. (1991) Improved protection of swine from pleuropneumonia by vaccination with proteinase K-treated outer membrane of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **27**, 49-62.
39. Fenwick B. W., Cullor J. S., Osburn B. I. and Olander H. J. (1986) Mechanism involved in protection provided by immunization against core lipopolysaccharides of *Escherichia coli* J5 from lethal *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in swine. *Infect. Immun.* **53**, 298-304.
40. Bathia B., Mittal K. R. and Frey J. (1991) Factors involved in immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Vet. Microbiol.* **29**, 147-158.
41. Komal J. P. S. and Mittal K. R. (1990) Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotype 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet. Microbiol.* **25**, 229-240.

42. Komal J. P. S. and Mittal K. R. (1990) Studies on the interactions of two different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, 25–34.
43. Oishi E., Ito H., Okabe T. and Terakado N. (1993) Passive protection of mice against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection by monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. Sci.* **55**, 711–715.
44. Sebunya T. N. K. and Saunders J. R. (1982) Studies on immunity of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in mice. *Am. J. Vet. Res.* **43**, 1793–1798.
45. Nielsen R. (1976) Pleuropneumonia in swine caused by *Haemophilus paraahaemolyticus*: studies on the protection obtained by vaccination. *Nord. Vet. Med.* **28**, 337–348.
46. Rapp V. J. and Ross R. F. (1988) Immunogenicity of outer membrane components of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* **29**, 585–587.
47. Stine D. L., Fedorka-Cray P. J., Huether M. J., Gentry M. J. and Anderson G. A. (1994) Comparison of serum responses in swine after vaccination and challenge exposure with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* **55**, 1238–1243.
48. 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.
49. Udeze F. A., Latimer K. S. and Kadis S. (1987) Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **48**, 768–773.
50. Dick W. E. Jr. and Beurret M. (1989) Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens. A survey and consideration of design and preparation factors. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **10**, 48–114.
51. Johnson A. G. (1994) Molecular adjuvants and immunomodulators: new approaches to immunization. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 277–289.

## Article 2

Evaluation of the protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 detoxified lipopolysaccharides or O-polysaccharide-protein conjugate in pigs

**Stéphane Rioux**, Christiane Girard, J. Daniel Dubreuil et Mario Jacques

Sous presse dans  
Research in Veterinary Sciences

Les résultats présentés dans cet article permettent de compléter le premier objectif de mon projet de doctorat. Ils représentent l'évaluation de la protection chez le porc, l'hôte naturel d'*A. pleuropneumoniae*, des deux préparations les plus intéressantes sélectionnées lors des essais de protection chez la souris.

Evaluation of the protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
serotype 1 detoxified lipopolysaccharides or O-polysaccharide-protein  
conjugate in pigs

Stéphane Rioux<sup>1,2</sup>, Christiane Girard<sup>2</sup>, J. Daniel Dubreuil<sup>1,2</sup>,  
and Mario Jacques<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc,  
and <sup>2</sup>Département de pathologie et microbiologie,  
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,  
C.P. 5000, St-Hyacinthe (Québec), Canada J2S 7C6

Running title: *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide vaccines

\*Author to whom correspondence and reprint requests should be addressed.

Tel.: (514) 773-8521 ext. 8348; Fax.: (514) 778-8108; E-mail:  
jacqum@ere.umontreal.ca

## SUMMARY

The major adhesin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia, has been previously identified as the lipopolysaccharide (LPS). Experiments in our laboratory have shown that mice immunized with different *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS preparations were protected against a challenge with a virulent *A. pleuropneumoniae* serotype 1 isolate. The purpose of the present study was to evaluate the protection of pigs against experimental *A. pleuropneumoniae* infection following immunization with two of these LPS preparations. Groups of five specific pathogen free (SPF) pigs were injected twice with one of the following antigen preparations: detoxified LPS, O-polysaccharide-BSA conjugate, a commercial bacterin, or PBS. Two weeks after the second injection, pigs were challenged intranasally with a virulent *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain. Upon macroscopic examination, fibrino-hemorrhagic pleuropneumonia, compatible with *A. pleuropneumoniae* infection, was observed in one to four pigs in each group. The more extensive lesions were present in control, unimmunized pigs and in animals vaccinated with the O-polysaccharide-BSA conjugate. The highest survival rate was recorded when the pigs had been immunized with detoxified LPS or the commercial bacterin. Taken together, our results suggest that a protection comparable to the one obtained with a commercial bacterin was observed when pigs were immunized with a single class of molecules, detoxified LPS. Most importantly, these results confirm the important role of *A. pleuropneumoniae* LPS in protection against porcine pleuropneumonia. Finally, our results also support the idea that mice are not an appropriate model for the evaluation of porcine pleuropneumonia vaccines.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a worldwide disease causing tremendous economic loss to the swine industry (Nicolet 1992). Twelve serotypes of *A. pleuropneumoniae* have been recognized based on capsular antigens (Nielsen 1986). In Québec, serotype 1 is the most predominant followed by serotype 5 (Mittal 1992). The pathogenesis of porcine pleuropneumonia is not well understood, but several cytotoxic and hemolytic activities have been described (Frey et al 1993). We have shown that the lipopolysaccharide (LPS) is the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to porcine respiratory tract cells and mucus (Bélanger et al 1990, 1992, 1994). More recently, we demonstrated that high-molecular-mass LPS was involved in *A. pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells (Paradis et al 1994). In addition, *A. pleuropneumoniae* LPS has been shown to bind pig hemoglobin (Bélanger et al 1995).

Vaccines containing chemically inactivated bacterial cells (or bacterins) of *A. pleuropneumoniae* are currently used to control the disease. Many investigators have previously reported the protective effect of capsular antigens, outer membrane proteins, and RTX-toxins of *A. pleuropneumoniae* (Devenish et al 1990, Gerlach et al 1993, Inzana et al 1988, Rosendal et al 1986). All these preparations may reduce mortality and morbidity but do not provide satisfactory control of the disease process. In contrast, optimal protection of pigs against infection by homologous and heterologous serotypes seemed to occur following natural infection with *A. pleuropneumoniae* (Nielsen 1979). It has been established that a significant immune response to LPS occurred as a result of *A. pleuropneumoniae* infection but was not important after immunization with whole-cell preparation, and that serological cross-reactive immunodeterminants were located in the LPS (Fenwick and

Osburn 1986a). In addition, Fenwick and Osburn (1986b) suggested the potential of purified oligosaccharides conjugated to a protein carrier as vaccines to prevent porcine pleuropneumonia.

Experiments in our laboratory have shown that mice immunized with different *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS preparations were protected against a challenge with a virulent *A. pleuropneumoniae* serotype 1 isolate. A survival rate of 100% was recorded in mice injected with detoxified LPS mixed with a light white oil adjuvant, while a survival rate of 25% was recorded for the control group receiving PBS (unpublished results). Mice immunized with an O-polysaccharide-BSA conjugate mixed with Quil A also induced a significant protection (80%) compared with the control group (Rioux et al 1997). The purpose of the present study was to evaluate the protection of pigs against experimental *A. pleuropneumoniae* infection following immunization with these adhesin-based preparations which gave promising results in mice.

*A. pleuropneumoniae* serotype 1 isolate (FMV87-682) obtained from the diagnostic laboratory (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada) was grown on brain heart infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) agar plates supplemented with 15 µg/ml nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). Plates were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 18-24 h.

LPS of *A. pleuropneumoniae* was extracted by a modification of the phenol/water extraction procedure of Westphal and Jann (1965). After phenol extraction, the aqueous phases were pooled, adjusted to 0.5M NaCl, and 3 volumes of cold acetone were added in order to precipitate the LPS. The solution was kept overnight at -20°C, and centrifuged at 8,000 X g for 20 min.



The supernatant was discarded, and the opaque pellet was resuspended in distilled water. After extensive dialysis against distilled water, the solution was digested with RNase (0.1 mg/ml), DNase (0.1 mg/ml), and proteinase K (2 U/ml). Finally, the solution was lyophilized, and stored at -20°C. Because the LPS of *A. pleuropneumoniae*, like LPS of most gram-negative bacteria, is a toxic molecule (Fenwick and Osburn 1986a), they were detoxified by acid hydrolysis (Paradis et al 1994). The polysaccharides were then fractionated on a Sephadex G-25 column and directly conjugated to bovine serum albumin (BSA) by reductive amination as described previously (Rioux et al 1997).

Three groups of five 6-week old specific pathogen free (SPF) pigs were injected intramuscularly with either a commercial bacterin (2 ml; Pneupac; Schering Canada) or 200 µg of carbohydrates of detoxified LPS, or O-polysaccharide-BSA conjugate as estimated by the method of Dubois (Dubois et al 1956). Detoxified LPS was mixed with an adjuvant composed of Span 85, Tween 85, and mineral oil (light white oil; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) in a 20:1:1:18 volume ratio using a vortex (Hall et al 1989). The O-polysaccharide-BSA conjugate was mixed with Quil A (500 µg; Cederlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada) in 2 ml phosphate-buffered saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4). One group of non-vaccinated pigs received PBS and served as control. A booster injection with antigen in adjuvant was administered 3 weeks after the first injection. Two weeks after the last immunization, animals were challenged intranasally with a total of 4 ml of PBS (0.01 M, pH 7.4) containing approximately  $4 \times 10^9$  CFU of a 6-h old culture *A. pleuropneumoniae* isolate FMV87-682 [on PPLO (Difco) agar plates supplemented with 10% yeast extract and 5% horse serum].

Pigs were examined daily for dyspnea and fever. A necropsy was done on every pig, with particular attention to the vaccination site and the lungs. Surviving pigs were euthanized (Euthanyl, MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) 2 weeks after challenge. The lung lesions weight on total lung weight was estimated (Lechtenberg et al 1994). Samples of lungs and of the vaccination site were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and 6- $\mu$ m thick sections were cut and stained with hematoxylin, phloxin and saffron. Lungs were cultured for the presence of *A. pleuropneumoniae* using blood agar plates with a *Staphylococcus aureus* streak, while tonsils were cultured using PPLO agar enriched with 2  $\mu$ g/ml of crystal violet, 1  $\mu$ g/ml of lincomycin, 6 IU/ml of bacitracin, and 1  $\mu$ g/ml of NAD (Sidibé et al 1993). Isolates of *A. pleuropneumoniae* were serotyped by colony dot using monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen (5.1 G8F10; kindly supplied by Eva I. Stenbaek, Department of Biochemistry and Immunology, National Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark).

As observed in Table 1, the body temperature was higher than normal for three pigs vaccinated with the commercial bacterin, four pigs vaccinated with detoxified LPS, and all pigs in the other two groups. Three control unimmunized pigs and three pigs vaccinated with the O-polysaccharide-BSA conjugate died shortly (i.e. 24-40 h) after challenge. However, immunization with detoxified LPS or the commercial bacterin induced a better protection as only 1 pig died in the detoxified LPS group while no mortality was observed in the commercial bacterin group.

Upon macroscopic examination, fibrino-hemorrhagic pleuropneumonia, compatible with *A. pleuropneumoniae* infection (Dungworth 1993) was

observed in one to four pigs in each group, the more extensive lesions being present in control pigs and in O-polysaccharide-BSA vaccinated animals (Table 1). No changes such as granuloma were observed macroscopically at vaccination site.

Microscopic examination of the pulmonary lesions revealed changes compatible with porcine pleuropneumonia (Dungworth 1993). The visceral pleura was often covered by fibrin containing more or less degenerated neutrophils. The interlobular septa were thickened by edema fluid, inflammatory cells and fibrin. Alveolar lumen were occupied by edema fluid and various numbers of erythrocytes, degenerated macrophages (oat cells) and neutrophils. Bacteria were frequently observed. Some blood vessels were thrombosed.

Eight vaccinated animals had muscular lesions at the vaccination site (Table 1) varying from a mild interstitial fibrosis associated with slight lymphocytic infiltration (one animal), to a focally extensive granulomatous myositis and/or panniculitis, with presence of clear voluminous vacuoles surrounded by macrophages and giant cells, with necrosis, fibrosis, myocytes atrophy and mild diffuse infiltration of eosinophils and/or lymphocytes in adjacent tissues. The commercial bacterin induced these changes more frequently than the other vaccines. Those granulomatous lesions associated with vaccination have already been described with various adjuvants used to prepare porcine pleuropneumonia vaccine (Straw et al 1985).

As observed in Table 1, reisolation of *A. pleuropneumoniae* from the lungs was reduced in pigs immunized with the commercial bacterin. Bacteria, however, were isolated from the tonsils of 16 control or immunized animals.

In summary, with regard to all parameters evaluated, the best protection was observed with the commercial whole-cell bacterin. However, our results indicate that a comparable protection was obtained when pigs were immunized with a single class of molecules, detoxified LPS. In addition, these results confirm the important role of *A. pleuropneumoniae* LPS in protection against porcine pleuropneumonia. The major factor responsible for protection can be the production of opsonising antibody against the lipopolysaccharidic adhesin. Future studies should be designed to improve protection in pigs by testing other doses of LPS-based vaccines, as well as other adjuvants. Our results also indicate a lack of correlation between the protective efficacy determined in mice and in pigs, supporting the idea that a mouse model is not appropriate to evaluate vaccines against porcine pleuropneumonia.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Marylène Kobisch for advice, Moussa S. Diarra for technical assistance, and Denis Martin and Craig Laferrière for their help in preparing the O-polysaccharide-BSA conjugate. This work was supported by a research partnership program involving the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Agriculture Canada, and Fédération des Producteurs de Porcs du Québec. Stéphane Rioux is the recipient of a studentship from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

**REFERENCES**

- BÉLANGER, M., BÉGIN, C. & JACQUES, M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infection and Immunity* **63**, 656-662
- BÉLANGER, M., DUBREUIL, D., HAREL, J., GIRARD, C. & JACQUES, M. (1990) Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infection and Immunity* **58**, 3523-3530
- BÉLANGER, M., DUBREUIL, D. & JACQUES, M. (1994) Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* **62**, 868-873
- BÉLANGER, M., RIOUX, S., FOIRY, B. & JACQUES, M. (1992) Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* **97**, 119-126
- DEVENISH, J., ROSENDAL, S. & BOSSÉ, J. T. (1990) Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* **58**, 3829-3832
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356

- DUNGWORTH, D. L. (1993) The respiratory system. In Pathology of domestic animals. Eds K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy and N. Palmer. 4th ed. Academic Press Inc, San Diego.USA. pp 539-699
- FENWICK, B. W. & OSBURN, B. I. (1986a) Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infection and Immunity* **54**, 575-582
- FENWICK, B. W. & OSBURN, B. I. (1986b) Vaccine potential of *Haemophilus pleuropneumoniae* oligosaccharide-tetanus toxoid conjugates. *Infection and Immunity* **54**, 583-586
- FREY, J., BOSSE, J. T., CHANG, Y.-F., CULLEN, J. M., FENWICK, B., GERLACH, G. F., GYGI, D., HAESBROUCK, F., INZANA, T. J., JANSEN, R., KAMP, E. M., MACDONALD, J., MACINNES, J. I., MITTAL, K. R., NICOLET, J., RYCROFT, A. N., SEGERS, R. P. A. M., SMITS, M. A., STENBAEK, E., STRUCK, D.K., VAN DEN BOSCH, J. F., WILSON, P. J. & YOUNG, R. (1993) *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *Journal of General Microbiology* **139**, 1723-1728
- GERLACH, G.-F., ANDERSON, C., KLASHINSKY, S., ROSSI-CAMPOS, A., POTTER, A. A. & WILLSON, P. J. (1993) Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (Om1A) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infection and Immunity* **61**, 565-572

- HALL, W., MOLITOR, T. W., JOO, H. S. & PIJOAN, C. (1989) Comparison of protective immunity and inflammatory responses of pigs following immunization with different *Actinobacillus pleuropneumoniae* preparations with and without adjuvants. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **22**, 175-186
- INZANA, T. J., MA, J., WORKMAN, T., GOGOLEWSKI, R. P. & ANDERSON, P. (1988) Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infection and Immunity* **56**, 1880-1889
- LECHTENBERG, K. F., SHRYOCK, T. R. & MOORE, G. (1994) Characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* seeder pig challenge-exposure model. *American Journal of Veterinary Research* **55**, 1703-1709
- MITTAL, K. R. (1992) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Veterinary Microbiology* **32**, 135-148
- NICOLET, J. (1992) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In Disease of swine. Eds A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire and D. J. Taylor. 7th ed. Iowa State University Press, Ames, USA. pp 401-408
- NIELSEN, R. (1979) *Haemophilus paraahaemolyticus* serotypes. Pathogenicity and cross-immunity. *Nordisk Veterinaermedicin* **31**, 407-413



- NIELSEN, R. (1986) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Veterinaria Scandinavica* **27**, 453-455
- PARADIS, S.-É., DUBREUIL, D., RIOUX, S. & JACQUES, M. (1994) High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infection and Immunity* **62**, 3311-3319
- RIOUX, S., DUBREUIL, D., BÉGIN, C., LAFERRIERE, C., MARTIN, D. & JACQUES, M. (1997) Evaluation of protective efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 lipopolysaccharide-protein conjugate in mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **20**, 63-74
- ROSENDAL, S., MINIATS, O. P. & SINCLAIR, P. (1986) Protective efficacy of capsule extracts of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pig and mice. *Veterinary Microbiology* **12**, 229-240
- SIDIBÉ, M., MESSIER, S., LARIVIERE, S., GOTTSCHALK, M. & MITTAL, K. R. (1993) Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Canadian Journal of Veterinary Research* **57**, 204-208
- STRAW, B. E., MACLACHLAN, N. J., CORBETT, W. T., CARTER, P. B. & SCHEY, H. M. (1985) Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **49**, 149-151.

WESTPHAL, O. & JANN, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry* **5**, 83-91.

Table 1. Protection of pigs immunized with different vaccine preparations and challenged with virulent *A. pleuropneumoniae* serotype 1 isolate FMV87-682.

	PBS	O-polysaccharide-BSA	Detoxified LPS	Commercial bacterin
Number of pigs (n)	5	5	5	5
Mortality (n)	3	3	1	0
Fever >40°C (n)	5	5	4	3
Dyspnea (n)	2	3	1	0
Pigs with lung lesions (n)	4	4	3	1
Lung lesions (mean % ± SD) <sup>a</sup>	46.7 ± 31.4	40.6 ± 40.0	18.2 ± 21.4	1.6 ± 3.6
<i>A. pleuropneumoniae</i> isolation from lungs (n) <sup>b</sup>	3	4	3	1
<i>A. pleuropneumoniae</i> isolation from tonsils (n)	4	4	4	4
Granulomas at site of vaccination (n)	0	1	3	4

<sup>a</sup>Mean % ± standard deviations.

<sup>b</sup> *A. pleuropneumoniae* was not isolated from the lungs of pigs without lung lesions.

Article 3

Isolation and characterization of LPS mutants of  
*Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1

**Stéphane Rioux**, Caroline Bégin, J. Daniel Dubreuil et Mario Jacques

Curr. Microbiol. **35**:139-144, 1997.

Les résultats présentés dans cet article ont permis, dans un premier temps, d'atteindre le deuxième objectif du présent projet. Ils suggèrent un rôle du LPS dans l'adhérence d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcin.

## Isolation and Characterization of LPS Mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1

Stéphane Rioux, Caroline Bégin, J. Daniel Dubreuil, Mario Jacques

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, and Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe (Québec), Canada J2S 7C6

Received: 23 December 1996 / Accepted: 19 February 1997

**Abstract.** The major adhesin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia, has been previously identified as lipopolysaccharide (LPS). The purpose of the present study was to isolate and characterize *A. pleuropneumoniae* LPS mutants. Screening of LPS mutants was performed with colony dot and sensitivity to novobiocin. One mutant obtained by colony dot (F19) and one mutant selected for its increased sensitivity to novobiocin (33.1) did not react with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen compared with the parent strain. Mutants F19 and 33.1 did not express high-molecular-mass LPS bands as determined in silver-stained SDS-PAGE gels. The core-lipid A region of mutant 33.1 and of the parent strain had similar relative mobilities and reacted with serum from a pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae*, while the same region in mutant F19 showed faster migration and did not react with this serum. Use of piglet tracheal frozen sections indicated that mutant F19 was able to adhere to piglet trachea as well as the parent strain, while mutant 33.1 adhered [half as much as] the parent strain. Finally, both LPS mutants were markedly less virulent in mice than the parent strain. Taken together, our observations support the idea that LPS is an important virulence factor of *A. pleuropneumoniae*.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia [25], a worldwide disease causing tremendous economic loss to the swine industry. Twelve serotypes of *A. pleuropneumoniae* have been recognized from capsular antigens [26]. In Québec, serotypes 1 and 5 are the most predominant [23]. The pathogenesis of porcine pleuropneumonia is not well understood, but several cytotoxic and hemolytic activities have been described [9].

The initial event in bacterial colonization is the adherence of microorganisms to the epithelial cells and/or mucus layer of the mucosal surfaces, which involves specific interactions between bacterial adhesins and host receptors [27]. We have shown that lipopolysaccharides (LPS) are the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to porcine respiratory tract cells and mucus [2–4]. More recently, we demonstrated that high-molecular-mass LPS, with the longest O-chains, were involved in *A. pleuropneumoniae* adherence to

porcine respiratory tract cells [28]. In addition, *A. pleuropneumoniae* LPS have been shown to bind pig hemoglobin [5]. LPS is a complex molecule composed of three well-defined regions: the lipid A; the core, an oligosaccharide containing 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid (KDO); and the O-antigen, a polysaccharide consisting of repeating units [11]. Depending on the presence and the number of O-antigen repeating units, LPS can be rough, semirough (e.g., as in *A. pleuropneumoniae* serotype 1), or smooth (e.g., as in *A. pleuropneumoniae* serotype 2) [2, 6, 11]. The biosynthesis of LPS is complex. To assemble O-antigens, monomers are not transferred directly to a growing LPS molecule. Instead, O-antigens are synthesized separately on a lipid carrier (undecaprenol phosphate) by enzymes encoded by the *rfb* gene cluster. Once completed, O-antigen is transferred and covalently linked to a preformed lipid A-core acceptor at the periplasmic face of the plasma membrane. After ligation, the completed LPS molecule is translocated to the cell surface by unknown mechanisms [39].

*A. pleuropneumoniae* serotype 1 and 5 mutants

defective in capsule synthesis [13, 30] and *A. pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5, and 7 mutants defective in hemolysin production [1, 12, 16, 32, 36] have been studied. To the best of our knowledge, no LPS mutants of *A. pleuropneumoniae* have been isolated so far. Thus, the purpose of the present study was to isolate and characterize LPS mutants to better understand the role of LPS in the pathogenesis of swine pleuropneumonia.

### Materials and Methods

**Bacterial strain and growth conditions.** *A. pleuropneumoniae* reference strain representing serotype 1 (strain 4074) was provided by A. Gunnarson (National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden). Bacteria were grown on brain heart infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) agar plates supplemented with 15 µg of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) per ml. Plates were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 18–24 h.

**Selection of mutants.** (1) *Colony dot.* A bacterial suspension was inoculated onto BHI-NAD agar plates to obtain approximately 100 bacterial colonies per plate. After incubation, the plates were incubated at 4°C for 2 h. A nitrocellulose membrane (0.45 µm) was placed on the plate at room temperature for 1 h, lifted, and then incubated for 1 h with a blocking solution consisting of 2% (wt/vol) skim milk in Tris-saline buffer-Tween 20 [TSBT; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.02% (vol/vol) Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)], followed by an incubation of 2 h with monoclonal antibodies against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen (5.1 G8F10; kindly supplied by Eva I. Stenbaek, Department of Biochemistry and Immunology, National Veterinary Laboratory, Copenhagen V, Denmark). The membranes were then washed in TSBT and incubated for 1 h with a goat anti-mouse IgG + IgM (H + L) horseradish peroxidase conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). The reaction was revealed by addition of 4-chloro-1-naphthol and hydrogen peroxide (Sigma) following the method described by Hawkes [10]. The LPS profiles of nonreactive colonies were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

(2) *Sensitivity to novobiocin.* Different bacterial colonies from a master plate were inoculated onto BHI-NAD agar plates supplemented with 2 µg of novobiocin (Sigma) per ml. After incubation, the colonies that did not grow were selected from the master plate. These colonies were also analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

**SDS-PAGE and Tricine SDS-PAGE.** Analysis of the mutants was done by SDS-PAGE. Agar-grown bacteria were suspended in a solubilization buffer containing 10% (vol/vol) glycerol, 5% (vol/vol) β-mercaptoethanol, 2% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS), 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), and 0.025% (vol/vol) bromophenol blue, and heated for 15 min at 100°C. An equal volume of proteinase K (1 mg/ml; Sigma) prepared in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> was added to the samples, and the mixture was incubated for 60 min at 60°C. Samples were separated with a stacking gel of 4.5% (wt/vol) polyacrylamide and a separating gel of 12.5% (wt/vol) polyacrylamide [19]. Samples were electrophoresed at 100 V (stacking gel) and 200 V (separating gel) in a Mini-Protein II apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Gels were either stained with the silver-staining procedure of Tsai and Frasch [38] or used in immunoblotting. The core-lipid A region electrophoretic profile of the mutants was determined by Tricine SDS-PAGE as described previously [15].

**Immunoblotting.** Immunoblots were carried out as described by Towbin et al. [37]. The samples separated by SDS-PAGE were transferred with a mini Trans-Blot apparatus (Bio-Rad Laboratories) to

a nitrocellulose membrane (0.2 µm; Bio-Rad Laboratories) for 1 h at 100 V. The membranes were first incubated for 1 h with a blocking solution consisting of 2% (wt/vol) skim milk in TSB, followed by an overnight incubation at 4°C with the monoclonal antibody 5.1 G8F10. The membranes were then washed in TSB, and incubated for 1 h with a goat anti-mouse IgG + IgM (H + L) horseradish peroxidase conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories). The reaction was revealed as described above. Tricine SDS-PAGE gels were transferred to nitrocellulose membranes and treated as described above. However, an antiserum obtained from a pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae* [29] and a goat anti-swine IgG (H + L) horseradish peroxidase conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories) were used to detect the core-lipid A region [15].

**Electron microscopy.** Capsular material of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 cells was stabilized with a mouse monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* capsular antigen (1.5 C5 F4; kindly supplied by Marcelo Gottschalk, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada) and stained with ruthenium red before examination by transmission electron microscopy as described by Jacques et al. [14].

**Adherence assay.** The adherence assay to frozen sections was performed as described by Paradis et al. [28]. Briefly, bacteria were diluted in PBS containing 1% (wt/vol) bovine serum albumin and 0.01% (vol/vol) Tween 20 to give an A<sub>540</sub> of 0.2. A volume (100 µl) of bacterial suspension was pipetted onto piglet tracheal frozen sections on glass slides and incubated in a moist chamber at 37°C for 2 h. After intensive washing in distilled water, sections were stained with the Diff-Quik stain (Baxter Healthcare Corporation, McGraw Park, IL) according to the manufacturer's instructions. Upon microscopic examination, the number of bacterial cells attached to the tracheal epithelium was determined at a magnification of 1,000. Results were compared for statistical significance by Student's *t* test.

**Virulence in mice.** Groups of ten CDI mice (Charles River Inc., St-constant, Québec, Canada), 8 weeks of age, were challenged with a total of 50 µl of a 6-h-old culture containing approximately 1 × 10<sup>8</sup> CFU of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (parent strain or LPS mutants) by the intranasal route. Intranasal inoculations were performed according to the method described by Rushton [31]. Mice were monitored for mortality for one week after the challenge.

### Results and Discussion

The initiating event in the pathogenesis of most bacterial pulmonary infections is most probably the establishment of the organisms in the upper respiratory tract. Adherence is a complex interaction between the bacterium and the target cells that enables colonization to occur and allows the bacterium to exert its pathogenic and immunogenic effects. The pathogenesis of porcine pleuropneumonia is not well understood, but we have shown the involvement of LPS in adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells and mucus [2–4, 28]. Using spontaneous LPS mutants, we now provide further evidence that LPS represent an important virulence factor of *A. pleuropneumoniae*.

Initial screening of LPS mutants was performed by two different approaches, colony dot and sensitivity to novobiocin. O-antigen expression was analyzed with

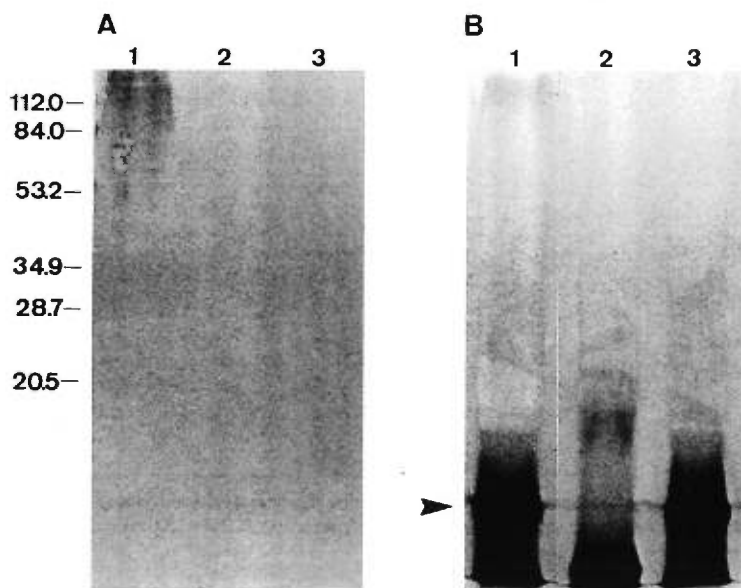


Fig. 1. Immunoblot (A) and silver-stained SDS-PAGE profiles (B) of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain and spontaneous LPS mutants. The immunoblot was probed with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. Lane 1, parent strain; lane 2, mutant F19; lane 3, mutant 33.1. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Arrow indicates the core-lipid A region.

monoclonal antibody 5.1 G8F10, which is directed against an epitope located in the O-antigen of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS [20]. Approximately 4100 individual bacterial colonies were probed with this monoclonal antibody in colony dot. Bacterial colonies that differed in reactivity with this monoclonal antibody from the parent strain were selected. With this approach, seven putative O-antigen-deficient mutants were identified. A total of 1100 individual bacterial colonies were also tested on a selective medium containing novobiocin, and 188 mutants, not able to grow in the presence of the hydrophobic antibiotic, were observed. All these putative LPS mutants were then analyzed by immunoblotting. One of the seven putative mutants obtained by colony dot (F19) and one of the 188 mutants selected for their increased sensitivity to novobiocin (33.1) did not react with the monoclonal antibody 5.1 G8F10 compared with the parent strain (Fig. 1a). The other mutants reacted as well as the parent strain with the monoclonal antibody 5.1 G8F10 when tested by immunoblot.

These spontaneous mutants were also characterized by SDS-PAGE. Mutants F19 and 33.1 appeared to possess a truncated LPS as they did not express high-molecular-mass LPS bands in silver-stained gels (Fig. 1b). In addition, the core-lipid A region of mutant 33.1 and of the parent strain had similar relative mobilities, while the same region in mutant F19 showed faster migration than the parent strain (Fig. 1b). The samples were separated by Tricine SDS-PAGE, which allows a better resolution of the core-lipid A region [21], transferred to nitrocellulose membranes, and the antigenicity of the core-lipid A region was tested by immunoblot

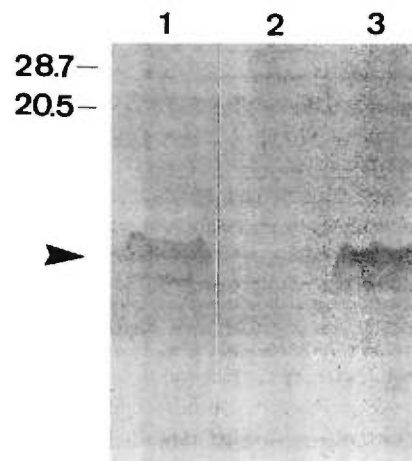


Fig. 2. Immunoblot of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain and spontaneous LPS mutants separated by Tricine SDS-PAGE. The immunoblot was probed with serum from a pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae*. Lane 1, parent strain; lane 2, mutant F19; lane 3, mutant 33.1. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Arrow indicates the core-lipid A region.

(Fig. 2). The core-lipid A of mutant 33.1 reacted with a serum from a pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae* as did the parent strain, while the core-lipid A region of mutant F19 did not react with the same serum. These results suggest the presence of an incomplete core in mutant F19 compatible with a faster migration on gel and absence of epitopes recognized by the pig antiserum.

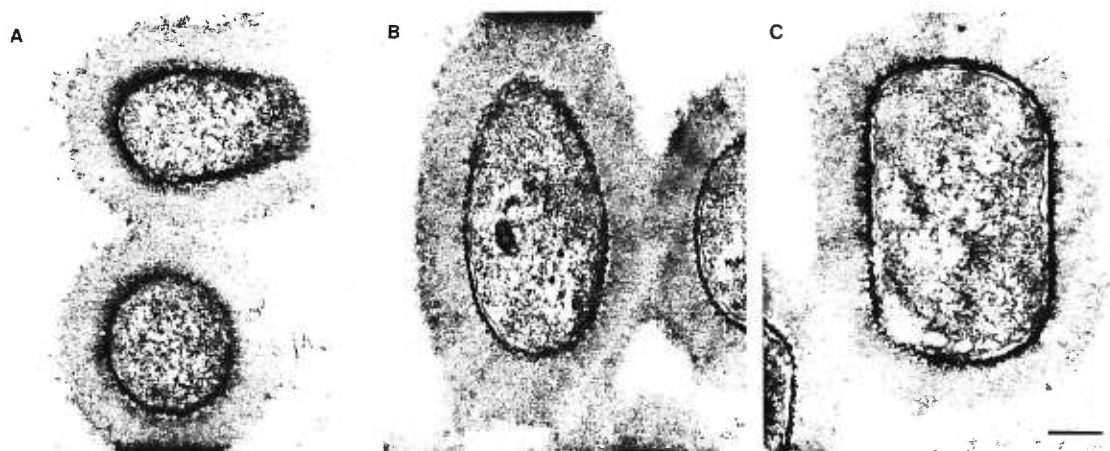


Fig. 3. Transmission electron micrographs of thin sections of *A. pleuropneumoniae* immunostabilized with a mouse monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* capsular antigen, and stained with ruthenium red. (A) Parent strain; (B) mutant F19; (C) mutant 33.1. Bar = 200 nm.

Table 1. Adherence to piglet tracheal frozen sections and virulence in mice of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain and LPS mutants

Strain	Adherence (%) <sup>a</sup>	Virulence in mice (%) <sup>b</sup>
Parent strain	92 ± 20 (100)	10/10 (100)
F19	94 ± 37 (102)	3/10 (30)
33.1	50 ± 20 (54) <sup>c</sup>	2/10 (20)

<sup>a</sup> Represents the number of bacterial cells attached to the tracheal epithelium determined at a magnification of ×1000. Values represent the average of four samples ± standard deviation, and the values in parentheses represent the percentage relative to the parent strain.

<sup>b</sup> Represents the number of dead mice/number inoculated.

<sup>c</sup> Significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed between the adherence of mutant 33.1 and of the parent strain.

Electron microscopy of thin sections of bacterial cells stabilized with a mouse monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* capsular antigen and stained with ruthenium red revealed the presence of capsular material (a layer of approximately 160 nm) surrounding cells of *A. pleuropneumoniae* parent strain and both LPS mutants (Fig. 3), indicating that synthesis of capsular material was not altered in these LPS mutants.

The virulence of the mutants was evaluated in mice, an economical animal model that has been used by others [17, 18, 34]. After challenge with mutants F19 and 33.1, 20–30% mortality was recorded, while after challenge with the parent strain, the percentage of mortality was 100% (Table 1). Therefore, the LPS mutants, although well encapsulated, were markedly less virulent in mice than the parent strain. Similar results with strains of *Salmonella* defective in LPS biosynthesis have been reported [7, 22].

Finally, the adherence of *A. pleuropneumoniae* parent strain and of the two mutants with truncated LPS lacking O-chains to piglet tracheal frozen sections was evaluated. After 2 h of incubation, the parent strain and the mutant F19 adhered similarly; the average number of bacterial cells adhered to tracheal sections was 92 and 94, respectively (Table 1). For mutant 33.1, the average number of adherent bacterial cells was decreased to 50. These observations support, at least in part, the idea that *A. pleuropneumoniae* LPS play a role in adherence, but also suggest that the presence of O-chains does not seem to be essential. Similar results with lipooligosaccharide (LOS) mutants of *Neisseria gonorrhoeae* have been reported [33]. One LOS mutant (*Isi-1*) adhered poorly to Chang epithelial cells in contrast to the parent strain and to another isogenic LOS mutant (*galE*). In addition, LPS mutants of *Pseudomonas aeruginosa* showed a reduced ability to adhere to rat corneas [8] and to epithelial cells [35]. Other studies have reported a relationship between LPS mutations and reduced adherence. For example, with LPS mutants of *Salmonella tify*, Mroczenski-Willey et al. [24] showed that adhesion to and penetration of HeLa cell monolayers by *S. tify* Ty2 requires the presence of a complete LPS molecule.

In summary, our results indicate that one *A. pleuropneumoniae* LPS mutant adhered less than the parent strain, while both mutants are markedly less virulent in mice. Taken together, our observations support the idea that LPS is an important virulence factor of *A. pleuropneumoniae*. However, since these mutants are not genotypically well characterized, future studies should use, for example, transposon mutagenesis for the generation of isogenic mutants. Studies conducted with such isogenic mutants will eliminate the possibility of mutations in



different *A. pleuropneumoniae* genes that could play a role in virulence.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to M. Jacques. S. Rioux is the recipient of a studentship from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche. We are grateful to Bernadette Foiry for performing the electron microscopy.

#### Literature Cited

- Anderson C, Potter AA, Gerlach G-F (1991) Isolation and molecular characterization of spontaneously occurring cytolysin-negative mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Infect Immun* 59:4110-4116
- Bélangier M, Dubreuil D, Harel J, Girard C, Jacques M (1990) Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect Immun* 58:3523-3530
- Bélangier M, Rioux S, Foiry B, Jacques M (1992) Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 97:119-126
- Bélangier M, Dubreuil D, Jacques M (1994) Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 62:868-873
- Bélangier M, Bégin C, Jacques M (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun* 63:656-662
- Byrd W, Kadis S (1989) Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect Immun* 57:3901-3906
- Finlay BB, Starnbach MN, Francis CL, Stocker BAD, Chatfield S, Dougan G, Falkow S (1988) Identification and characterization of *TnphoA* mutants of *Salmonella* that are unable to pass through a polarized MDCK epithelial cell monolayer. *Mol Microbiol* 2:757-766
- Fletcher EL, Fleiszig SMJ, Brennan NA (1993) Lipopolysaccharide in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the cornea and contact lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:1930-1936
- Frey J, Bosse JT, Chang Y-F, Mullen JM, Fenwick B, Gerlach GF, Gygi D, Haesebrouck F, Inzana TJ, Jansen R, Kamp EM, Macdonald J, MacInnes JI, Mittal KR, Nicolet J, Rycroft AN, Segers RPAM, Smits MA, Stenbaek E, Struck DK, van den Bosch JF, Wilson PJ, Young R (1993) *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *J Gen Microbiol* 139:1723-1728
- Hawkes R (1982) Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. *Anal Biochem* 123:143-146
- Hitchcock PJ, Leive L, Mäkelä PH, Rietschel ET, Strittmatter W, Morrison DC (1986) Lipopolysaccharide nomenclature: past, present, and future. *J Bacteriol* 166:699-705
- Inzana TJ, Todd J, Ma J, Veit H (1991) Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. *Microb Pathog* 10:281-296
- Inzana TJ, Todd J, Veit HP (1993) Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect Immun* 61:1682-1686
- Jacques M, Foiry B, Higgins R, Mittal KR (1988) Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol* 170:3314-3318
- Jacques M, Rioux S, Paradis S-É, Bégin C, Gottschalk M (1996) Identification of two core types in lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* representing serotypes 1 to 12. *Can J Microbiol* 42:855-858
- Jansen R, Briaire J, Smith HE, Dom P, Haesebrouck F, Kamp EM, Gielkens ALJ, Smits MA (1995) Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. *Infect Immun* 63:27-37
- Komal JPS, Mittal KR (1990a) Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotype 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet Microbiol* 25:229-240
- Komal JPS, Mittal KR (1990b) Studies on the interactions of two different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 13:25-34
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lairini K, Stenbaek E, Lacouture S, Gottschalk M (1995) Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet Microbiol* 46:369-381
- Lesse AJ, Campagnari AA, Bittner WE, Apicella MA (1990) Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyarylamide gel electrophoresis. *J Immunol Methods* 126:109-117
- Miller I, Maskell D, Hormaeche C, Johnson K, Pickard D, Dougan G (1989) Isolation of orally attenuated *Salmonella typhimurium* following *TnphoA* mutagenesis. *Infect Immun* 57:2758-2763
- Mittal KR (1992) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet Microbiol* 32:135-148
- Mroczenski-Wildy MJ, Di Fabio JL, Cabello FC (1989) Invasion and lysis of HeLa cell monolayers by *Salmonella typhi*: the role of lipopolysaccharide. *Microb Pathog* 6:143-152
- Nicolet J (1992) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ (eds) *Disease of swine*. 7th ed. Ames, IA: Iowa State University Press. pp 401-408
- Nielsen R (1986) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet Scand* 27:453-455
- Ofeik I, Doyle RJ (1994) *Bacterial adhesion to cell and tissues*. New York: Chapman and Hall
- Paradis S-É, Dubreuil D, Rioux S, Jacques M (1994) High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect Immun* 62:3311-3319
- Radacovici S, Lallier R, Larivière S, Dubreuil JD (1992) Biochemical characterization of an antigenic saline extract of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 and identification of a serotype-specific antigen for ELISA serodiagnosis. *Vet Microbiol* 30:369-385
- Rosendal S, MacInnes JI (1990) Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1. *Am J Vet Res* 51:711-717
- Rushton B (1978) Induction of pneumonia in mice with *Pasteurella haemolytica*. *J Comp Pathol* 88:477-480
- Rycroft AN, Williams D, Cullen JM, Macdonald J (1991) The cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleurotoxin) is distinct from the haemolysin and is associated with a 120 kDa polypeptide. *J Gen Microbiol* 137:561-568
- Schwan ET, Robertson BD, Brade H, van Putten JPM (1995) Gonococcal *rfaF* mutants express Rd<sub>2</sub> chemotype LPS and do not enter epithelial host cells. *Mol Microbiol* 15:267-275

34. Sebunya TNK, Saunders JR (1982) Studies on immunity of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in mice. *Am J Vet Res* 43:1793-1798
35. Tang HB, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB, Prince A (1996) Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 64:37-43
36. Tascon RJ, Vazquez-Boland JA, Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Barbosa I, Rodriguez-Ferri EF (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
37. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354
38. Tsai CM, Frasch CE (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 119:115-119
39. Whitfield C (1995) Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol* 3:178-185

Article 4

Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of  
*Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1

**Stéphane Rioux**, Josée Harel, Joachim Frey, Jacques Nicolet,  
Marylène Kobisch, J. Daniel Dubreuil et Mario Jacques

Soumis pour publication à  
Infection and Immunity

Ce dernier article nous a permis de compléter le deuxième objectif de la thèse, c'est-à-dire de confirmer le rôle du LPS dans la pathogénie à l'aide de différents mutants isogéniques et d'identifier la région du LPS qui semble être responsable de l'adhérence d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcin

Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of  
*Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1

Stéphane Rioux<sup>1</sup>, Josée Harel<sup>1</sup>, Joachim Frey<sup>2</sup>, Jacques Nicolet<sup>2</sup>, Marylène Kobisch<sup>3</sup>, J. Daniel Dubreuil<sup>1</sup>, and Mario Jacques<sup>1\*</sup>

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, and Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6<sup>1</sup>; Institute for Veterinary Bacteriology, University of Berne, Laenggasstrasse 122, CH-3012 Berne, Switzerland<sup>2</sup>; Unité de recherche de mycoplasmodologie et bactériologie, Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, BP 53, 22440 Ploufragan, France<sup>3</sup>.

Running title: LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

\*Corresponding author. Mailing address: Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6. Phone: (514) 773-8521 ext.8348. Fax: (514) 778-8108. Electronic mail address: jacqum@ere.umontreal.ca

## ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS) has previously been identified as a major adhesin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia. The purpose of the present study was to isolate and characterize mutants in LPS biosynthesis by using a mini-Tn10 transposon mutagenesis system. Seven mutants appeared to possess a rough LPS as they did not express high-molecular-mass LPS bands in SDS-PAGE gels and did not react with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. One mutant (#5.1) expressed the high-molecular-mass LPS bands but, as visualized by Tricine SDS-PAGE, showed an additional band in the core-lipid A region. The LPS mutants showed sensitivity to pig serum at various degrees, while the parent strain was serum-resistant. The majority of LPS mutants were less virulent in mice than the parent strain. Use of piglet tracheal frozen sections indicated that the rough LPS mutants adhered similarly or in greater numbers than the parent strain. Interestingly, the LPS mutant #5.1 adhered 38% less than the parent strain and was also less virulent in pigs. The gene affected by mini-Tn10 in LPS mutant #5.1 is *galU*, the structural gene for UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase involved in LPS core biosynthesis. Taken together our observations demonstrate the role of LPS in adhesion of *A. pleuropneumoniae* to target cells and indicate its function as a virulence factor. Our data also suggest that although the presence of O-antigen does not seem to be essential, an intact core-lipid A region is required for adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells.

## INTRODUCTION

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia, an acute or chronic infection characterized by hemorrhagic, fibrinous and necrotic lung lesions. The disease is highly contagious and causes tremendous economic loss to the swine industry (27). Twelve serotypes of *A. pleuropneumoniae* have been recognized based on capsular and lipopolysaccharide antigens (28). In Québec, serotypes 1 and 5 are predominant (26). Several bacterial factors have been suggested as important virulence attributes of *A. pleuropneumoniae*. The hemolytic and cytotoxic RTX toxins have been shown to be major virulence factors (13). In addition, the polysaccharidic capsule, some outer membrane proteins, and lipopolysaccharides (LPS) also seem to be involved in virulence (17, 44). We have shown that LPS play a major role in adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells and mucus (4, 5, 18, 31). In addition, we recently observed that *A. pleuropneumoniae* LPS were binding pig hemoglobin (1, 3).

Lipopolysaccharide is a complex molecule composed of three well-defined regions: the lipid A; the core, which is an oligosaccharide containing 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid; and the O-antigen, a polysaccharide consisting of repeating units (14). The biosynthesis of LPS is complex, and genes involved tend to be clustered into distinct regions of the bacterial chromosome. For enteric bacteria, the *rfa* [*waa*; new nomenclature system proposed for genes involved in expression of bacterial polysaccharides (37)] gene cluster encodes LPS core biosynthesis and O-antigen attachment, while the genes involved in the biosynthesis of the O-antigen region are predominantly found at the *rfb* (*wb*\*) locus. In addition, other genes involved in the biosynthesis of the LPS core and O-antigen are spread on the chromosome. The genes involved

in lipid A biosynthesis are less clustered. Several genes acting early in the pathway are located in a large operon (*lpx*) while other genes are scattered around the chromosome. The O-antigen polymer is synthesized on a lipid carrier (undecaprenol phosphate) independently of lipid A and core. Following completion of the core-lipid A and O-antigen, these moieties may be exported to the periplasmic surface of the cytoplasmic membrane by energy-dependant processes where they are joined. In other cases, it seems that the entire LPS is assembled at the cytoplasmic face of the cytoplasmic membrane and then translocated intact to its final destination in the outer leaflet of the outer membrane. These facts imply that more than one transport system may be required for export of LPS (32, 36, 40).

To the best of our knowledge, only spontaneous LPS mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 have been described (38). However, these mutants were genotypically not characterized. The purpose of the present study was to isolate and characterize genetically and functionally LPS mutants using a mini-Tn10 transposon mutagenesis system.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** The nalidixic acid-resistant mutant (4074 Nal<sup>r</sup>) obtained from *A. pleuropneumoniae* reference strain representing serotype 1 (strain 4074) was grown on BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI) agar plates supplemented with 15 µg of NAD per ml and 30 µg of nalidixic acid (Nal) per ml. *Escherichia coli* S17.1  $\lambda$ pir (pLOF/Km) was grown on LB agar plates supplemented with 50 µg of kanamycin (Km) per ml. Transpositional mutants were grown on BHI agar plates supplemented with 15 µg/ml of NAD, 30 µg/ml of Nal and 75 µg/ml of Km. Plates were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 18-24 h.

**Transpositional mutagenesis.** Mutagenesis in *A. pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative (9) was done as described by Tascón et al. (43). In brief, overnight cultures of donor and recipient strains were diluted in 0.85% NaCl to give an  $A_{650nm}$  of 0.8. One hundred µl of each bacterial suspension were mixed in 5 ml of sterile 10 mM MgSO<sub>4</sub> and then filtered through a Millipore type HA 0.45 µm membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA). Mating filters containing donor and recipient bacteria were placed onto BHI-NAD agar plates (cells side up), and incubated at 37°C for 4 h. The membrane was then transferred to BHI-NAD agar plates containing 100 µM IPTG to induce expression of the transposase. After incubation at 37°C for 15-18 h, the bacterial cells were resuspended in sterile NaCl (0.85%), and appropriate dilutions were plated on the counterselecting medium (BHI-NAD-Nal-Km).

**Selection of mutants.** Different bacterial colonies from a master plate were inoculated onto BHI-NAD-Nal-Km agar plates supplemented with 2 µg of novobiocin per ml. After incubation, the colonies that did not grow in the



presence of this hydrophobic antibiotic were selected from the master plate. These novobiocin-sensitive mutants were then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

**SDS-PAGE, Tricine SDS-PAGE, and immunoblotting.** Electrophoretic separation methods and analysis including SDS-PAGE, Tricine SDS-PAGE, and immunoblotting analysis were performed as described previously by Rioux et al. (38).

**DNA techniques.** Chromosomal DNA was purified using the guanidium thiocyanate method from Pitcher et al. (34). Briefly, cells were lysed with GES-buffer (5 M guanidine thiocyanate, 100 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% sodium-lauryl-sarcosinate) and proteins were precipitated with 7.5M ammonium acetate. Phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1; Sigma) was used to remove remaining exonucleases and lipoproteins from the DNA. Finally, the DNA was precipitated with isopropanol.

PCR amplification of the transposon mini-Tn10 was made using the oligonucleotides primers KMTN903-L (5' AAGGGGTGTTATGAGCCATATT 3') and KMTN903-R (5' CCAATTCTGATTAGAAAAAGTC 3') at annealing temperature of 53°C using standard conditions (2). Labelling of a specific probe for the transposon with digoxigenin (DIG) was made in a standard PCR which was supplemented with 50 µM digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada) using plasmid pLOF/Km as template and the same primers. Southern blot analysis with *Xho*I-digested genomic DNA was done using a standard protocol (2) with the following washing conditions: two washes for 5 min at room temperature with 2 X SSC containing 0.1% SDS, and twice for 15 min at

68°C with 0.2 X SSC containing 0.1% SDS. The DIG-labelled probe was detected using phosphatase-labelled anti-DIG antibodies with CDP-Star as substrate (Boehringer Mannheim) according to the manufacturer's instructions.

Identification of the mutated gene was performed using a PCR-based procedure that allows amplification of chromosomal DNA adjacent to the mini-Tn10 site of insertion. The procedure is based on a single specific primer PCR amplification of chromosomal DNA adjacent to one end of the transposon insert (30). Chromosomal DNA was digested with restriction enzyme *Hind*III (which cuts the transposon at a single site) and ligated into a pBluescript II KS (+) plasmid that was digested with the same enzyme. To perform the PCR the following primers were used: one specific primer annealing to the mini-Tn10 [Hind3-FOR (5' GCTTTTGCCATTCTCACCGGATT 3')] and the other annealing to the vector pBluescript II KS (+) [T7-REV (5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3')]. Initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 30 cycles of PCR were used. Each cycle consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 4 min using standard conditions (2).

DNA sequencing of the PCR product was performed using the primers T7-REV and Hind3-FOR at the DNA sequencing core facility (University of Maine, Orono) by using an ABI model 373A stretch DNA sequencer. Subsequent primers were based on the obtained sequence. DNA sequence information was analyzed with programs from University of Wisconsin Genetics Computer Group software (10) using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases.

**Electron microscopy.** Capsular material of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 cells was stabilized using a mouse monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* capsular antigen (1.5 C5 F4; kindly supplied by Marcelo Gottschalk, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada) and stained with ruthenium red before examination by transmission electron microscopy as described previously (19, 20).

**Adherence assay.** The adherence assay to frozen tracheal sections was performed as described by Paradis et al. (31). Briefly, bacteria were diluted in PBS containing 1% (wt/vol) bovine serum albumin and 0.01% (vol/vol) Tween 20 to give an  $A_{540\text{nm}}$  of 0.2. A volume (100  $\mu\text{l}$ ) of bacterial suspension was pipetted onto piglet tracheal frozen sections on glass slides and incubated in a moist chamber at 37°C for 2 h. After intensive washing in distilled water, sections were stained with the Diff-Quik stain (Baxter Healthcare Corporation, McGraw Park, IL.) according to the manufacturer's instructions. Upon microscopic examination, the number of bacterial cells attached to the tracheal epithelium was determined at a magnification of X1,000. Results were compared for statistical significance by Student's t test.

**Serum bactericidal assay.** A modification of the serum bactericidal assay procedure described by Ward and Inzana (45) was used. A 6-h old culture of *A. pleuropneumoniae* was harvested and washed at room temperature with PBS containing 0.15 mM  $\text{CaCl}_2$  and 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$  ( $\text{PBS}^{++}$ ). Bacteria were diluted to approximately  $5 \times 10^4$  CFU/ml in  $\text{PBS}^{++}$ . A volume of 50  $\mu\text{l}$  of the bacterial suspension was added to 450  $\mu\text{l}$  of normal swine serum and incubated at 37°C. Control tubes contained heat-inactivated serum. Viable-cell counts were estimated at 0, 1, 2 and 3 h by plating 50  $\mu\text{l}$  of this bacterial suspension in

serum on BHI-NAD agar. Plates were incubated overnight at 37°C and the percentage of viability was determined according to the equation: (number of colonies after incubation/number of colonies before incubation) X 100.

**Virulence in mice.** Groups of ten CD1 mice (Charles River Inc., St-Constant, Québec, Canada), 8 weeks of age, were challenged with a total of 50 µl of a 6-h old culture containing approximately  $1 \times 10^8$  CFU of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (parent strain or LPS mutants) by the intranasal route (38). Mice were monitored for mortality for one week after the challenge.

**Experimental pig infection.** Ten specific-pathogen-free, 7-week-old piglets reared in a pathogen-free environment were used. One group of four piglets received the parent strain 4074 Nal<sup>r</sup> and one group of six piglets received LPS mutant #5.1. Piglets were challenged once intranasally (0.5 ml per nostril) with a suspension containing  $10^6$  CFU/ml. Animals were monitored daily for a rise in body temperature, and dyspnea. Pigs were euthanized 8 days after the inoculation. All pigs were examined thoroughly at necropsy, including macroscopic and microscopic lesions, and reisolation of challenge bacteria. Samples of lungs were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and 6-µm thick sections were cut and stained with hematoxylin, phloxin and saffron. Lungs and tonsils were cultured for the presence of *A. pleuropneumoniae* using trypticase-soya (Difco) agar enriched with 1 µg/ml of crystal violet, 1 µg/ml of lincomycin, 128 µg/ml of bacitracin, 1 mg/ml of NAD, 5% sheep blood, and 5% yeast extract. Isolates of *A. pleuropneumoniae* were inoculated on BHI-NAD-Nal and BHI-NAD-Nal-Km to confirm that the mutant strain or the parent strain was reisolated, respectively.

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence of the *A. pleuropneumoniae galU* gene was deposited to GenBank and assigned the accession number AF053017.

## RESULTS

**Isolation and characterization of LPS mutants.** Initial screening of LPS mutants was performed using susceptibility to novobiocin, a hydrophobic antibiotic effective against rough LPS mutants (29). Approximately 1300 individual bacterial colonies, obtained from two independent mutagenesis experiments, were tested on a selective medium containing novobiocin; 109 mutants, not able to grow in the presence of this hydrophobic antibiotic, were retained. All these mutants were then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using the monoclonal antibody 5.1 G8F10, which is directed against an epitope located in the O-antigen of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS (21). Seven mutants (#1.1, #15.1, #24.1, #27.1, #36.1, #44.1 and #51.1) appeared to possess a rough LPS as they did not express high-molecular-mass LPS bands in silver-stained SDS-PAGE gels, while one mutant (#5.1) and the parent strain expressed the high-molecular-mass LPS bands (Fig. 1, lanes 1 and 9). These mutants were then characterized by immunoblotting. Rough LPS mutants #1.1, #15.1, #24.1, #27.1, #36.1, #44.1 and #51.1 did not react with the monoclonal antibody 5.1 G8F10 as expected, while the LPS mutant #5.1 react with this monoclonal antibody (Fig. 2, lane 9). The mutant #5.1 showed an additional band in the core-lipid A region when visualized by Tricine SDS-PAGE, a method which allows a better resolution of the core-lipid A region (Fig. 3A) (23). In addition, the sample separated using Tricine SDS-PAGE was transferred to nitrocellulose membranes and the antigenicity of the core-lipid A region was tested by immunoblot using a serum from a pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae* (Fig. 3B). The upper band of the core-lipid A region of mutant #5.1 reacted with this pig serum as did the band of the parent strain migrating at the same position, while the additional band of the core-lipid A region of mutant #5.1 did not react with

the same serum. All the mutants were kanamycin resistant and ampicillin sensitive, indicating they resulted from a transposition event and not from a plasmid co-integration event.

Electron microscopy of thin sections of bacterial cells stabilized with a mouse monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* capsular antigen and stained with ruthenium red revealed the presence of capsular material surrounding cells of *A. pleuropneumoniae* parent strain and all LPS mutants, indicating that synthesis of capsular material was not altered in any of the LPS mutants described in this work (data not shown).

**PCR amplification and Southern hybridization.** The amplification of the transposon was made by PCR using the transposon-specific primers. All mutants showed the expected 836 bp product and thus carried the mini-Tn10 (Fig. 4). Chromosomal DNA from each LPS mutants was digested with *Xho*I (which cuts the transposon at a single site) and analyzed by Southern blotting with specific DIG-labelled probe to assess the number of copies of the transposon present. All the mutants carried a single insertion of the mini-Tn10 (Fig. 5), and the insertion was mapped to different sites as shown by different fragments size. However, a similar profile was seen for mutants #1.1 and #15.1 (Fig. 5, lanes 1 and 3), and mutants #24.1 and #36.1 (Fig. 5, lanes 4 and 6).

**Serum resistance.** The parent strain 4074 NaI<sup>r</sup> and the LPS mutants were examined for survival in 90% normal pig serum. The parent strain was serum-resistant and multiplied in the serum during the period of incubation (Table 1). Mutants #1.1, #15.1, #27.1 and #44.1 survived for at least 2 h and subsequently decreased in numbers, but were not completely eliminated after 3 h of incubation. Mutant #51.1 rapidly decreased in numbers, but was not

completely killed. Normal pig serum was bactericidal for mutants #5.1, #24.1 and #36.1. The killing by serum appeared to be complement-mediated, since inactivation of complement by heating prior to bacterial inoculation permitted bacterial survival (data not shown).

**Adherence assay.** The adherence of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI<sup>r</sup>, the seven mutants with rough LPS lacking O-chains and of the mutant with modified core-lipid A region to piglet tracheal frozen sections was evaluated. After 2 h of incubation, the parent strain and the mutant #51.1 adhered similarly, the average number of bacterial cells adhered to tracheal sections was 138 and 133, respectively (Table 1). For LPS mutants #1.1, #15.1, #24.1, #27.1, #36.1 and #44.1, the average number of adherent bacterial cells was increased. Interestingly, for LPS mutant #5.1 with a modified core-lipid A region, the average number of adherent bacterial cells was significantly decreased to 86 (Table 1).

**Identification of the gene affected by mini-Tn10 in the LPS mutant #5.1.** The gene affected by mini-Tn10 in the LPS mutant #5.1 showing a decreased adherence to porcine tracheal cells was amplified and identified by DNA sequencing. Computer analysis identified two open reading frames, ORF1, spanning bp 53 to 937, and ORF2, in opposite direction, spanning bp 975 to 1490 (Fig. 6). The deduced amino acid sequence from the nucleotide sequence of ORF1 was analyzed through the National Center for Biotechnology Information (NCBI) with the BLAST program and was found to be similar to UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Haemophilus influenzae* (83 % identity in a stretch of 295 amino acids) and *E. coli* (75 % identity in a stretch of 165 amino acids) encoded by the *galU* gene. The second ORF shows no similarity to any known gene. Nucleotide sequence analysis demonstrated



that the mini-Tn10 insertion was located 16 bp upstream of the Shine-Delgarno sequence of ORF1 (Fig. 6). This suggests that the mini-Tn10 might be located within the *galU* promoter region thus having a direct or a polar effect by blocking the transcription of *galU*. In addition, the nucleotide sequence reveals that *galU* is followed by a cononical termination of the transcription sequence 11 bp downstream the stop codon (Fig. 6).

**Virulence of LPS mutants.** The virulence of the mutants was evaluated in mice, an economic animal model. After challenge with the parent strain 4074 Nal<sup>r</sup> and LPS mutant #1.1, 80% mortality was observed. After challenge with LPS mutants #24.1, #27.1 and #51.1, the percentages of mortality were 60-70%, while after challenge with the LPS mutants #5.1, #15.1, #36.1 and #44.1, 10-40% mortality was recorded (Table 1).

The virulence of LPS mutant #5.1 and the parent strain 4074 Nal<sup>r</sup> was evaluated in pigs. After challenge with mutant #5.1, no mortality was recorded, while after challenge with the parent strain 4074 Nal<sup>r</sup>, the percentage of mortality was 75 % (Table 2). A necropsy was done on every pigs, with particular attention to the lungs lesions. Upon macroscopic examination, fibrino-hemorrhagic pleuropneumonia, compatible with *A. pleuropneumoniae* infection (11) was observed in all pigs infected with parent strain and only in 50 % pigs infected with mutant #5.1. The control pigs infected with the parent strain 4074 Nal<sup>r</sup> showed more extensive lesions than those infected with mutant #5.1 (Table 2). *A. pleuropneumoniae* was isolated from the lungs of pigs with lesions, and from the tonsils of all animals.

## DISCUSSION

Several pieces of evidence indicated that LPS is involved in adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells and mucus (4, 5, 18, 31). Using isogenic mutants, we now provide additional evidence that LPS is an adhesin of *A. pleuropneumoniae* as well as an important virulence factor.

Following mini-Tn10 mutagenesis, 7 rough mutants that did not express high-molecular-mass LPS bands and did not react with the monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen were identified. One mutant showing an additional band in the core-lipid A region was also identified. This additional band did not react with the serum from pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae*. These results suggest that the additional band is an incomplete core, which is compatible with a faster migration on Tricine SDS-PAGE gels and absence of the epitopes recognized by the pig antiserum.

The majority of LPS mutants were less virulent than the parent strain, as assessed in experimental infections of mice, demonstrating that LPS is important in the virulence of *A. pleuropneumoniae*. Similar results have been reported with mutants of *Salmonella* and *Pseudomonas* defective in LPS biosynthesis (12, 25, 42).

In order to get further insight in the role of LPS in virulence of *A. pleuropneumoniae*, we have examined serum resistance properties of the LPS mutants and compared them to the parent strain. Although well encapsulated, all LPS mutants were sensitive or partially sensitive to normal pig serum but not the parent strain, suggesting that the LPS may protect the cells from serum-

mediated killing by sterically preventing access of the complement to the outer membrane, as reported for other gram-negative bacteria (8, 15, 35).

We have shown that LPS are the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to porcine respiratory tract cells (4, 5, 18). More recently, we demonstrated that the active component of LPS was not lipid A but the polysaccharides (31). The adherence of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI<sup>r</sup> and of the LPS mutants was then evaluated. The mutants with rough LPS lacking O-antigen adhered similarly or even in greater numbers than the parent strain suggesting that the presence of O-antigen might even mask important core residues. For mutant deficient in core-lipid A biosynthesis, the average number of adherent bacterial cells was significantly decreased. These observations confirm the role of *A. pleuropneumoniae* LPS in adherence. Moreover the results specify that the O-antigen is not essential for adherence, while an intact core-lipid A region seems to be required for adherence to porcine respiratory tract cells. Interestingly, similar results with LPS-core mutant of *Neisseria gonorrhoeae* have been reported (41). In this study, it was shown that a mutation in *rfaF* (*waaF*), which blocked LPS-core biosynthesis, adhered poorly to Chang epithelial cells in contrast to the parent strain which showed strong adhesion. In addition, one LPS-core mutant of *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-pmm) showed a reduced ability to adhere to primary cultures of human respiratory epithelial cells derived from nasal polyps, to transformed tracheal epithelial cells, or to mouse L4 adenoma cells compared with the parent strain (42). This mutant, an *algC* mutant, lacked the phosphomannomutase gene, resulting in a defective LPS core, lack of O-antigen and inability to synthesize alginate. The core-lipid A region of this *algC* mutant showed, on SDS-PAGE, faster migration than the parent strain (6, 42). Pier et al. (33), using purified LPS from another *algC* mutant of *P.*

*aeruginosa* (PAC 1R *algC* :: tet), showed that the complete LPS outer core is an important bacterial ligand involved in the ingestion by airway epithelial cells expressing wild-type CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

Because the LPS mutant #5.1 with a modified core-lipid A region showed a decreased adherence to porcine tracheal cells, it was further characterized. Nucleotide sequence analysis of LPS mutant #5.1 indicated that the transposon insertion was located within or downstream the promoter region of the *galU* gene, the structural gene for UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (46), thus affecting transcription of *galU*. This enzyme is involved in the synthesis of UDP-glucose. Our phenotypic analyses showed that the *A. pleuropneumoniae* LPS-core mutant #5.1 produced a core-lipid A region that migrated with the same mobility as the parent strain and exhibited an additional band with a faster migration. We interpret this faster migration material as truncated core-lipid A, due to the mutation in *galU*. Similar results were found with *galU* mutants in *Shigella flexneri* and *H. Influenzae* (16, 39). The reason why LPS mutant #5.1 also synthesized to some extent full sized core-lipid A can be explained by either that the Tn10 insertion only partially inhibited transcription of *galU* or by a potential bypass pathway for biosynthesis of UDP-glucose (24). Therefore, the additional band may represent truncated core-lipid A molecules, while the upper band may be composed of the complete core-lipid A region linked to one O-antigen repeating unit although it was not recognized by monoclonal antibody 5.1 G8F10. It has been observed previously with *P. aeruginosa* that monoclonal antibodies specific for O-antigen do not necessarily recognize core with one O-antigen unit attached (22). The presence of truncated as well as complete core-

lipid A molecules could explain the partial reduction (38 %) of adherence of the LPS mutant #5.1.

Finally, *A. pleuropneumoniae galU* mutant #5.1 was markedly less virulent in pigs than the parent strain. Interestingly, the *H. influenzae galU* mutants were 100-1000 fold less virulent than their parent strain (16). The *S. flexneri galU* mutant also were less virulent than their parent strain (39).

In summary, our results indicate that one *A. pleuropneumoniae* LPS mutant, the *galU* mutant #5.1, adhered significantly less than the parent strain while rough mutants adhered similarly or in greater numbers than the parent strain. In addition, the LPS mutants were less virulent in mice and more sensitive to the bactericidal activity of pig serum than the parent strain. Taken together our observations confirm the idea that LPS is an important virulence factor of *A. pleuropneumoniae* and play a role in adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells. Our data also suggest that although the presence of O-antigens does not appear to be essential, an intact core-lipid A region is required for adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells. In the view of the large diversity of RTX toxins in *A. pleuropneumoniae* (13) and their suggested interaction with LPS (7), one can speculate that virulence of LPS in *A. pleuropneumoniae* is multifactorial involving adherence, serum resistance and toxicity in synergy with other toxins.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (OGP0003428) to M. J. and from the Swiss National Science Foundation (3100.39123.93) to J. F. S. R. is the recipient of a studentship from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, and from Centre de Coopération Interuniversitaire Franco-Québécoise. We are grateful to Bernadette Foiry for performing the electron microscopy, and to Dominique Dugourd, Céline Forget, and Rolf Kuhn for advice.

## REFERENCES

1. Archambault, M., M. Olivier, B. Foiry, M. S. Diarra, S.-É. Paradis, and M. Jacques. 1997. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.* **4**:53-65.
2. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1990. Current protocols in molecular biology. Wiley Interscience, New York.
3. Bélanger, M., C. Bégin, and M. Jacques. 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**:656-662.
4. Bélanger, M., D. Dubreuil, J. Harel, C. Girard, and M. Jacques. 1990. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* **58**:3523-3530.
5. Bélanger, M., S. Rioux, B. Foiry, and M. Jacques. 1992. Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**:119-126.
6. Coyne, M. J. Jr., K. S. Russell, C. L. Coyle, and J. B. Goldberg. 1994. The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of a complete lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* **176**:3500-3507.

7. **Czuprinsky, C. J., and R. A. Welch.** 1995. Biological effects of RTX toxins: the possible role of lipopolysaccharide. *Trends Microbiol.* **3**:480-483.
8. **Dasgupta, T., T. R. de Kievit, H. Masoud, E. Altman, J. C. Richards, I. Sadovskaya, D. P. Speert, and J. S. Lam.** 1994. Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes 03, 05, and 06. *Infect. Immun.* **62**:809-817.
9. **de Lorenzo, V., and K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386-405.
10. **Devereux, J., P. Haerberli, and O. Smithies.** 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12**:387-395.
11. **Dungworth, D. L.** 1993. The respiratory system, p. 539-699. *In* K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy, and N. Palmer (ed.), *Pathology of domestic animals*, 4th ed. Academic press Inc, San Diego.
12. **Finlay, B. B., M. N. Starnbach, C. L. Francis, B. A. D. Stocker, S. Chatfield, G. Dougan, and S. Falkow.** 1988. Identification and characterization of Tn $phoA$  mutants of *Salmonella* that are unable to pass through a polarized MDCK epithelial cell monolayer. *Mol. Microbiol.* **2**:757-766.
13. **Frey, J.** 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* **3**:257-261.



14. **Hitchcock, P. J., L. Leive, P. H. Mäkelä, E. T. Rietschel, W. Strittmatter, and D. C. Morrison.** 1986. Lipopolysaccharide nomenclature: past, present, and future. *J. Bacteriol.* **166**:699-705.
15. **Hong, M., and S. M. Payne.** 1997. Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Mol. Microbiol.* **24**:779-791.
16. **Hood, D. W., M. E. Deadman, T. Allen, H. Masoud, A. Martin, J. R. Brisson, R. Fleischmann, J. C. Venter, J. C. Richards, and E. R. Moxon.** 1996. Use of the complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **22**:951-965.
17. **Inzana, T. J.** 1991. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Pathogen.* **11**:305-316.
18. **Jacques, M.** 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **4**:408-410.
19. **Jacques, M., B. Foiry, R. Higgins, and K. R. Mittal.** 1988. Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.* **170**:3314-3318.
20. **Jacques, M., and M. Gottschalk.** 1997. Use of monoclonal antibodies to visualize capsular material of bacterial pathogens by conventional electron microscopy. *Microsc. Microanal.* **3**:234-238.

21. **Lairini, K., E. Stenbaek, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 1995. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.* **46**:369-381.
22. **Lam, J. S., M. Y. C. Handelsman, T. R. Chivers, and L. A. MacDonald.** 1992. Monoclonal antibodies as probes to examine serotype-specific and cross-reactive epitopes of lipopolysaccharides from serotype O2, O5, and O16 of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **174**:2178-2184.
23. **Lesse, A. J., A. A. Campagnari, W. E. Bittner, and M. A. Apicella.** 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine - sodium dodecyl sulfate - polyarylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods* **126**:109-117.
24. **Lin, E. C. C.** 1996. Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxylates, p. 307-342. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, vol. 1. 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
25. **Miller, I., D. Maskell, C. Hormaeche, K. Johnson, D. Pickard, and G. Dougan.** 1989. Isolation of orally attenuated *Salmonella typhimurium* following *TnphoA* mutagenesis. *Infect. Immun.* **57**:2758-2763.
26. **Mittal, K. R.** 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* **32**:135-148.

27. **Nicolet, J.** 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, p. 401-408. In A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (ed.), Diseases of swine, 7th ed. Iowa State University Press, Ames.
28. **Nielsen, R.** 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. Acta Vet. Scand. **27**:453-455.
29. **Nikaido, H.** 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium* transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. Biochim. Biophys. Acta. **433**:118-132.
30. **Novák, J., L. Novak, G. R. Shah, W. A. Woodruff, and P. W. Caufield.** 1997. Transposon mutagenesis: cloning of chromosomal DNA from the site of Tn916 insertion using polymerase chain reaction. Biotechnol. Techniques. **11**:51-54.
31. **Paradis, S.-É., D. Dubreuil, S. Rioux, and M. Jacques.** 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. Infect. Immun. **62**:3311-3319.
32. **Paulsen, I. T., A. M. Beness, and M. H. Saier, Jr.** 1997. Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. Microbiology **143**:2685-2699.
33. **Pier, G. B., M. Grout, T. S. Zaidi, J. C. Olsen, L. G. Johnson, J. R. Yankaskas et J. B. Goldberg.** 1996. Role of mutant CFTR in

- hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* **271**:64-67.
34. **Pitcher D. G., N. A. Saunders, and R. J. Owen.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**:151-156.
35. **Porat, R., R. Mosseri, E. Kaplan, M. A. Johns, and S. Shibolet.** 1992. Distribution of polysaccharide side chains of LPS determines resistance of *Escherichia coli* to the bactericidal activity of serum. *J. Infect. Dis.* **165**:953-956.
36. **Raetz, C. R .H.** 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles, p. 1035-1063. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, vol. 1. 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
37. **Reeves, P. R., M. Hobbs, M. A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C. R. H. Raetz, and P. D. Rick.** 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**:495-503.
38. **Rioux, S., C. Bégin, J. D. Dubreuil, and M. Jacques.** 1997. Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr. Microbiol.* **35**:139-144.

39. Sandlin, R. C., K. A. Lampel, S. P. Keasler, M. B. Goldberg, A. L. Stolzer, and A. T. Maurelli. 1995. Avirulence of rough mutants of *Shigella flexneri*: requirement of O antigen for correct unipolar localization of IcsA in the bacterial outer membrane. *Infect. Immun.* **63**:229-237.
40. Schnaitman C. A., and J. D. Klena. 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:655-682.
41. Schwan, E. T., B. D. Robertson, H. Brade, and J. P. M. van Putten. 1995. Gonococcal *rfaF* mutants express Rd<sub>2</sub> chemotype LPS and do not enter epithelial host cells. *Mol. Microbiol.* **15**:267-275.
42. Tang, H. B., E. DiMango, R. Bryan, M. Gambello, B. H. Iglewski, J. B. Goldberg, and A. Prince. 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun.* **64**:37-43.
43. Tascón, R. I., E. F. Rodríguez-Ferri, C. B. Gutiérrez-Martín, I. Rodríguez-Barbosa, P. Berche, and J. A. Vázquez-Boland. 1993. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. *J. Bacteriol.* **175**:5717-5722.
44. Tascón, R. I., J. A. Vázquez-Boland, C. B. Gutiérrez-Martín, J. I. Rodríguez-Barbosa, and E. F. Rodríguez-Ferri. 1996. Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiología SEM.* **12**:171-184.

45. **Ward, C. K., and T. J. Inzana.** 1994. Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **153**:2110-2121.
46. **Weissborn, A. C., Q. Liu, M. K. Rumley, and E. P. Kennedy.** 1994. UTP: $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the *galU* gene and purification of the enzyme. *J. Bacteriol.* **176**:2611-2618.

Table 1. Adherence to piglet tracheal frozen sections, serum resistance and virulence in mice of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain 4074 Nal<sup>r</sup> and LPS mutants

Strain	Reactivity with mAb against O-antigen	Adherence <sup>a</sup>	Virulence in mice <sup>b</sup>			Serum resistance <sup>c</sup>		
			1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Parent strain	+	138 ± 57	80	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
#1.1	-	178 ± 78	80	> 100	> 100	> 100	> 100	43.5 ± 5.8
#15.1	-	192 ± 58 <sup>d</sup>	10	> 100	> 100	> 100	> 100	50.8 ± 23.3
#24.1	-	252 ± 70 <sup>d</sup>	70	94.6 ± 7.6	82.2 ± 1.6	82.2 ± 1.6	82.2 ± 1.6	8.7 ± 2.3
#27.1	-	313 ± 77 <sup>d</sup>	70	> 100	> 100	> 100	> 100	17.5 ± 2.7
#36.1	-	236 ± 140	40	> 100	79.7 ± 18.3	79.7 ± 18.3	79.7 ± 18.3	6.9 ± 3.5
#44.1	-	243 ± 149	30	> 100	> 100	> 100	> 100	63 ± 8.3
#51.1	-	133 ± 42	60	87.8 ± 0.4	81.3 ± 1.8	81.3 ± 1.8	81.3 ± 1.8	18.3 ± 7.1
#5.1	+	86 ± 38 <sup>d</sup>	20	83.5 ± 12.8	39.6 ± 25.8	39.6 ± 25.8	39.6 ± 25.8	7.2 ± 0.9

<sup>a</sup>Represents the number of bacterial cells attached to the tracheal epithelium determined at a magnification of X 1000. Values represent the average of four samples ± SD.

<sup>b</sup>Represents the % of mortality.

<sup>c</sup>Represents the percentage of viability of bacteria incubated with 90% normal pig serum for 1, 2, and 3 h. Percentage of viability is expressed as the mean ± SD of two experiments.

<sup>d</sup>Significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed between the adherence of LPS mutants and of the parent strain.

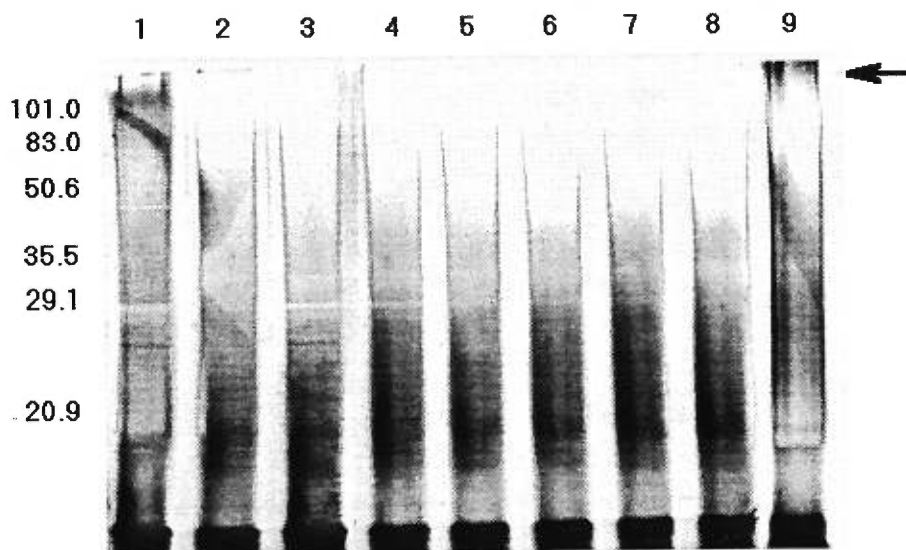
Table 2. Virulence in pigs of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain 4074 NaI<sup>r</sup> and LPS mutant #5.1

Strain	Number of pigs (n)	Mortality (%)	Fever (%) <sup>a</sup>	Dyspnea (%)	Pigs with lung lesions (%) <sup>b</sup>
Parent strain	4	75	100	75	100
LPS mutant #5.1	6	0	83	66	50

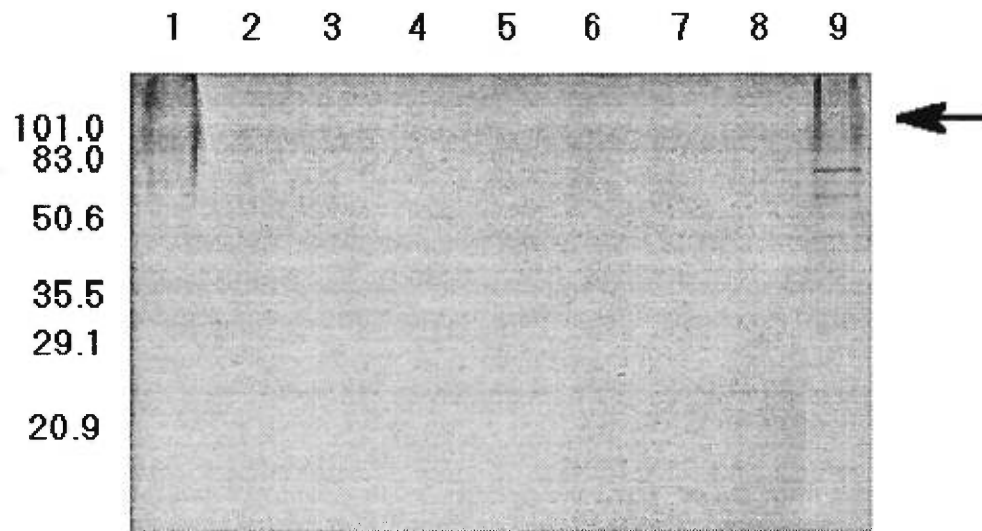
<sup>a</sup>T > 40°C.

<sup>b</sup>The more extensive lesions being present in pigs infected with the parent strain. Microscopic examination of the pulmonary lesions revealed changes compatible with porcine pleuropneumonia.

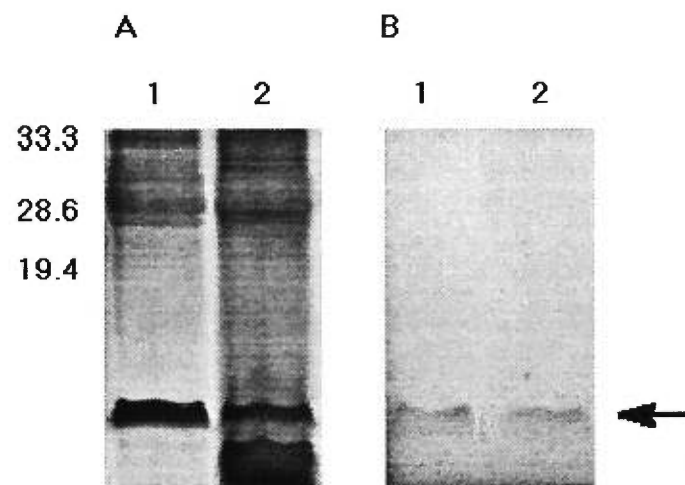




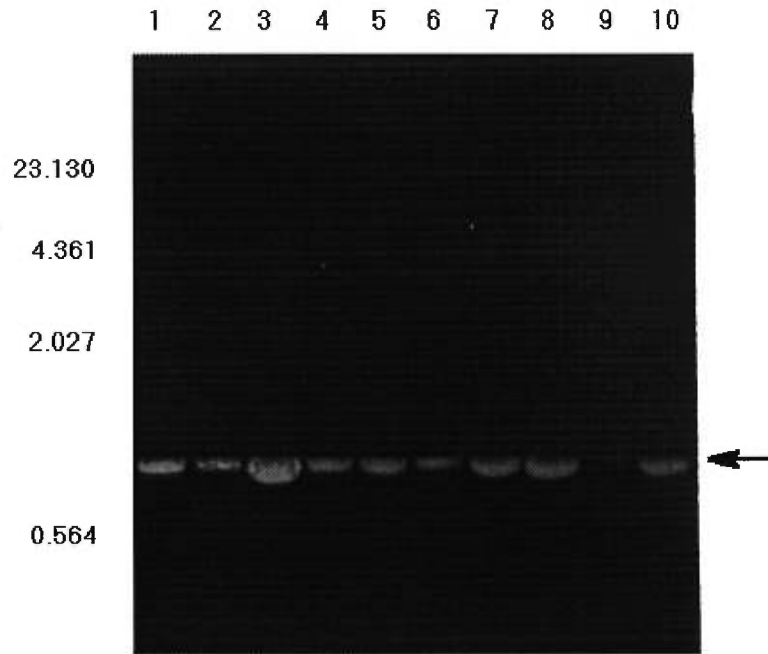
**FIG. 1.** Silver-stained SDS-PAGE profiles of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain (4074 NaI<sup>r</sup>) and LPS mutants. Lane 1, parent strain; lane 2, mutant #1.1; lane 3, mutant #15.1; lane 4, mutant #24.1; lane 5, mutant #27.1; lane 6, mutant #36.1; lane 7, mutant #44.1; lane 8, mutant #51.1; lane 9, mutant #5.1. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Arrow indicates the high-molecular-mass LPS absent in lanes 2 to 8.



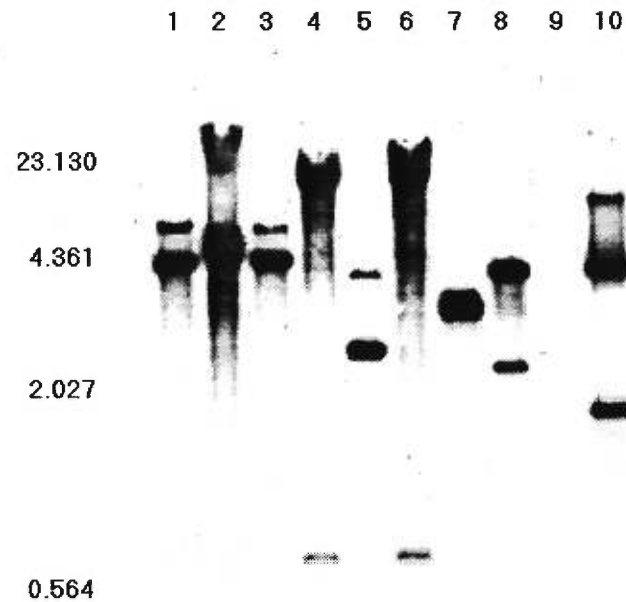
**FIG. 2.** Immunoblot of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain (4074 NaI<sup>r</sup>) and LPS mutants. The immunoblot was probed with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. Lane 1, parent strain; lane 2, mutant #1.1; lane 3, mutant #15.1; lane 4, mutant #24.1; lane 5, mutant #27.1; lane 6, mutant #36.1; lane 7, mutant #44.1; lane 8, mutant #51.1; lane 9, mutant #5.1. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Note the absence of reactivity of the antibody in lanes 2 to 8.



**FIG. 3.** Silver-stained Tricine-SDS-PAGE profiles (A) and immunoblot (B) of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI<sup>r</sup> (lane 1) and LPS mutant #5.1 (lane 2). The immunoblot was probed with an antiserum obtained from a pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae*. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Arrow indicates the core-lipid A region.



**FIG. 4.** Amplification of the mini-Tn10 transposon in all LPS mutants using standard PCR. Lane 1, mutant #1.1; lane 2, mutant #5.1; lane 3, mutant #15.1; lane 4, mutant #24.1; lane 5, mutant #27.1; lane 6, mutant #36.1; lane 7, mutant #44.1; lane 8, mutant #51.1; lane 9, parent strain 4074  $\text{Nal}^r$ ; lane 10, plasmid pLOF/Km. Molecular size standards (in kilobases) are indicated on the left. Arrow indicates the expected 836 bp amplification product.



**FIG. 5.** Random insertion of the Tn10 element in the *A. pleuropneumoniae* LPS mutants as determined by Southern blot analysis. Lane 1, mutant #1.1; lane 2, mutant #5.1; lane 3, mutant #15.1; lane 4, mutant #24.1; lane 5, mutant #27.1; lane 6, mutant #36.1; lane 7, mutant #44.1; lane 8, mutant #51.1; lane 9, parent strain 4074 NaI<sup>r</sup>; lane 10, plasmid pLOF/Km. Molecular size standards (in kilobases) are indicated on the left.

RBS                      *galU* →

```

1 CCAAAATCATTAGGGGATTCATCAGTGCTATGCACCTTGTAAAGGATTATGTAATGAAAGTAATTATTCGGGTAGC
76 GGGTTTAGGTACGCGAATGCTTCTTGCAACAAAAGCGATTCCAAAAGAAATGCTGACGATTGCGGATAAACCGCT
151 TATTCAATATATCGTGAACGAATGTGTAGCGGCTGGTATTAAAGAGATCGTATTAGTGACTCATTCTTCAAAAAA
226 TGCTATCGAAAACCATTTTGATACGTCTTTTGAACCTGAAACTATGTTGGAAAAACGTGTTAAACGCCAATTATT
301 AGAAGAAGTGCCTCAATTGTGCCAAAAGACGTTACATTAATGCATGTACGTCAAGGTCAAGCTAAAGGTTTAGG
376 TCATGCGGTATTATGCGGTAGAGCTGTAGTCGGTAACGAACCTTTTGCAGTCGTATTACCGGATGTAATTTTAGC
451 CGATTTTACTGCGAATCAAAAAACGAAAACCTTGCGGCGATGATTAAACGTTTCAACGAAACACACATAGCCA
526 AATTATGGTTGCACCGGTACCGAGAGAAGATGTCAGCAGCTATGGCGTAGCGGATTGTGACGGTGTGAAATTCC
601 GGCAGGTGAAACTGCAAAAATCGTGAAAATGGTTGAAAAACCGAGTGTAGAAGAAGCACCTTCTAATTTAGCGGT
676 TGTGGTTCGTTACGTATTCTCCGACGGTATTTGGGATTTATTAGAGAAAACACCGGTTGGTGTAGGCGATGAGAT
751 CCAATTAACCGATGCTATTGATATGTTAATTGAGCAAGAAACGGTAGAAGCATTTTATATGACAGGTCGTAATTT
826 CGACTGCGGCGATAAATTAGGTTATATGCAGGCATTTACCGAATATAGTTTACGTCATGATAAGTTCGGCAATAA
901 CTTTAAAGAATTTATTAATAAATAGCTAAAACGTTATTAACCAAGAATAACTAAGGACGCAATTAGCGTCCTTAT
976 ATTTTAGATAGTTTTCTTCCAACCTTCAATAGCCTTTTGGCATTTCATCTACGATATTCGGTTTCTTCCAAC
1051 TGCTGTTGCCACATTATTTTTTCGTTCTCATTAGCAGCATAGCTTTTTTCTAATAACCAACTAATTTTTTCATTT
1126 AATGCCCTTAATGCCTTACGATATTCATTTAATCGACGGGCGGGGGGAGGGCGTGAATGTTTTTTGGGAATGAA
1201 AAAGACGTAGTAAATACTTCTCTAGCAGATAAATCCGCTTTTTCAAGCATAAAAACGGCATGATTTAACGCATCA
1276 AACTGGCGAAGAAGTTTGGTGGCATAGAAATCGGCGTAATCTCCGTTGTTTGGTGAGAAAGCAACTGTGCCGTG
1351 TGTATTATCTCTTGTATAAAATCACTCACTTTTTTCTGATTTTGCGAAAAGAGATTTCTTTTCACGATAACTTCT
1426 TGCTCTAAAAAAGGAGAAAAATACCGTTAATTTTTGTTGAATAACTTGAAGGAAGTCTGAAAAATAGTTAATTAC
1501 ATTGTGTTTTTCTATATTATAGAATGGTTCGGAACAATTGTAATGCGTTATTTATGTTTAAAAAACAACATAAAA
1576 ATTTACTTTTTTCCGGAAATGTGATTTTCAGTCACAAAAAATGCTTTATGGGAAAAAGTTAATAAATATCAAGAA
1651 TTTAAGATAAAGTCATTATAATCAATATGTTACGAATTACCTAAAAATGGAGTATATAACCATTTTTTAAACGT
1726 TTATTGTTTTTTAAATCAAAAAACAATGTAACCATTTGTTTTTATTATGTTTTTGGTTTATTTCAAAGAGAGA
1801 GTTTACCTATTGACATAGATAAATGATTTTGCCATTATTCACCTCGCAATCAGCATTTACTTAAACTTCATAAGT

```

**FIG. 6.** Nucleotide sequence of the region containing the *A. pleuropneumoniae galU* (bp 53 to 937) and ORF2 (bp 975 to 1490) genes. The sequence was determined from LPS mutant #5.1. The end of the mini-Tn10 is boxed and the start codons are underlined. The Shine-Delgarno sequence (RBS) for *galU* is underlined and the putative stop codons shown in bold type. The arrows indicate the putative termination sequence.

#### **IV. DISCUSSION**

La première étape dans la pathogenèse de plusieurs bactéries responsables d'infections pulmonaires est probablement l'établissement du micro-organisme au niveau des voies respiratoires supérieures. L'adhérence est une interaction complexe entre le micro-organisme pathogène et la cellule cible et permet à cette bactérie, une fois en contact avec le tissu animal, de se reproduire et d'exercer ses effets pathogéniques sur l'hôte par l'élaboration de différentes molécules toxiques (Cundell et Tuomanen, 1995). La pathogénie de la pleuropneumonie porcine n'est pas bien comprise, cependant notre laboratoire a démontré que le lipopolysaccharide (LPS) était impliqué dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcine (Bélangier et coll., 1990; Jacques, 1996; Paradis et coll., 1994).

Mon projet de doctorat consistait à étudier le rôle du LPS dans la virulence et l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules des voies respiratoires du porc. Pour atteindre ces principaux objectifs, nous avons eu recours à deux approches différentes. Premièrement, nous avons immunisé des souris (modèle animal) et des porcs (hôte naturel) avec les adhésines lipopolysaccharidiques d'*A. pleuropneumoniae* afin d'évaluer le rôle protecteur de cette molécule lorsqu'utilisée seule. Deuxièmement, l'obtention de mutants au niveau de la biosynthèse des LPS devrait permettre de confirmer leur rôle dans la pathogénie et d'identifier la région de cette molécule complexe responsable de l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules des voies respiratoires du porc.

La vaccination de l'animal avec une bactérie tuée (ou bactérine) produit peu ou pas d'anticorps dirigés contre le LPS d'*A. pleuropneumoniae*. Pourtant, les porcs ayant survécus à la maladie possèdent un très haut titre d'anticorps dirigés contre cette molécule (Fenwick et Osburn, 1986). De plus, une étude de



protection avec une préparation de la membrane externe démontre qu'une protection accrue est obtenue lorsque les porcs sont immunisés avec une préparation où les protéines ont été digérées à l'aide de la protéinase K (Chiang et coll., 1991). Ces informations suggèrent donc que la protection partielle induite par les vaccins commerciaux pourrait être due à l'absence d'un haut titre d'anticorps dirigés contre le LPS.

Paradis et coll. (1994) ont observé que la partie lipidique du LPS n'était pas responsable de l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* mais, qu'au contraire, la partie polysaccharidique était responsable de son adhérence aux cellules des voies respiratoires du porc. Cette observation suggérait que l'immunisation des animaux avec une préparation vaccinale contenant la partie polysaccharidique du LPS pourrait résulter en une protection importante de l'animal sans pour autant que celui-ci soit confronté à la toxicité associée au lipide A (Fenwick et Osburn, 1986; Fenwick et coll., 1986b; Udeze et coll., 1987). Cela suggérait également que les mutants désirés devraient être altérés au niveau des polysaccharides du LPS.

Les polysaccharides obtenus après l'hydrolyse acide des LPS, étant des antigènes T-indépendants (Dick et Beurret, 1989), ont été couplés chimiquement à une protéine fortement immunogène, l'albumine bovine sérique (ABS). Le conjugué O-polysaccharide-ABS est un antigène T-dépendant qui devrait permettre une réponse humorale et cellulaire dirigée contre les polysaccharides. Ce type de conjugué, c'est-à-dire des polysaccharides couplés à une protéine, a déjà été utilisé dans des vaccins contre d'autres bactéries pathogènes, soit *Escherichia coli* (Konadu et coll., 1994), *Haemophilus influenzae* (Gu et coll., 1996), *Shigella dysenteriae* (Chu et coll., 1991) et *Vibrio cholerae* (Gupta et coll., 1992).

En plus d'évaluer l'effet protecteur du conjugué O-polysaccharide-ABS, nous voulions comparer différentes préparations de LPS et de ses composantes qui pourraient résulter en une protection. Ainsi, nous avons immunisé des souris avec les préparations suivantes: le LPS complet (antigène O-noyau oligosaccharidique-lipide A), le LPS détoxiqué (antigène O-noyau oligosaccharidique), le LPS de faible poids moléculaire (noyau oligosaccharidique-lipide A) et le conjugué O-polysaccharide-ABS. Pour permettre une meilleure réponse immunitaire, nous avons mélangé ces différentes préparations vaccinales à un adjuvant (l'hydroxyde d'aluminium ou le Quil A). Nous avons observé une bonne protection avec le conjugué O-polysaccharide-ABS mélangé au Quil A. Cependant, comme la protection obtenue n'était pas optimale, nous avons répété certaines immunisations qui nous ont permis de déterminer si la protection homologue (sérotypé 1) ou hétérologue (sérotypé 5) pouvait être augmentée par l'addition de différents adjuvants. Les adjuvants choisis appartenaient aux différentes classes connues, les adjuvants 'huileux' [incomplet de Freund, huile végétale (huile d'arachide), une émulsion eau-huile (E/H), les systèmes RIBI et TiterMax], les composés minéraux (l'hydroxyde d'aluminium) et les saponines, c'est-à-dire le Quil A. Ces adjuvants devraient permettre de stimuler la réponse humorale et/ou cellulaire chez l'animal. Par exemple, l'adjuvant incomplet de Freund permet de stimuler la réponse humorale; le Quil A, le système RIBI et l'hydroxyde d'aluminium stimulent les deux types de réponses immunitaires, tandis que le système TiterMax permet de stimuler la formation d'anticorps IgG2a et IgG2b (Edelman, 1980; Johnson, 1994). Nos résultats indiquent que plusieurs préparations de LPS, particulièrement le conjugué O-polysaccharide-ABS mélangé au Quil A et le LPS détoxiqué mélangé à l'émulsion eau-huile pouvaient induire une bonne protection homologue chez la souris.

Malheureusement, aucune des différentes préparations testées n'a induite une protection hétérologue, c'est-à-dire une protection contre la souche de sérotype 5. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les sérotypes 1 et 5 possèdent un antigène O de composition et de structure différentes (Perry et coll., 1990). Ce résultat peut également s'expliquer par le fait que les sérotypes 1 et 5 ne possèdent pas le même type de noyau oligosaccharidique comme démontré récemment par notre équipe (annexe # 1, p. XX). De fait, nous avons démontré que les souches représentant les 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* pouvaient être divisées en deux groupes selon la mobilité sur gel de polyacrylamide de la région noyau oligosaccharidique-lipide A de leurs LPS. Le sérotype 1 appartient au premier type électrophorétique (type I) migrant plus lentement que le LPS de *Salmonella typhimurium* Ra, tandis que le sérotype 5 appartient au second type électrophorétique (type II) qui a une migration similaire au LPS de *S. typhimurium* Ra. De plus, ces deux types électrophorétiques sont antigéniquement différents. Il est donc possible que les préparations vaccinales testées puissent induire une certaine protection hétérologue contre un sérotype ayant un même type de noyau oligosaccharidique-lipide A que le sérotype 1.

Par la suite nous voulions vérifier si les combinaisons 'antigène- adjuvant' qui semblaient les plus prometteuses chez la souris, c'est-à-dire le LPS détoxiqué utilisé avec l'adjuvant eau-huile et le conjugué O-polysaccharide-ABS mélangé au Quil A, pouvaient aussi induire une protection homologue chez le porc. Des groupes de porcs SPF ont donc été vaccinés avec ces préparations. Suite à l'infection avec une souche virulente d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1, nous avons suivi et comparé, entre autres, la mortalité, la présence et l'étendue des lésions pulmonaires entre les groupes. Nous avons observé que toutes les préparations testées, incluant le vaccin

commercial, n'empêchaient pas les animaux d'être porteurs du micro-organisme; chez la majorité des porcs la souche d'*A. pleuropneumoniae* utilisée pour le challenge a été réisolée au niveau des amygdales. Nous avons également observé que la préparation contenant le LPS détoxiqué induit une bonne protection, similaire à celle obtenue avec une préparation commerciale. Cependant, le conjugué O-polysaccharide-ABS qui protégeait les souris, ne protège aucunement les porcs. Nos résultats indiquent donc qu'il n'y a pas de concordance entre l'efficacité vaccinale déterminée chez la souris et le porc, suggérant que la souris n'est peut-être pas un modèle approprié pour évaluer l'efficacité d'un vaccin contre la pleuropneumonie porcine. Cela suggère, jusqu'à la découverte d'un nouveau modèle animal, que le porc devrait être le seul animal utilisé pour des études d'immunoprotection contre *A. pleuropneumoniae*. Le fait que l'injection d'une seule molécule (le LPS) semble aussi efficace que la bactérie entière, confirme notre hypothèse concernant le rôle important joué par les LPS dans la pathogénie et la protection contre les infections causées par *A. pleuropneumoniae*.

Les résultats obtenus chez la souris nous indiquent que les anticorps dirigés contre les LPS ne sont pas un bon indicateur de protection, ce qui suggère que la protection observée pourrait être reliée à la réponse cellulaire. La réponse cellulaire devrait donc être évaluée lors d'études ultérieures de protection, ce qui permettrait de mieux comprendre le mécanisme de protection.

Des travaux futurs où des doses plus grandes de sucres seraient utilisées devraient permettre d'améliorer l'efficacité du vaccin chez le porc. Dans cette étude, une dose de 200 µg a été utilisée chez le porc. De plus, l'essai d'immunoprotection avec le LPS détoxiqué mélangé à d'autres adjuvants ou à

un mélange de ceux-ci pourrait aussi résulter en une meilleure protection. Etant donné que nous avons démontré que le noyau oligosaccharidique est impliqué dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* (article # 4, p. 75), un conjugué pourrait être fait plus spécifiquement à partir du noyau oligosaccharidique au lieu des longues chaînes d'antigène O composant le LPS. D'autant plus que nous avons démontré que l'antigène O n'est pas impliqué dans l'adhérence [articles #3 (p. 68) et #4 (p. 75)]. Ce type de conjugué pourrait peut-être protéger l'animal contre une infection d'*A. pleuropneumoniae*. En plus, l'immunisation avec un mélange de deux conjugués LPS où les deux types de noyau oligosaccharidique seraient représentés pourrait résulter en une protection hétérologue. L'un des conjugués pourrait contenir le LPS du sérotype 1 et l'autre le LPS du sérotype 5. Finalement, au lieu de conjuguer les sucres à l'albumine bovine sérique, ils pourraient être conjugués à l'une des toxines Apx ou à d'autres facteurs de virulence importants d'*A. pleuropneumoniae*.

Le deuxième objectif de ce projet était d'obtenir des mutants d'*A. pleuropneumoniae* au niveau de la biosynthèse des LPS afin de confirmer leur rôle dans la pathogénie et d'identifier la région du LPS responsable de l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae*. Dans un premier temps, nous avons obtenu des mutants spontanés de la souche de référence d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Les deux mutants obtenus possédaient, tel qu'observé sur gels de polyacrylamide, des LPS montrant un profil électrophorétique rugueux, c'est-à-dire des LPS qui ne possèdent pas d'antigène O. De plus, un des mutants possédait un noyau oligosaccharidique qui migrerait plus rapidement que celui de la souche mère. La caractéristique de ces mutants qui nous intéressait plus particulièrement était leur adhérence aux cellules de trachée de porc. Nos résultats indiquent que le mutant ayant la

région noyau oligosaccharidique-lipide A du LPS avec une mobilité identique à celle de la souche mère adhéraient moins, tandis que l'autre adhéraient de la même façon que la souche mère. Ce résultat suggère que l'antigène O n'est pas impliqué dans l'adhérence puisque ces mutants spontanés dont le LPS est rugueux adhèrent différemment. Etant donné que ces mutants ne pouvaient pas être caractérisés génétiquement et qu'une mutation dans un autre facteur de virulence ne pouvait être exclue, nous avons obtenu des mutants isogéniques grâce à un système de mutagenèse par transposition. Huit souches d'*A. pleuropneumoniae* mutées au niveau de la biosynthèse des LPS ont été obtenues. Sept de ces souches étaient mutées au niveau de la biosynthèse de l'antigène O, tandis qu'une seule était mutée au niveau du noyau oligosaccharidique. Ces mutants ont permis de confirmer les résultats obtenus avec les mutants spontanés, c'est-à-dire que les mutants rugueux adhéraient de façon similaire ou en plus grand nombre que la souche mère, tandis que le mutant ayant une bande additionnelle dans la région du noyau oligosaccharidique-lipide A adhéraient significativement moins que la souche mère. Globalement, nos résultats indiquent que l'antigène O ne semble pas responsable de l'adhérence tandis que le noyau oligosaccharidique-lipide A semble être la partie impliquée dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcin. De plus, l'augmentation de l'adhérence des mutants possédant des LPS rugueux peut être due à une meilleure exposition de l'adhésine, c'est-à-dire le noyau oligosaccharidiques, à la surface bactérienne. Etant donné que nous savons que le noyau oligosaccharidique est responsable de l'adhérence d'*A. Pleuropneumoniae* (article #4, p. 75), un essai de protection passive utilisant des anticorps dirigés contre cette région pourrait être élaboré.

Par la suite, nous voulions démontrer si, comme des mutants LPS de *Salmonella* et *Pseudomonas* (Finlay et coll., 1988; Miller et coll., 1989; Tang et coll., 1996), nos mutants isogéniques et spontanés étaient moins virulents chez la souris. Les résultats obtenus indiquent que les mutants LPS étaient beaucoup moins virulents, confirmant que le LPS est un facteur de virulence important d'*A. pleuropneumoniae*. En plus, le mutant au niveau du noyau oligosaccharidique était beaucoup moins virulent chez le porc, cependant des études ultérieures permettant de déterminer la virulence des autres mutants chez le porc devront être faites.

Le LPS a aussi été associé à la résistance au sérum chez différentes bactéries Gram-négatif (Dasgueta et coll., 1994; Hong et coll., 1997; Porat et coll., 1992). Par conséquent, nous voulions déterminer si le LPS d'*A. pleuropneumoniae* pouvait être impliqué dans la résistance à l'activité bactéricide du sérum (Ward et Inzana, 1994). Après avoir incubé nos mutants avec du sérum normal de porc, nous avons observé que tous les mutants LPS testés étaient devenus sensibles ou partiellement sensibles au sérum comparativement à la souche mère. Ceci nous indiquait que le LPS était impliqué dans la résistance au sérum d'*A. pleuropneumoniae*, probablement en empêchant l'accès du complément à la membrane externe.

Etant donné que le mutant possédant une bande additionnelle dans la région du noyau oligosaccharidique-lipide A (mutant #5.1) adhérait moins que la souche mère, nous avons voulu identifier le gène qui était affecté suite à l'insertion du transposon. Après analyse de la séquence nucléotidique et de la séquence des acides aminés, nous avons déduit que le transposon était inséré dans la région promotrice du gène *galU*, le gène structural de l'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransférase. Ce gène est impliqué dans la biosynthèse de

l'UDP-glucose qui est utilisé lors de la synthèse du noyau oligosaccharidique externe chez d'autres bactéries (Hood et coll., 1996; Sandlin et coll., 1995). Ce qui suggère que notre mutant #5.1 soit aussi altéré au niveau du noyau oligosaccharidique externe. A notre connaissance, c'est le premier gène impliqué dans la biosynthèse des LPS d'*A. pleuropneumoniae* à être identifié. De plus, il serait intéressant de doser cette enzyme, c'est-à-dire l'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransférase, par une méthode biochimique basée sur le dosage du l'UDP-glucose marqué, qui a été produit à partir de l'UTP et du glucose-1-phosphate marqué au carbone 14 (Weissborn et coll., 1994). Nous pourrions ainsi comparer la quantité chez notre mutant par rapport à celle présente chez la souche mère.

La bande supérieure observée en gel de polyacrylamide chez ce mutant peut être le résultat des différentes voies utilisées par le micro-organisme pour obtenir l'UDP-glucose. Ce qui nous permet de proposer que la bande supérieure représente un noyau oligosaccharidique-lipide A complet tandis que la bande additionnelle représente un noyau oligosaccharidique-lipide A altéré. Etant donné que nous possédons la séquence nucléotidique du gène *galU* d'*A. pleuropneumoniae*, nous pourrions le cloner, le inactiver à l'aide d'un transposon, puis introduire le gène inactivé dans l'ADN génomique de la souche mère par un échange allélique afin d'observer sur gel de polyacrylamide le phénotype de la souche mère mutante. Cela nous permettrait de déterminer si l'insertion du transposon dans la région promotrice du mutant #5.1 était responsable du phénotype observé.

L'obtention de mutants additionnels d'*A. pleuropneumoniae* altérés plus spécifiquement au niveau de gènes impliqués dans la synthèse du noyau oligosaccharidique devrait permettre de confirmer que le noyau externe est



impliqué dans l'adhérence et, aussi, de déterminer quels sucres sont spécifiquement impliqués dans l'adhérence. De plus, un test de complémentation de la souche mutée au niveau du noyau oligosaccharidique avec le gène *galU* sauvage devrait confirmer que le gène *galU* est bien celui dans lequel est inséré le transposon. Un test d'inhibition sur coupes congelées utilisant des anticorps dirigés contre le noyau oligosaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* devrait également permettre de confirmer que le noyau oligosaccharidique est responsable de l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae*. Des tests d'adhérence utilisant également des coupes congelées pourraient être fait en utilisant du tissu pulmonaire, ce qui nous permettrait de déterminer que le noyau oligosaccharidique est responsable de l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux poumons. Les mutants possédant des LPS rugueux devront être caractérisés afin d'identifier les gènes impliqués. Ces mutants permettront une meilleure connaissance de la biosynthèse des LPS chez *A. pleuropneumoniae*.

## **V. CONCLUSION**

Ce travail apporte de nouvelles connaissances sur le rôle important joué par les LPS dans la pathogénie et la protection contre les infections causées par *A. pleuropneumoniae*. Ainsi, l'immunisation avec le conjugué O-polysaccharide-ABS mélangé avec le Quil A ou le LPS détoxiqué mélangé à une émulsion eau/huile ont induit une protection homologue chez la souris. Chez le porc, seulement le LPS détoxiqué mélangé également à une émulsion eau/huile a permis une telle protection. Etant donné que l'injection d'une seule molécule (le LPS détoxiqué) semble aussi efficace que la bactérie entière, ceci confirme notre hypothèse concernant le rôle important joué par les LPS dans la pathogénie et la protection contre les infections causées par *A. pleuropneumoniae*.

Enfin, les mutants obtenus nous ont permis de déterminer que le LPS est impliqué dans la virulence et la résistance à l'activité bactéricide du sérum. De plus, nous avons démontré que la région du noyau oligosaccharidique-lipide A semble être responsable de l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcin, tandis que l'antigène O ne serait pas impliqué dans cette adhérence. Ce projet a permis également d'identifier, chez l'un des mutants isogéniques, le gène *galU* impliqué dans la biosynthèse des LPS chez d'autres bactéries Gram-négatif. Les résultats du présent travail démontrent clairement que le LPS est un facteur de virulence important d'*A. pleuropneumoniae* et confirme que celui-ci est impliqué dans l'adhérence aux cellules des voies respiratoires de l'hôte.

## **VI. BIBLIOGRAPHIE**

- Altman, E., D. W. Griffith et M. B. Perry.** 1990. Structural studies of the O-chains of the lipopolysaccharides produced by strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Biochem. Cell Biol.* **68**:1268-1271.
- Anderson, M. S. et C. R. H. Raetz.** 1987. Biosynthesis of lipid A precursors *Escherichia coli*: a cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-*N*-acetylglucosamine to UDP-3-*O*-(*R*-3-hydroxymyristoyl)-*N*-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **262**:5159-5169.
- Anderson, M. S., H. S. Bull, S. M. Galloway, T. M. Kelly, S. Mohan, K. Radika et C. R. H. Raetz.** 1993. UDP-*N*-acetylglucosamine acyltransferase of *Escherichia coli*: the first step of endotoxin biosynthesis is thermodynamically unfavorable. *J. Biol. Chem.* **268**:19858-19865.
- Archambault, M., M. Olivier, B. Foiry, M. S. Diara, S.-É. Paradis, et M. Jacques.** 1997. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.* **4**:53-65.
- Bélanger, M., D. Dubreuil, J. Harel, C. Girard et M. Jacques.** 1990. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* **58**:3523-3530.
- Bélanger, M., S. Rioux, B. Foiry et M. Jacques.** 1992. Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **76**:119-126.
- Bélanger, M., D. Dubreuil et M. Jacques.** 1994. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **62**:868-873.
- Bélanger, M., C. Bégin et M. Jacques.** 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**:656-662.

- Beaudet, R., G. McSween, G. Boulay, P. Rousseau, J. G. Bisaillon, J. P. Descoteaux et R. Ruppanner.** 1994. Protection of mice and swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination. *Vet. Microbiol.* **39**:71-81.
- Bhatia, B., K. R. Mittal et J. Frey.** 1991. Factors involved in immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Vet. Microbiol.* **29**:147-158.
- Bossé, J. T., R. P. Johnson, M. Nemeč et S. Rosendal.** 1992. Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* **60**:479-484.
- Byrd, W. et S. Kadis.** 1989. Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect. Immun.* **57**:3901-3906.
- Byrd, W., B. G. Harmon et S. Kadis.** 1992. Protective efficacy of conjugate vaccines against experimental challenge with porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **34**:307-324.
- Byrd, W. et A. M. Hooke.** 1997a. Immunization with temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* induces protective hemolysin-neutralizing antibodies in mice. *Curr. Microbiol.* **34**:149-154.
- Byrd, W. et A. M. Hooke.** 1997b. Temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* induce protection in mice. *Infect. Immun.* **65**:2206-2210.
- Chang, Y.-F., J. Shi, S. J. Shin et D. H. Lein.** 1992. Sequence analysis of the ROB-1  $\beta$ -lactamase gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **32**:319-325.

- Chiang, Y. W., T. F. Young, V. J. Rapp-Gabrielson et R. F. Ross.** 1991. Improved protection of swine from pleuropneumonia by vaccination with proteinase K-treated outer membrane of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **27**:49-62.
- Chu, C., B. Liu, D. Watson, S. C. Szu, D. Bryla, J. Shiloach, R. Schneerson et J. B. Robbins.** 1991. Preparation, characterization, and immunogenicity of conjugates composed of the O-specific polysaccharide of *Shigella dysenteriae* type 1 bound to tetanus toxoid. *Infect. Immun.* **59**:4450-4458.
- Clementz, T., J. Bednarski et C. R. H. Raetz.** 1995. *Escherichia coli* genes encoding Kdo dependant acyltransferases that incorporate laurate and myristate into lipid A. *FASEB J.* **9**:A1311.
- Coleman, J. et C. R. H. Raetz.** 1988. First committed step of lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*: sequence of the *lpxA* gene. *J. Bacteriol.* **170**:1268-1274.
- Coleman, W. G., Jr.** 1983. The *rfaD* gene codes for ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase. *J. Biol. Chem.* **258**:1985-1990.
- Crowell, D. N., W. S. Reznikoff et C. R. H. Raetz.** 1987. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene for lipid A disaccharide synthase. *J. Bacteriol.* **169**:5727-5734.
- Crujisen, T., L. A. van Leengoed, M. Ham-Hoffies et J. H. Verheijden.** 1995. Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. *Infect. Immun.* **63**:2341-2343.
- Cullen, J. M. et A. N. Rycroft.** 1994. Phagocytosis by pig alveolar macrophages of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 mutant strains defective in haemolysin II (ApxII) and pleurotoxin (ApxIII). *Microbiology.* **140**:237-244.

- Cundell, D. R. et E. Tuomanen.** 1995. Attachment and interaction of bacteria at respiratory mucosal surfaces, p. 3-20. Dans J. A. Roth, C. A. Bolin, K. A. Brogden, F. C. Minion et M. J. Wannemuehler (éd.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens, 2<sup>ième</sup> éd. American Society fo Microbiology, Washington, D. C.
- Dasgupta, T., T. R. de Kievit, H. Masoud, E. Altman, J. C. Richards, I. Sadovskaya, D. P. Speert et J. S. Lam.** 1994. Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes 03, 05, and 06. *Infect. Immun.* **62**:809-817.
- Deneer, H. G. et A. A. Potter.** 1989a. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**:798-804.
- Deneer, H. G. et A. A. Potter.** 1989b. Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Microb. Pathog.* **6**:425-432.
- Devenish, J., S. Rosendal et J. T. Bossé.** 1990. Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **58**:3829-3832.
- Diarra, M. S., J. A. Dolence, E. K. Dolence, I. Darwish, M. J. Miller, F. Malouin et M. Jacques.** 1996. Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:853-859.
- Dick, W. E. Jr et M. Beurret.** 1989. Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens. A survey and consideration of design and preparation factors. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **10**:48-114.
- Edelman, R.** 1980. Vaccine adjuvants. *Rev. Infect. Dis.* **2**:370-383.



- Euzeby, J. P.** 1993. Le système immunitaire de l'appareil respiratoire du porc: revue bibliographique. *Rev. Méd. Vét.* **144**:665-681.
- Fedorka-Cray, P. J., M. J. Huether, D. L. Stine et G. A. Anderson.** 1990. Efficacy of a cell extract from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 1 against disease in swine. *Infect. Immun.* **58**:358-365.
- Fedorka-Cray, P. J., D. L. Stine, J. M. Greenwald, J. T. Gray, M. J. Huether et G. A. Anderson.** 1993. The importance of secreted virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacterin preparation: a comparison. *Vet. Microbiol.* **37**:85-100.
- Fenwick, B. W., J. S. Cullor, B. I. Osburn et H. J. Olander.** 1986a. Mechanisms involved in protection provided by immunization against core lipopolysaccharides of *Escherichia coli* J5 from lethal *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in swine. *Infect. Immun.* **53**:298-304.
- Fenwick, B. W. et S. Henry.** 1994. Porcine pleuropneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **204**:1334-1340.
- Fenwick, B. W. et B. I. Osburn.** 1986. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect. Immun.* **54**:575-582.
- Fenwick, B. W., B. I. Osburn et H. J. Olander.** 1986b. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **47**:1433-1441.
- Finlay, B. B., M. N. Starnbach, C. L. Francis, B. A. D. Stocker, S. Chatfield, G. Dougan et S. Falkow.** 1988. Identification and characterization of *TnphoA* mutants of *Salmonella* that are unable to pass

- through a polarized MDCK epithelial cell monolayer. *Mol. Microbiol.* **2**:757-766.
- Fodor L., J. Varga, E. Molnar et I. Hajtos.** 1989. Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. *Vet. Microbiol.* **20**:173-180.
- Frey, J., J. T. Bossé, Y.-F. Chang, J. M. Cullen, B. Fenwick, G. F. Gerlach, D. Gygi, F. Haesebrouck, T. J. Inzana, R. Jansen, E. M. Kamp, J. Macdonald, J. I. MacInnes, K. R. Mittal, J. Nicolet, A. N. Rycroft, R. P. A. M. Segers, M. A. Smits, E. Stenbaek, D. K. Struck, J. F. van den Bosch, P. J. Willson et R. Young.** 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., P. Kuhnert, L. Villiger et J. Nicolet.** 1996. Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins. *Res. Microbiol.* **147**:351-361.
- Frey, J., R. Kuhn, J. MacInnes et J. Nicolet.** 1997. Characterization of a novel RTX determinant in *Actinobacillus pleuropneumoniae* which is not expressed under culture conditions. *Dans Abstracts of the eighth European workshop conference on bacterial protein toxins.* Kloster Banz, Staffelstein, Allemagne.
- Fuller, T. E., B. J. Thacker et M. H. Mulks.** 1996. A riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is attenuated in swine. *Infect. Immun.* **64**:4659-4664.
- Furesz, S. E., B. A. Mallard, J. T. Bosse, S. Rosendal, B. N. Wilkie et J. I. MacInnes.** 1997. Antibody- and cell-mediated immune responses of

- Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected and bacterin-vaccinated pigs. Infect. Immun. **65**:358-365.
- Galloway, S. M. et C. R. H. Raetz.** 1990. A mutant of *Escherichia coli* defective in the first step of endotoxin biosynthesis. J. Biol. Chem. **265**:6394-6402.
- Gerlach, G.-F., C. Anderson, S. Klashinsky, A. Rossi-Campos, A. A. Potter et P. J. Willson.** 1993. Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Infect. Immun. **61**:565-572.
- Gilbride, K. A., S. Rosendal et J. L. Brunton.** 1989. Plasmid mediated antimicrobial resistance in Ontario isolates of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Can. J. Vet. Res. **53**:38-42.
- Gonzalez, G. C., D. L. Caamano et A. B. Schryvers.** 1990. Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mol. Microbiol. **4**:1173-1179.
- Gu, X.-X., C.-M. Tsai, T. Ueyama, S. J. Barenkamp, J. B. Robbins et D. J. Lim.** 1996. Synthesis, characterization, and immunologic properties of detoxified lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* conjugated to proteins. Infect. Immun. **64**:4047-4053.
- Gupta, R. K., S. C. Szu, R. A. Finkelstein et J. B. Robbins.** 1992. Synthesis, characterization, and some immunological properties of conjugates composed of the detoxified lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba bound to cholera toxin. Infect. Immun. **60**:3201-3208.
- Haga, Y., S. Ogino, S. Ohashi, T. Ajito, K. Hashimoto et T. Sawada.** 1997. Protective efficacy of an affinity-purified hemolysin vaccine against experimental swine pleuropneumonia. J. Vet. Med. Sci. **59**:115-120.
- Hensel, A., N. Stockhofe-Zurwieden, M. Ganter et K. Petzoldt.** 1995a. Aerosol exposure of pigs to viable or inactivated *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae* serotype 9 induces antibodies in bronchoalveolar lining fluids and serum, and protects against homologous challenge. *Vet. Microbiol.* **47**:27-41.
- Hensel, A., N. Stockhofe-Zurwieden, K. Petzoldt et W. Lubitz.** 1995b. Oral immunization of pigs with viable or inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 induces pulmonary and systemic antibodies and protects against homologous aerosol challenge. *Infect. Immun.* **63**:3048-3053.
- Higgins, R., S. Larivière, K. R. Mittal, G. P. Martineau, P. Rousseau et J. Cameron.** 1985. Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* **26**:86-89.
- Hirsh, D. C., L. D. Martin et M. C. Libal.** 1982. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **43**:269-272.
- Hong, M. et S. M. Payne.** 1997. Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Mol. Microbiol.* **24**:779-791.
- Hood, D. W., M. E. Deadman, T. Allen, H. Masoud, A. Martin, J. R. Brisson, R. Fleischmann, J. C. Venter, J. C. Richards et E. R. Moxon.** 1996. Use of the complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **22**:951-965.
- Idris, U. A., W. L. Steffans, F. A. Udeze et S. Kadis.** 1992. Effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin and lipopolysaccharide on cultured porcine neutrophils. *Curr. Microbiol.* **24**:81-87.

- Inzana, T. J. et B. Mathison.** 1987. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **55**:1580-1587.
- Inzana, T. J., J. Ma, T. Workman, R. P. Gogolewski et P. Anderson.** 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **56**:1880-1889.
- Inzana, T. J.** 1991. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Pathog.* **11**:305-316.
- Inzana, T. J., J. Todd, J. Ma et H. Veit.** 1991. Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. *Microb. Pathog.* **10**:281-296.
- Inzana, T. J., J. Todd et H. P. Veit.** 1993a. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect. Immun.* **61**:1682-1686.
- Inzana, T. J., J. M. Todd et H. Veit.** 1993b. Isolation, characterization, and evaluation of virulence and immunoprotective properties of temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Immunol. Infect. Dis.* **3**:17-22.
- Ishii, H., T. Fukuyasu, S. Iyobe et H. Hashimoto.** 1993. Characterization of newly isolated plasmids from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **54**:701-708.
- Jacques, M., B. Foiry, R. Higgins et K. R. Mittal.** 1988. Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.* **170**:3314-3318.
- Jacques, M.** 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **4**:408-410.

- Jensen, A. E et T. A. Bertram.** 1986. Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **51**:419-424.
- Jansen, R., J. Briaire, H. E. Smith, P. Dom, F. Haesebrouck, E. M. Kamp, A. L. Gielkens et M. A. Smits.** 1995. Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. *Infect. Immun.* **63**:27-37.
- Jolie, R. A., M. H. Mulks et B. J. Thacker.** 1994. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.* **38**:329-349.
- Jolie, R. A., M. H. Mulks et B. J. Thacker.** 1995. Cross-protection experiments in pigs vaccinated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* subtypes 1A and 1B. *Vet. Microbiol.* **45**:383-391.
- Johnson, A. G.** 1994. Molecular adjuvants and immunomodulators: new approaches to immunization. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:277-289.
- Kamp, E. M., N. Stockhofe-Zurwieden, L. A. M. G. van Leengoed et M. A. Smits.** 1997. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect. Immun.* **65**:4350-4354.
- Keenleyside, W. J. et C. Whitfield.** 1996. A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Biol. Chem.* **271**: 28581-28592.
- Kelly, T. M., S. A. Stachula, C. R. H. Raetz et M. S. Anderson.** 1993. The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)- $\alpha$ -D-glucosamine-N-acyltransferase the third step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**:19866-19874.
- Kobisch, M., P. Vannier, S. Delaporte et B. Dellac.** 1990. The use of experimental models to study in-vivo the antibacterial activity of

- Enrofloxacin against *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in combination with *Pasteurella multocida*. Proc. 11<sup>ième</sup> Int. Congr. Pig Vet. Soc, Lausanne, p. 16.
- Konadu, E., J. B. Robbins, J. Shiloach, D. A. Bryla et S. C. Szu.** 1994. Preparation, characterization, and immunological properties in mice of *Escherichia coli* 0157 O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines, *Infect. Immun.* **62**:5048-5054.
- Kume, K., T. Nakai et A. Sawata.** 1985. Efficacy of *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccine in pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.* **47**:201-206.
- Lallier, R., L. Le Blanc, F. Morrissette et R. Higgins.** 1987. Detection of a permeability factor produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Curr. Microbiol.* **15**:141-144.
- Lalonde, G., T. V. McDonald, P. Gardner et P. D. O'Hanley.** 1989. Identification of a hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and characterization of its channel properties in planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **264**:13559-13564.
- Loftager, M.-K., L. Eriksen, B. Aasted et R. Nielsen.** 1993. Protective immunity following immunisation of pigs with aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Res. Vet. Sci.* **55**:281-286.
- Madsen, M. E., K. G. Carnahan et R. N. Thwaites.** 1995. Evaluation of pig lungs following an experimental challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 and 5 in pigs inoculated with either hemolysin protein and / or outer membrane proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**:329-335.
- Maier, E., N. Reinhard, R. Benz et J. Frey.** 1996. Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**: 4415-4423.

- Miller, I., D. Maskell, C. Hormaeche, K. Johnson, D. Pickard et G. Dougan.** 1989. Isolation of orally attenuated *Salmonella typhimurium* following *TnphoA* mutagenesis. *Infect. Immun.* **57**:2758-2763.
- Mittal, K. R.** 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* **32**:135-148.
- Moore, G. M., R. P. Basson et L. V. Tonkinson.** 1996. Clinical field trials with tilmicosin phosphate in feed for the control of naturally acquired pneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* in swine. *Am. J. Vet. Res.* **57**:224-228.
- Morton, D. J. et P. Williams.** 1989. Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**:123-128.
- Mulks, M. H. et J. M. Buysse.** 1995. A targeted mutagenesis system for *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene.* **165**:61-66.
- Nadeau, M., S. Larivière S., R. Higgins et G. P. Martineau.** 1988. Minimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Vet. Res.* **52**:315-318.
- Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio, J. J. Serrano, C. García et M. de la Garza.** 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can J. Vet. Res.* **58**:83-86.
- Nicolet, J.** 1987. Infections à *Haemophilus* et *Actinobacillus* de l'appareil respiratoire du porc. *Rec. Méd. Vét.* **163**:445-449.
- Nicolet, J.** 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, p. 401-408. Dans A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire et D. J. Taylor (éd.), *Diseases of swine*, 7ième éd. Iowa State University Press, Ames.



- Nielsen, R.** 1979. *Haemophilus parahaemolyticus* serotypes. Pathogenicity and cross-immunity. Nord. Vet. Med. **31**:407-413.
- Nielsen, R.** 1984. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes-cross protection experiments. Nord. Vet. Med. **36**:221-234.
- Nielsen, R.** 1986a. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. Acta Vet. Scand. **27**:453-455.
- Nielsen, R.** 1986b. Serology of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes A and B. Acta Vet. Scand. **27**:49-58.
- Niven, D. F., J. Donga et F. S. Archibald.** 1989. Response 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.
- Oishi, E., H. Ito, T. Okabe et N. Terakado.** 1993. Passive protection of mice against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection by monoclonal antibodies. J. Vet. Med. Sci. **55**:711-715.
- Oishi, E., T. Kitajima, T. Ohgitani, S. Katayama et T. Okabe.** 1995. Protective efficacy of cell-free-antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. J. Vet. Med. Sci. **57**:727-731.
- Paradis, S.-É., D. Dubreuil, S. Rioux, M. Gottschalk et M. Jacques.** 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. Infect. Immun. **62**:3311-3319.
- Paradis, S.-É., D. Dubreuil et M. Jacques.** 1996. Examination of surface polysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 grown under iron-restricted conditions. FEMS Microbiol. Lett. **137**:201-206.

- Parker, C. T., E. Pradel et C. A. Schnaitman.** 1992. Identification and sequence of the lipopolysaccharide core biosynthetic genes *rfaQ*, *rfaP*, and *rfaG* of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**:930-934.
- Pattison, I. H., D. G. Howell et J. Elliot.** 1957. A *Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J. Comp. Pathol.* **67**:320-329.
- Paulsen, I. T., A. M. Beness et M. H. Saier, Jr.** 1997. Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology* **143**:2685-2699.
- Perry, M. B., E. Altman, J.-R. Brisson, L. M. Beynon et J. C. Richards.** 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. *Serodiag. Immunother. Infect. Dis.* **4**:299-308.
- Pohl, S., H. U. Bertschinger, W. Frederiksen et W. Mannheim.** 1983. Transfert of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella kaemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**:510-514.
- Porat, R., R. Mosseri, E. Kaplan, M. A. Johns et S. Shibolet.** 1992. Distribution of polysaccharide side chains of LPS determines resistance of *Escherichia coli* to the bactericidal activity of serum. *J. Infect. Dis.* **165**:953-956.
- Raetz, C. R .H.** 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles, p. 1035-1063. *Dans* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter et H. E. Umbarger (éd.), *Escherichia coli* and

*Salmonella*: cellular and molecular biology, vol. 1. 2ième éd. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- Raina, S. et C. Georgopoulos.** 1991. The *htrM* gene, whose product is essential for *Escherichia coli* viability only at elevated temperatures, is identical to the *rfaD* gene. *Nucleic Acids Res.* **19**:3811-3819.
- Rapp, V. J. et R. F. Ross.** 1986. Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection. *Infect. Immun.* **54**:751-760.
- Rapp, V. J. et R. F. Ross.** 1988. Immunogenicity of outer membrane components of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* **29**:585-587.
- Ray, B. L., G. Painter et C. R. H. Raetz.** 1984. The biosynthesis of gram-negative endotoxin: formation of lipid A disaccharides from monosaccharide precursors in extracts of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**: 4852-4859.
- Reeves, P. R., M. Hobbs, M. A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C. R. H. Raetz et P. D. Rick.** 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**:495-503.
- Reimer, D., J. Frey, R. Jansen, H. P. Veit et T. J. Inzana.** 1995. Molecular investigation of the role of ApxI and ApxII in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Microb. Pathog.* **18**:197-209.
- Rietschel, E. T. et H. Brade.** 1992. Bacterial endotoxins. *Sci. Am.* **267**:54-61.
- Rosendal, S., J. Devenish, J. I. MacInnes, J. H. Lumsden et S. Watson.** 1988. Evaluation of heat-sensitive, neutrophil-toxic, and hemolytic activity of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **49**:1053-1058.

- Rosendal, S., O. P. Miniats et P. Sinclair.** 1986. Protective efficacy of capsule extracts of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pig and mice. *Vet. Microbiol.* **12**:229-240.
- Rosendal, S. et J. I. MacInnes.** 1990. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* **51**:711-717.
- Rossi-Campos, A., C. Anderson, G. F. Gerlach, S. Klashinsky, A. A. Potter et P. J. Willson.** 1992. Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine.* **10**:512-518.
- Rycroft, A. N. et J. M. Cullen.** 1990. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. *Am. J. Vet. Res.* **51**:1449-1453.
- Sandlin, R. C., K. A. Lampel, S. P. Keasler, M. B. Goldberg, A. L. Stolzer et A. T. Maurelli.** 1995. Avirulence of rough mutants of *Shigella flexneri*: requirement of O antigen for correct unipolar localization of IcsA in the bacterial outer membrane. *Infect. Immun.* **63**:229-237.
- Saze, K., C. Kinoshita, F. Shiba, Y. Haga, T. Sudo et K. Hashimoto.** 1994. Effect of passive immunization with serotype-specific monoclonal antibodies on *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection of mice. *J. Vet. Med. Sci.* **56**:97-102.
- Schnaitman C. A. et J. D. Klena.** 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:655-682.
- Sebunya, T. N. K. et J. R. Saunders.** 1982. Studies on immunity to *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in mice. *Am. J. Vet. Res.* **43**:1793-1798.
- Sirisena, D. M., K. A. Brozek, P. R. MacLachlan, K. E. Sanderson et C. R. H. Raetz.** 1992. The *rfaC* gene of *Salmonella typhimurium*: cloning,

- sequencing and enzymatic function in heptose transfer to lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **267**: 18874-18884.
- Stephano, A., R. Navarro, C. D. Rayo et M. Osorio.** 1990. Effect of the use of ceftiofur sodium injectable (Excenel sterile powder) for the treatment of induced *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Multiple dose titration study. *Proc. 11<sup>ème</sup> Int. Congr. Pig Vet. Soc. Lausanne*, p. 41.
- Straw, B. E., N. J. MacLachlan, W. T. Corbett, P. B. Carter et H. M. Schey.** 1985. Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. *Can. J. Comp. Med.* **49**:149-151.
- Tang, H. B., E. DiMango, R. Bryan, M. Gambello, B. H. Iglewski, J. B. Goldberg et A. Prince.** 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun.* **64**:37-43.
- Tarasiuk, K., Z. Pejsak, A. Hogg et M. P. Carlson.** 1994. Efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacterin against serotypes 1, 3, 5 and 9. *Can. Vet. J.* **35**:233-238.
- Tascón, R. I., E. F. Rodríguez-Ferri, C. B. Gutiérrez-Martín, I. Rodríguez-Barbosa, P. Berche, and J. A. Vázquez-Boland.** 1993. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. *J. Bacteriol.* **175**:5717-5722.
- Tascón, R. I., J. A. Vázquez-Boland, C. B. Gutiérrez-Martín, I. Rodríguez-Barbosa, and E. F. Rodríguez-Ferri.** 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.
- Tascón, R. I., J. A. Vázquez-Boland, C. B. Gutiérrez-Martín, J. I. Rodríguez-Barbosa, and E. F. Rodríguez-Ferri.** 1996. Virulence factors

of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiología SEM. **12**:171-184.

- Tascón Cabrero, R. I., J. A. Vázquez-Boland, C. B. Gutiérrez, J. I. Rodríguez-Barbosa et E. F. Rodríguez-Ferri.** 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* does not require urease activity to produce acute swine pleuropneumonia. FEMS Microbiol. Lett. **148**:53-57.
- Udeze F. A., K. S. Latimer et S. Kadis.** 1987. Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine pleuropneumonia. Am. J. Vet. Res. **48**:768-773.
- Utrera, V. et C. Pijoan.** 1991. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. Vet. Rec. **128**:357-358.
- Vaillancourt, J., G.-P. Martineau, R. Higgins et S. Larivière.** 1987. Pleuropneumonie porcine à *Actinobacillus pleuropneumoniae* - Partie 1: de la bactérie aux lésions. Méd. Vét. Québec **17**:125-130.
- Vaillancourt, J. P., R. Higgins, G.-P. Martineau, K. R. Mittal et S. Larivière.** 1988. Changes in the susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to antimicrobial agents in Quebec (1981-1986). J. Am. Vet. Med. Assoc. **193**:470-473.
- Ward, C. K. et T. J. Inzana.** 1994. Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. J. Immunol. **153**:2110-2121.
- Ward, C. K. et T. J. Inzana.** 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.

- Wasteson, Y., D. E. Roe, K. Falk et M. C. Roberts.** 1996. Characterization of tetracycline and erythromycin resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **48**:41-50.
- Weissborn, A. C., Q. Liu, M. K. Rumley et E. P. Kennedy.** 1994. UTP: $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the *galU* gene and purification of the enzyme. *J. Bacteriol.* **176**:2611-2618.
- Welch, R. A. et S. Pellett.** 1988. Transcriptional organization of the *Escherichia coli* hemolysin genes. *J. Bacteriol.* **170**:1622-1630.
- Whitfield, C.** 1995. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* **3**:178-185.
- Whitfield, C, P. A. Amor et R. Köplin.** 1997. Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol. Microbiol.* **23**:629-638.
- Willson, P. J., A. Rossi-Campos et A. A. Potter.** 1995. Tissue reaction and immunity in swine immunized with *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines. *Can. J. Vet. Res.* **59**:299-305.
- Yagihasi, T., T. Nunoya, T. Mitui et M. Tajima.** 1984. Effect to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of *Haemophilus pleuropneumoniae* pneumonia in pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.* **46**:705-713.

## **VII. ANNEXES**



Annexe 1

Article

Identification of two core types in lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* representing serotypes 1 to 12

Mario Jacques, **Stéphane Rioux**, Sonia-Élaine Paradis, Caroline Bégin  
et Marcelo Gottschalk.

Can. J. Microbiol. **42**:855-858, 1996

Dans ce travail, j'ai contribué à la mise au point des gels Tricine SDS-PAGE et j'ai participé à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

## Identification of two core types in lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* representing serotypes 1 to 12

Mario Jacques, Stéphane Rioux, Sonia-Élaine Paradis, Caroline Bégin, and Marcelo Gottschalk

**Abstract:** Lipopolysaccharides (LPS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* were separated by Tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, which has been shown to improve resolution of low-molecular-mass fast migrating bands. Strains representing the 12 serotypes of *A. pleuropneumoniae* can be divided in two groups according to the gel mobility of the core – lipid A region of their LPS. The first electromorphic core type (core type I), found in serotypes 1, 6, 9, and 11, had a migration slower than *Salmonella typhimurium* Ra LPS. The second electromorphic core type (core type II), found in the remaining serotypes (i.e., 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, and 12) had a migration similar to *S. typhimurium* Ra LPS. Furthermore, we observed that these two core types were antigenically different. Western blot analyses indicated that core – lipid A region of LPS from electromorphic core type I strains reacted when probed with serum from a pig experimentally infected with a core type I strain but not when probed with serum from a pig experimentally infected with a core type II strain. Conversely, core – lipid A region of LPS from electromorphic core type II strains reacted only when probed with serum from a pig experimentally infected with a core type II strain. Our results, based on both electrophoretic mobility and antigenicity, suggest the presence of two LPS core types in *A. pleuropneumoniae*.

**Key words:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, lipopolysaccharides, core.

**Résumé :** Les lipopolysaccharides (LPS) d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de Tricine et de SDS, une méthode qui permet une meilleure résolution des molécules de faible masse moléculaire. Les souches représentant les 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* peuvent être divisées en deux groupes selon la mobilité sur gel de la région noyau oligosaccharidique – lipide A de leurs LPS. Le premier type électrophorétique (type I) migre plus lentement que le LPS de *Salmonella typhimurium* Ra et est retrouvé chez les sérotypes 1, 6, 9 et 11. Le second type électrophorétique (type II) a une migration similaire au LPS de *S. typhimurium* Ra et est retrouvé chez les autres sérotypes. De plus, nous avons observé que ces deux types électrophorétiques étaient aussi antigéniquement différents. Des analyses par immunobuvardage ont montré que la région noyau oligosaccharidique – lipide A des LPS du type I réagissait avec un antisérum provenant d'un porc infecté expérimentalement avec une souche du type I mais ne réagissait pas avec un antisérum provenant d'un porc infecté expérimentalement avec une souche du type II. De la même manière, la région noyau oligosaccharidique – lipide A des LPS du type II réagissait uniquement avec un antisérum provenant d'un porc infecté expérimentalement avec une souche du type II. Nos résultats, basés sur la mobilité électrophorétique et l'antigénicité, suggèrent la présence de deux types de noyau oligosaccharidique chez les LPS d'*A. pleuropneumoniae*.

**Mots clés :** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, lipopolysaccharides, noyau oligosaccharidique.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia (Nicolet 1992), a disease found worldwide that causes tremendous economic loss to the swine industry. Twelve serotypes of *A. pleuropneumoniae* based on capsular antigens have been recognized (Nielsen 1986b), with

serotype 5 divided into 5a and 5b (Nielsen 1986a). The chemical structures of the capsular polysaccharides, as well as the O-polysaccharides, of the 12 serotypes of *A. pleuropneumoniae* have been determined (Perry et al. 1990).

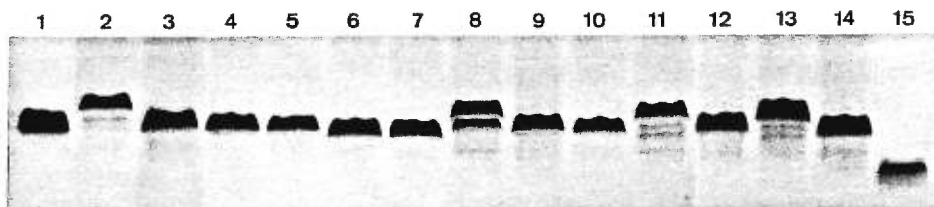
Lipopolysaccharides (LPS) are among the important virulence factors of *A. pleuropneumoniae*. We previously demonstrated that high-molecular-mass LPS were the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to porcine respiratory tract cells (Bélanger et al. 1990; Paradis et al. 1994). More recently, we observed that *A. pleuropneumoniae* LPS were binding pig hemoglobin and that the core – lipid A region was involved (Bélanger et al. 1995). The purpose of the present study was to characterize, using gel electrophoresis and Western blotting, the core – lipid A region of *A. pleuropneumoniae* LPS representing the 12 serotypes.

Received December 18, 1995. Revision received March 26, 1996. Accepted April 29, 1996.

M. Jacques,<sup>1</sup> S. Rioux, S.-É. Paradis, C. Bégin, and M. Gottschalk. Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, QC J2S 7C6, Canada.

<sup>1</sup> Author to whom all correspondence should be addressed (e-mail: jacqum@ere.umontreal.ca).

**Fig. 1.** Silver-stained Tricine-SDS-PAGE profiles of whole-cell, proteinase-K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* reference strains representing serotypes 1 (lane 2; representative of core type I), 2 (lane 3; representative of core type II), 3 (lane 4), 4 (lane 5), 5a (lane 6), 5b (lane 7), 6 (lane 8), 7 (lane 9), 8 (lane 10), 9 (lane 11), 10 (lane 12), 11 (lane 13), and 12 (lane 14). For comparison, LPS (2  $\mu$ g) from *S. typhimurium* TV119 (lane 1; Ra mutant) and *S. typhimurium* SL1181 (lane 15; Re mutant) are shown.



Reference strains representing serotypes 1–12 of *A. pleuropneumoniae* were grown on PPLO agar base (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) plates supplemented with 10% yeast extract, 0.1% dextrose, and 5% horse serum, at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 18–24 h. We used Tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (TSDS-PAGE), a method which has been shown to increase the resolution of lipooligosaccharides and the core region of LPS (Lesse et al. 1990; Sprott et al. 1994). The separating gel was prepared at a final concentration of 18% acrylamide, 0.36% bisacrylamide, and 10.5% glycerol. The gel was polymerized by the addition of 40  $\mu$ L of 10% ammonium persulfate and 4  $\mu$ L of TEMED (per 20 mL of gel). The stacking gel was prepared at a final concentration of 4.5% acrylamide and 0.08% bisacrylamide, and polymerized by the addition of 30  $\mu$ L of 10% ammonium persulfate and 10  $\mu$ L of TEMED (per 10 mL of gel). The buffers were as follows: anode buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 8.9), cathode buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M Tricine, 0.1% SDS, pH 8.25), and 4 $\times$  gel buffer stock solution (4.0 M Tris, 0.4% SDS, pH 8.45). Agar-grown bacteria (2 mg) were suspended in 100  $\mu$ L of solubilization buffer (5.9 mL of 0.06 M Tris-HCl – 1 mM EDTA – 2% SDS (pH 6.8), 4 mL glycerol, 0.8 mL 2-mercaptoethanol, and 0.4 mL saturated solution of bromophenol blue), and then boiled for 20 min. An equal volume of proteinase K (1 mg/mL; Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.) prepared in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> was added to the samples, and the mixtures were incubated for 60 min at 60°C. Samples containing 10  $\mu$ g KDO/mL (Daniels et al. 1994) were electrophoresed for 3 h at 38 mA using a Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.). Gels were fixed 30 min in 40% ethanol – 5% acetic acid solution and stained with the silver-staining procedure of Tsai and Frasch (1982). Extracted LPS from *Salmonella typhimurium* TV119 (Ra mutant) and SL1181 (Re mutant) (Sigma) were used as standards.

Separation and visualization of components of the core – lipid A region of *A. pleuropneumoniae* LPS was achieved by using gels loaded with 8  $\mu$ L (Fig. 1). Reference strains could be divided in two electromorphic core types according to their mobility. Reference strains of serotypes 1, 6, 9, and 11 form the first electromorphic core type (core type I; Fig. 1, lanes 2, 8, 11, and 13), composed of three distinct bands, which migration of the major band was slower than *S. typhimurium* Ra LPS. Reference strains of the other serotypes (i.e., 2, 3, 4, 5a, 5b, 7, 8, 10, and 12) exhibited another electromorphic core type (core

type II; Fig. 1, lanes 3–7, 9, 10, 12, and 14), composed of one band, which migration was similar to *S. typhimurium* Ra LPS.

Although the structural diversity of the core region is low compared with that of the O-chain, different core types have been observed with other bacterial species. In *Escherichia coli*, for example, five core types have been identified (R1–R4 and K-12) (Reeves 1994; Rietschel et al. 1994). Five core types have been also recognized for *Proteus* and three have been recognized for *Citrobacter* (Rietschel et al. 1994). Results from a recent study by de Kievit and Lam (1994), using monoclonal antibodies, strongly suggest that a structural diversity exists within the outer core region of *Pseudomonas aeruginosa* LPS. Finally, in *Pasteurella multocida*, a member of the *Pasteurellaceae* family as is *A. pleuropneumoniae*, the LPS representing the 16 somatic serotypes could be divided into two groups on the basis of the leading band mobility (Rimler 1990).

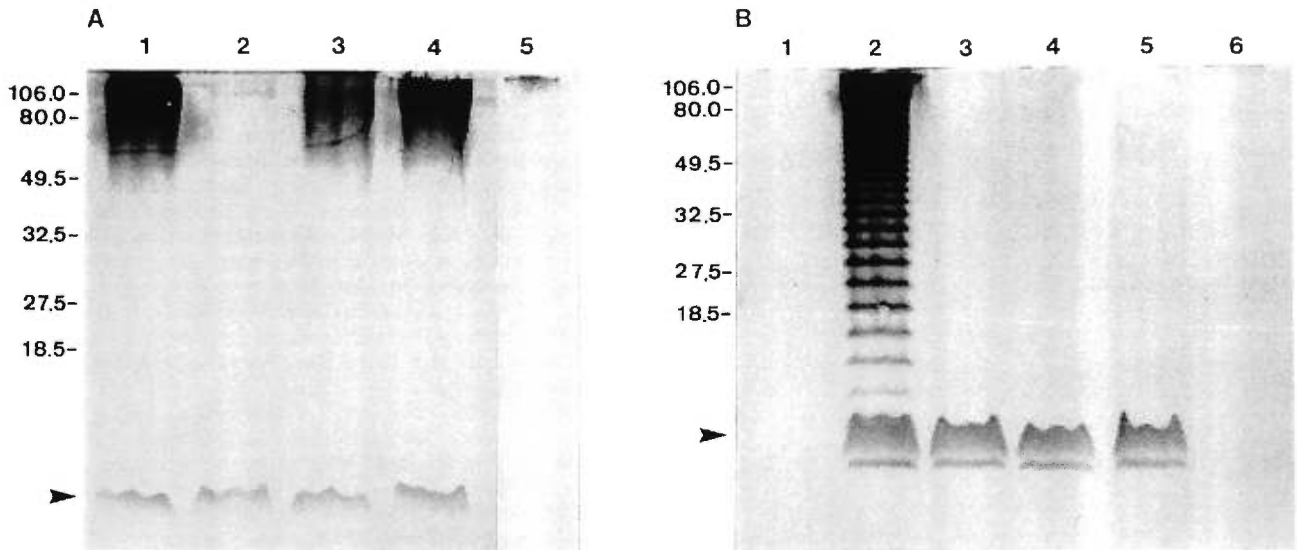
We previously observed antigenic cross-reactions between the core – lipid A region of different serotypes of *A. pleuropneumoniae* that complicated the serodiagnosis of the infection (Radacovici et al. 1992). We, thus, decided to determine whether these cross-reactions were associated with the two electromorphic core types.

Western blot (immunoblot) experiments were performed by the method of Towbin et al. (1979) as described previously (Li et al. 1992). The samples separated by electrophoresis were transferred to nitrocellulose membranes (0.2  $\mu$ m; Bio-Rad) and incubated with pig antisera overnight at 4°C. These antisera were obtained from pigs experimentally infected with the serotype 1, 2, 3, or 6 reference strain of *A. pleuropneumoniae* as previously described (Radacovici et al. 1992).

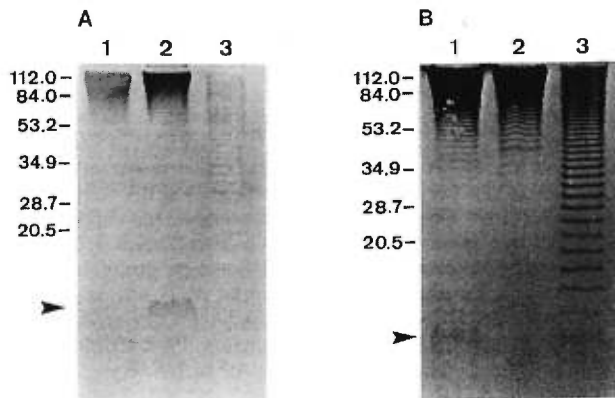
Western blot analyses indicated that core – lipid A region of LPS from electromorphic core type I strains reacted when probed with serum from a pig experimentally infected with a core type I strain (serotype 1 antiserum in Fig. 2A, lanes 1–4; serotype 6 antiserum in Fig. 3A, lane 2) but not when probed with serum from a pig experimentally infected with a core type II strain (serotype 2 antiserum in Fig. 2B, lanes 1 and 6; serotype 3 antiserum in Fig. 3B, lane 2). Conversely, core – lipid A region of LPS from electromorphic core type II strains reacted only when probed with serum from a pig experimentally infected with a core type II strain (Fig. 2A, lane 5; Fig. 2B, lanes 2–5; Figs. 3A and 3B, lanes 1 and 3). These results indicate that the two electromorphic core types are, in addition, antigenically different. These cross-reactions are different from

## Notes

**Fig. 2.** Western blot analysis of whole-cell, proteinase-K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* probed with serum from a pig experimentally infected with (A) *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain (core type I) or (B) *A. pleuropneumoniae* serotype 2 reference strain (core type II). (A) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1 (lane 1), 6 (lane 2), 9 (lane 3), 11 (lane 4), and 2 (lane 5). (B) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1 (lane 1), 2 (lane 2), 3 (lane 3), 4 (lane 4), 5b (strain 81-750, lane 5), and 6 (lane 6). The positions of prestained low-molecular-mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Arrows indicate the core – lipid A region.



**Fig. 3.** Western blot analysis of whole-cell, proteinase-K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* probed with serum from a pig experimentally infected with (A) *A. pleuropneumoniae* serotype 6 reference strain (core type I) or (B) *A. pleuropneumoniae* serotype 3 reference strain (core type II). *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 3 (lane 1), 6 (lane 2), and 8 (lane 3) are shown. The positions of prestained low-molecular-mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Arrows indicate the core – lipid A region.



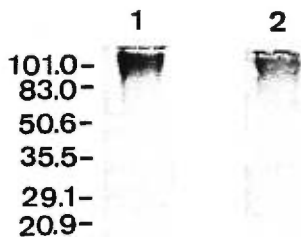
the serological cross-reactions observed between the O-polysaccharides of serotypes 1, 9, and 11 (which can also be seen in the upper part of Fig. 2A, lanes 1, 3, and 4); 4 and 7; and 3, 6, and 8 (which can also be seen in the upper part of Fig. 3), respectively (Perry et al. 1990).

It is interesting to note that, as expected, the core – lipid A region of serotypes 1 and 2 did not react when probed with monoclonal antibodies 5.1G8F10 or 102-G02 specific to serotypes 1 and 2 O-antigen (Paradis et al. 1994), respectively (Fig. 4, lanes 1 and 2). However, there is a possibility that the major bands in the core – lipid A region may be in fact core – lipid A plus one O repeating unit. It has been observed previously with *Pseudomonas aeruginosa* that monoclonal antibodies specific for O-antigen do not necessarily recognize core with one O-antigen unit attached (Lam et al. 1992).

Our results, based on both electrophoretic mobility and antigenicity, suggest the presence of two LPS core types in *A. pleuropneumoniae*. Differences in the electrophoretic mobilities and antigenic profiles probably reflect differences in composition and (or) structure of the outer core usually composed of hexoses, since the inner core is generally highly conserved. The composition of the core oligosaccharide has been determined for some serotypes of *A. pleuropneumoniae*. For example, the core oligosaccharide of serotype 1 LPS was found to be composed of D-galactose, D-glucose, L-glycero-D-mannoheptose, D-glycero-D-mannoheptose, and 2-amino-2-deoxy-D-glucose in the molar ratio of 3:3:0.5:1:3 (Altman et al. 1986), while the core oligosaccharide of serotype 2 LPS was found to be composed of D-galactose, D-glucose, L-glycero-D-mannoheptose, and D-glycero-D-mannoheptose in the molar ratio of 0.2:1:1:0.6 (Altman et al. 1987). However, the conclusive identification of the two core types in *A. pleuropneumoniae* LPS would be obtained by the use of core-specific antiserum.

It has been suggested that the core region plays an important role in the tertiary and (or) quaternary conformation of LPS, by strengthening the interaction of LPS with their different target molecules, as well as contributing to endotoxin activity

**Fig. 4.** Western blot analysis of whole-cell, proteinase-K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain probed with monoclonal antibody 5.1G8F10 specific to serotype 1 O-antigen (lane 1) and *A. pleuropneumoniae* serotype 2 reference strain probed with monoclonal antibody 102-G02 specific to serotype 2 O-antigen (lane 2). The positions of prestained low-molecular-mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.



(Cavaillon and Haeffner-Cavaillon 1992). We do not know, at the present time, whether the core type has any influence on the virulence of *A. pleuropneumoniae*.

### Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (A3428 to M.J.). S.R. and S.-É.P. are both recipient of a studentship from Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche.

### References

- 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.
- Altman, E., Brisson, J.-R., Bundle, D.R., and Perry, M.B. 1987. Structural studies of the O-chain of the phenol-phase soluble lipopolysaccharide from *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 2. *Biochem. Cell Biol.* **65**: 876–889.
- 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.
- Cavaillon, J.-M., and Haeffner-Cavaillon, N. 1992. Structure-function relationships to core oligosaccharide. *In* Bacterial endotoxic lipopolysaccharides. Vol. 1. Edited by D.C. Morrison and J.L. Ryan. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 205–224.
- Daniels, L., Hanson, R.S., and Phillips, J.A. 1994. Chemical analysis. *In* Methods for general and molecular bacteriology. Edited by P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 512–554.
- de Kievit, T.R., and Lam, J.S. 1994. Monoclonal antibodies that distinguish inner core, outer core, and lipid A regions of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **176**: 7129–7139.
- Lam, J.S., Handelsman, M.Y.C., Chivers, T.R., and MacDonald, L.A. 1992. Monoclonal antibodies as probes to examine serotype-specific and cross-reactive epitopes of lipopolysaccharides from serotype O2, O5, and O16 of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **174**: 2178–2184.
- Lesse, A.J., Campagnari, A.A., Bittner, W.E., and Apicella, M.A. 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine – sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods*, **126**: 109–117.
- Li, Z., Jensen, N.S., Bélanger, M., L'Espérance, M.-C., and Jacques, M. 1992. Molecular characterization of *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae* isolates representing serotypes 8 and 9. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2941–2947.
- Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *In* Diseases of swine. 7th ed. Edited by A. D. Leman, B.E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire, and D.J. Taylor. Iowa State University Press, Ames. pp. 401–408.
- Nielsen, R. 1986a. Serology of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes a and b. *Acta Vet. Scand.* **27**: 49–58.
- Nielsen, R. 1986b. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of new serotype: serotype 12. *Acta Vet. Scand.* **27**: 453–455.
- Paradis, S.-É., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M., and Jacques, M. 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect. Immun.* **62**: 3311–3319.
- 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* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains. *Serodiag. Immunother. Infect. Dis.* **4**: 299–308.
- Radacovici, S., Lallier, R., Larivière, S., and Dubreuil, J.D. 1992. Biochemical characterization of an antigenic saline extract of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 and identification of a serotype-specific antigen for ELISA serodiagnosis. *Vet. Microbiol.* **30**: 369–385.
- Reeves, P. 1994. Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide. *In* Bacterial cell wall. New comprehensive biochemistry. Vol. 27. Edited by J.-M. Ghuyssen and R. Hakenbeck. Elsevier, Amsterdam. pp. 281–317.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zähringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., Schreier, M., and Brade, H. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**: 217–225.
- Rimler, R.B. 1990. Comparison of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharides by sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis to determine relationship between group B and E hemorrhagic septicemia strains and serologically related group A strains. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 654–659.
- Sprott, G.D., Koval, S.F., and Schnaitman, C.A. 1994. Cell fractionation. *In* Methods for general and molecular bacteriology. Edited by P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 72–103.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350–4353.
- Tsai, C.M., and Frasch, C.E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**: 115–119.

Annexe 2

Acte de colloque

Evaluation of the protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
serotype 1 detoxified lipopolysaccharides in pigs

**Stéphane Rioux**, Christiane Girard, Daniel Dubreuil et Mario Jacques

Int. Pig Vet. Soc. Congr. **14**:205, 1996

## EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFICACY OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* SEROTYPE 1 DETOXIFIED LIPOPOLYSACCHARIDES IN PIGS

S. Rioux, C. Girard, D. Dubreuil, M. Jacques\*

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

### Introduction

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a worldwide disease causing tremendous economic loss to the swine industry. In Québec, serotype 1 is the most predominant followed by serotype 5 (3).

Vaccines containing chemically inactivated bacterial cells of *A. pleuropneumoniae* are currently used to control and to prevent the disease. However, these preparations do not prevent the subclinical or pathological manifestations of the disease, and induce only a protective response restricted to the serotype used in the vaccine. In contrast, optimal protection of pigs against infection by homologous and heterologous serotypes seemed to occur following natural infection with *A. pleuropneumoniae*. A previous study has established that a significant immune response to LPS occurred as a result of *A. pleuropneumoniae* infection but was not important after immunization with whole-cell preparation (1).

We previously demonstrated that high-molecular-mass lipopolysaccharides (LPS) were the major adhesin involved in adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract epithelium (4). Preliminary experiments in our laboratory have shown that mice immunized with different *A. pleuropneumoniae* LPS preparations, including detoxified LPS, were protected against a challenge with a virulent *A. pleuropneumoniae* isolate. The purpose of the present study was to evaluate the protection of pigs against experimental *A. pleuropneumoniae* infection following immunization with an adhesin (detoxified LPS) preparation.

### Material and methods

Detoxified LPS of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 were obtained after phenol extraction and acid hydrolysis (4).

Groups of 6-week old pigs were injected twice intramuscularly with either a commercial bacterin (Pneupac; Schering Canada) or detoxified LPS (200 µg of carbohydrates) mixed with an adjuvant composed of mineral oil, Span 85, and Tween 85. The emulsion was prepared by mixing the mineral oil, Span 85, Tween 85, and the antigen in a 18:1:1:20 ratio and emulsified using a vortex (2); one group of non-vaccinated pigs received PBS and served as control.

Two weeks after the second immunization, animals were challenged intranasally with  $4 \times 10^9$  CFU of a 6-hour culture of a virulent *A. pleuropneumoniae* serotype 1 field isolate.

Pigs were examined daily for clinical signs and fever. Surviving pigs were killed 2 weeks after challenge. A necropsy was done on every pig, with particular attention to the vaccination site and the pulmonary changes. Lung lesions were evaluated and expressed as a percentage. Histologic examination was done on the vaccination site and the lungs. Lungs and tonsils were cultured for the presence of *A. pleuropneumoniae*.

### Results

The results of the challenge experiments are summarized in Table 1. With regard to all parameters evaluated (clinical signs, fever, mortality, lung lesions, lesions at the site of vaccination, and weight gain after challenge), vaccinated pigs were protected against infection compared to non-vaccinated controls.

In pigs with lesions, fibrino-hemorrhagic to fibrino-necrotic pleuropneumonia was observed depending on the time of survival. Granulomas were observed at the site of vaccination.

*A. pleuropneumoniae* was recovered from the lungs and the tonsils of the four vaccinated pigs with lesions and from three non-vaccinated pigs with porcine pleuropneumonia. *A. pleuropneumoniae* was recovered from the tonsils of vaccinated and control pigs without lesions. However, *A. pleuropneumoniae* was not recovered from the lung and tonsil of one pig (without lesion) of each vaccinated groups and one pig (with lesion) of the control group.

### Discussion

Vaccination of animals with whole-cell preparations has been shown to produce little or no antibody response to *A. pleuropneumoniae* LPS,

whereas animals convalescing from the disease were found to have high antibody levels to these molecules (1). This observation suggested that the partial protective efficacy of bacterins might be due to the absence of high antibody titers against LPS. The purpose of the present study was to evaluate the protection of animals against *A. pleuropneumoniae* following immunization with detoxified LPS. The rationale for this approach is that, theoretically, LPS-specific antibodies would not only affect *A. pleuropneumoniae* adherence and colonization, but would also inhibit LPS-mediated release of mediators from immuno-competent cells and traffic soluble LPS as well as intact bacteria for clearance and detoxification.

LPS of *A. pleuropneumoniae*, like LPS of most gram-negative bacteria, is a toxic molecule (1,5). However, LPS can be rendered non-toxic following hydrolysis and fractionation of polysaccharides and lipid A. Our results showed that a good protection against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was obtained by immunization with detoxified LPS. One possible mechanism of protection can result from interference with the initial event in bacterial colonization (i.e. adherence to mucosal surfaces) due to antibodies against the lipopolysaccharidic adhesins before the different toxins produced by this microorganism could affect the lungs. Another possibility is the induction of a cellular immune response in the respiratory tract. Future studies should be designed to improve protection by testing other doses of LPS, as well as other adjuvants.

In summary, although the best protection was observed with the commercial whole-cell bacterin, our results indicate that a good protection was obtained when pigs were immunized with a single class of molecules, detoxified LPS. Most importantly, these results confirm the important role of *A. pleuropneumoniae* LPS in pathogenesis of porcine pleuropneumonia.

### Acknowledgements

We are grateful to Marylène Kobisch for advice and Moussa S. Diarra for technical assistance. This work was supported by a research partnership program involving the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Agriculture Canada, and Fédération des Producteurs de Porcs du Québec.

### References

1. Fenwick, B.W., Osburn, B.I. (1986) *Infect. Immun.* 54:575-582.
2. Hall, W., Molitor, T.W., Joo, H.S., Pijoan, C. (1989) *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22:175-186.
3. Mittal, K.R. (1992) *Vet. Microbiol.* 32:135-148.
4. Paradis, S-E., Dubreuil, D., Rioux, S., Jacques, M. (1994) *Infect. Immun.* 62: 3311-3319.
5. Udeze, F. A., Latimer, K. S., Kadis, S. (1987) *Am. J. Vet. Res.* 48:768-773.

Table 1. Protection of pigs immunized with different vaccine preparations and challenged with a virulent *A. pleuropneumoniae* serotype 1 field isolate

	PBS	Commercial bacterin	Detoxified LPS
Number of pigs (n)	5	5	5
Mortality (n)	3	0	1
Fever >41°C (n)	2	0	3
Dyspnea (n)	2	0	1
Pigs with lung lesions (n)	4	1	3
Lung lesions (%)	46.7	1.6	18.2
Granulomas at site of vaccination (n)	0	4	3
Mean daily weight gain <sup>a</sup> (kg)	0.18	0.91	0.57

\*Mean daily weight gain 14 days post-challenge.

Annexe 3

Article de vulgarisation

Pleuropneumonie porcine - une nouvelle stratégie de vaccination

Daniel Dubreuil, **Stéphane Rioux**, Mario Jacques

Porc Québec, **8**:41-44, 1997

Dans ce travail, j'ai effectué la préparation du vaccin et tous les essais de vaccination. J'ai analysé et participé à la critique des résultats et à la rédaction du manuscrit.



## PLEUROPNEUMONIE PORCINE UNE NOUVELLE STRATÉGIE DE VACCINATION

DANIEL DUBREUIL, PH. D.  
STÉPHANE RIOUX, M. SC.  
MARIO JACQUES, PH. D.  
FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRAIRE,  
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

*Un nouveau type de vaccin contre la pleuropneumonie porcine qui empêche l'attachement du germe au niveau des amygdales et des voies respiratoires supérieures a été testé. Quoique son efficacité n'atteint pas pour le moment les préparations commerciales, on poursuivra les travaux afin de voir si un changement de dose ou l'ajout d'un autre adjuvant pourrait en augmenter l'efficacité.*

La pleuropneumonie porcine est une maladie contagieuse qui se retrouve partout dans le monde où se pratique l'élevage porcin sur une base industrielle. Le germe responsable de cette maladie est *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Il en existe 12 sérotypes différents et les formes 1 et 5 sont les plus courantes au Québec.

La vaccination est l'un des moyens utilisés pour le contrôle de cette maladie. Les vaccins commerciaux ont démontré une certaine capacité à réduire la mortalité, mais ils n'empêchent pas l'attachement du germe au niveau des amygdales et des

voies respiratoires supérieures, ni la présence de signes cliniques. Un vaccin qui agirait dès cette première étape de l'infection serait un atout majeur dans la prévention de la maladie.

C'est dans cet esprit qu'une étude a été entreprise à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal pour déterminer si l'utilisation d'un vaccin contenant exclusivement la molécule responsable de l'attachement du germe responsable de la

pleuropneumonie porcine aux voies respiratoires supérieures pourrait prévenir les mortalités, mais aussi les infections chroniques, en empêchant le germe de s'établir sur les muqueuses.



Le germe *Actinobacillus pleuropneumoniae* tel qu'observé au microscope électronique.

### FORMATION + CONSULTATION CHEZ VOUS

- Matériels pour récolter, diluer, analyser (gamme jetable) échographier et mesurer le gras dorsal

Demandez notre nouveau catalogue

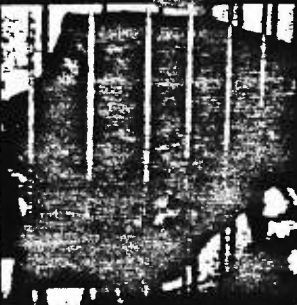


Synthèse Élevage Canada  
raccourci son nom

S.E.C. Repro inc.

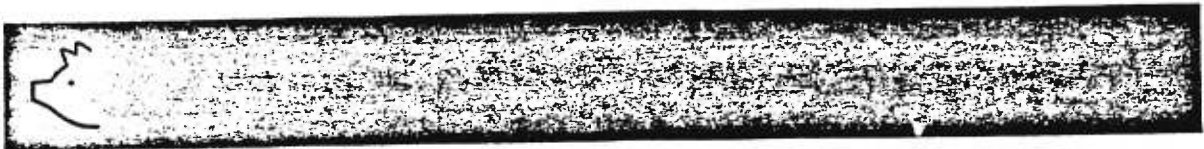
1-888-446-4647 (Canada) Services-Équipements-Contrôle  
997 Rte 235, Notre-Dame-de-Stanbridge, (Québec) J0J 1M0  
Tél. : (514) 296-4647 Fax : (514) 296-4648

Journée Mise-bas  
6 hrs = + VIFS



Journée I.A.  
Détection + analyse  
6 hrs

recherche STRATEGIE DE VACCINATION



**LA VACCINATION ACTUELLE**

Quoique plusieurs vaccins contre *A. pleuropneumoniae* soient disponibles commercialement, ils n'offrent pas tous le même niveau de protection. Ainsi, les vaccins faits de cellules bactériennes tuées ne protègent l'animal que contre le ou les sérotypes qui entrent dans sa composition. Le niveau de protection obtenu avec ces préparations peut sembler élevé lorsqu'on les administre de façon expérimentale, mais en situation commerciale, les résultats sont souvent plus mitigés.

**UNE NOUVELLE APPROCHE**

La première étape d'une infection est l'attachement du germe (adhérence) à certains tissus de l'hôte. Pour *A. pleuropneumoniae*, cette étape cruciale de l'infection se déroule avec l'aide d'une molécule complexe retrouvée à la surface du germe, appelée *lipopolysaccharide* (LPS). Lors d'infections naturelles, des anticorps dirigés contre cette molécule sont présents chez des animaux convalescents et ceux-ci deviennent résistants à une réinfection éventuelle.

Dans le cadre du projet, on a émis l'hypothèse qu'un vaccin à base de LPS purifié pourrait stimuler une réponse immunologique du porc au niveau des muqueuses respiratoires et ainsi empêcher l'adhérence du germe à ces tissus. L'étude a été limitée au sérotype 1 de la maladie. Le LPS étant une molécule toxique, il a fallu la détoxifier dans un premier temps. On a ensuite évalué des préparations vaccinales de ce LPS chez des souris, puis testé la plus prometteuse chez le porc.

recherche STRATÉGIE DE VACCINATION

**CARTES D'AFFAIRES**

**EQUIPEMENT DE FERME**



- Ventilateur Roey
- Contrôle Phason
- Équipement de porcherie
- Équipement BSM
- Bassin à purin

**Alain Grenier**  
prés.  
420, rang 8, St-Germain  
JOC 1K0



Tél.: (819) 395-2493

**CONSTRUCTION B.R.N. inc.**

516, 7e rang St-Dominique  
Cté St-Hyacinthe J0H 1L0  
*Bruno Bousquet, prop.*

Profitez de matériaux de première qualité sur toute la ligne à des prix raisonnables

Fosse à purin - Plate-forme -  
Coffrage agricole de tout genre  
Lagune - Mur isolé en béton.

"Selon les plans de votre ingénieur"  
Partout au Québec

Aussi disponible: Service de pelle et béliet mécanique  
Agent dépositaire d'évacuateur souterrain Bois-Francis  
☎ (514) 773-0064 • 773-5930 • 1-800-265-0064  
Fax: (514) 773-9743



2389, route 202  
Dunham, Qc J0E 1M0  
Tél.: (514) 266-5323  
Fax: (514) 266-5708

- ◆ Cage pouponnière chaude à deux étages
- ◆ Cage de gestation
- ◆ Cage de mise bas
- ◆ Enclos
- ◆ Trémie sèche pour pouponnière
- ◆ Trémie sèche pour engraissement
- ◆ Trémie abreuvoir
- ◆ Entrée d'air
- ◆ Ventilateur
- ◆ Contrôle
- ◆ Unité motorise



POSSÉ À PURIN  
PLATE-FORME À FUMIER  
SILO-POSSÉ  
cellulaire: (514) 386-3079

(514) **564-2030**

1650, St-Pierre, St-Zéphirin, Qc J0B 1V0



SYSTÈME DE PLANCHER CHAUFFANT

**ADMINISTRATION**  
57, rue Market, C.P. 234  
Richmond (Qc) J0B 2H0  
Page 1 (800) 567-2777  
extension : 35136

**ENTRÉPÔT/WAREHOUSE**  
295, Montée de Lièze  
St-Laurent (Qc) H4T 1P5  
Tél.: (514) 735-3577  
Fax: (514) 344-0715

- DISTRIBUTION
- FORMATION/TRAINING
- CONCEPTION/DESIGN

*Réal Boulay*  
Tél.: (514) 774-7951  
Fax: (514) 774-2307

aménagement ou nouvelle porcherie...  
**optez pour la solution**

**ÉVALUATIONS ENVIRONNEMENTALES RÉGLEMENTAIRES**


100, rue Jean-Dalton Nord, bureau 225, Sainte-Foy (Qc) G1N 4K8  
TÉL.: (514) 382-8448  
Fax: (514) 382-8382

L'efficacité de cette préparation a été comparée à celle d'un vaccin commercial (Pneupac, Schering Canada). Un groupe témoin de porcs n'a pas été vacciné. Deux semaines après la deuxième injection, les porcs ont été exposés par voie intranasale à une dose du germe capable de tuer plus de 50 % des animaux non vaccinés. Les résultats

obtenus démontrent que les animaux vaccinés étaient protégés contre l'infection.

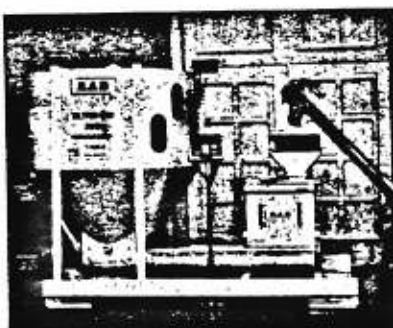
Le vaccin commercial a protégé tous les animaux de la mort, alors qu'un des porcs ayant reçu le LPS détoxiqué (vaccin expérimental) est mort. Les porcs ayant reçu le vaccin expérimental ont montré des lésions pulmonaires significativement moins impor-

tantes que celles retrouvées chez les animaux non vaccinés. Ces porcs ont aussi eu un gain de poids quotidien moyen se situant entre celui des porcs non vaccinés et celui des porcs ayant reçu le vaccin commercial. Chez la majorité des porcs vaccinés, le germe a pu être réisolé à partir des amygdales, ce qui implique que malgré la réduction de la mortalité et des lésions pulmonaires, les animaux demeurent porteurs du germe.

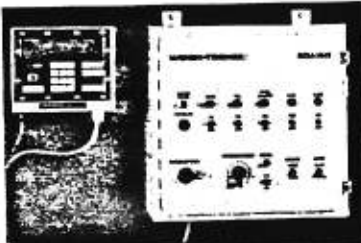


**RAD & WEIGH-TRONIX**

## LA COMBINAISON GAGNANTE!

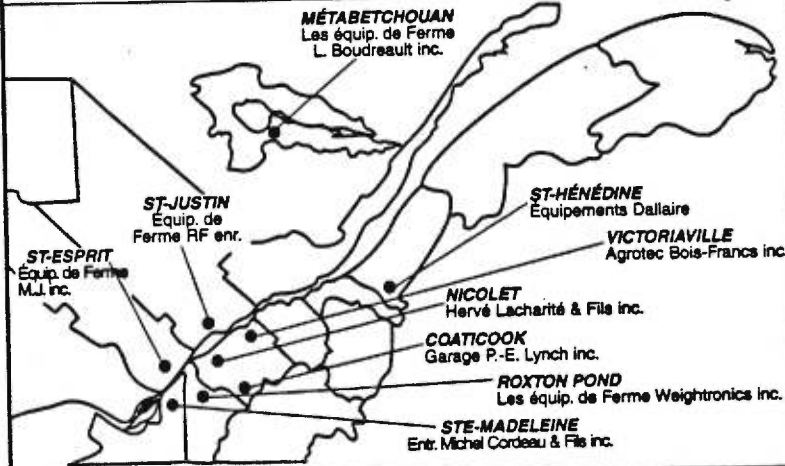


**RAD**  
Le plus important fabricant d'équipement de manutention et de transformation des grains.



**WEIGH-TRONIX**  
Le chef de file dans les systèmes de meunerie et de pesage.

**Informez-vous à votre représentant**



**MÉTABETCHOUAN**  
Les équip. de Ferme L. Boudreault inc.

**ST-JUSTIN**  
Equip. de Ferme RF enr.

**ST-ESPRIIT**  
Equip. de Ferme M.J. inc.

**ST-HÉNÉDINE**  
Equipements Dallaire

**VICTORIAVILLE**  
Agrotec Bois-Francis inc.

**NICOLET**  
Hervé Lacharité & Fils inc.

**COATICOOK**  
Garage P.-E. Lynch inc.

**ROXTON POND**  
Les équip. de Ferme Weightronics Inc.

**STE-MADELEINE**  
Entr. Michel Cordeau & Fils inc.

**RAD ÉQUIPEMENTS INC.**  
400 rue Martineau, St-Hyacinthe, (Qc) J2S 8B1  
Tél.: (514) 796-2626 / Fax: (514) 796-4256

### DES ESSAIS À POURSUIVRE

Dans l'ensemble, les résultats obtenus montrent qu'une bonne protection contre le sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae* a été obtenue à la suite de l'injection de LPS détoxiqué. En fait, cette protection était à peu près comparable à celle observée avec le vaccin commercial. Donc, une seule molécule, parmi les centaines constituant le germe, a permis de prévenir la mortalité causée par une infection. Cela confirme le rôle important des LPS d'*A. pleuropneumoniae* dans l'établissement de la maladie et leur importance dans la protection contre l'infection.

Il est possible qu'une dose plus importante de LPS ou l'ajout d'un autre adjuvant puisse augmenter l'efficacité du nouveau vaccin. Des recherches additionnelles seront nécessaires avant d'obtenir les réponses à ces questions. ♦

#### COLLABORATION

Christiane Girard, M. Sc., Dipl. ACVP, vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

#### REMERCIEMENTS

La réalisation de ce projet a été rendue possible grâce à l'appui financier de la Fédération des producteurs de porcs du Québec, du CRSNG et d'Agriculture et Agroalimentaire Canada.

#### RÉFÉRENCES

VAILLANCOURT, J., G.P. MARTINEAU, Robert HIGGINS et Serge LARIVIÈRE.

- «De la bactérie aux lésions», *Le médecin vétérinaire du Québec*, vol. 17, 1987, p. 125-130.
- «De la situation épidémiologique mondiale à celle du Québec», *Le médecin vétérinaire du Québec*, vol. 17, 1987, p. 189-193.
- «Du diagnostic à l'éradication», *Le médecin vétérinaire du Québec*, vol. 18, 1988, p. 15-23.

## Annexe 4

### Tableau de résultats additionelles

Protection des souris immunisées avec différentes préparations vaccinales et infectées avec une souche d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 ou de sérotype 5

Dans ce tableau, les préparations vaccinales suivis d'un astérisque (\*) sont des résultats additionelles qui n'apparaissent pas dans le Tableau 1 de l'article 1.

Tableau I. Protection des souris immunisées avec différentes préparations vaccinales et infectées avec une souche d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 ou de sérotype 5

Préparations vaccinales	Adjuvant <sup>a</sup>	Souche de sérotype 1			Souche de sérotype 5		
		Titre Anti-LPS (ELISA; Log <sub>10</sub> ) <sup>b</sup>	Nb. de souris survivantes <sup>c</sup>	% de survivantes	Nb. de souris survivantes <sup>c</sup>	% de survivantes	Nb. de souris survivantes <sup>c</sup>
Contrôle (PBS)	-	< 2.0	3/10	30	5/15	33	
Contrôle (PBS)	Quil A	ND	1/5	20	ND	ND	
LPS complet (15) <sup>d</sup>	-	2.0	1/5	20	4/10	40	
LPS complet (15)	Quil A	3.0 ± 0.71	3/5	60	1/5	20	
Noyau oligo.-lipide A (15) <sup>e</sup>	-	ND	1/5	20	1/5	20	
LPS détoxiqué(15)	-	< 2.0	1/10	10	4/10	40	
LPS détoxiqué(15)	Quil A	< 2.0	1/5	20	4/10	40	
LPS détoxiqué(15) <sup>*</sup>	Al(OH) <sub>3</sub>	ND	0/5	0	ND	ND	
LPS détoxiqué(15) <sup>*</sup>	Huile végétale	ND	3/10	30	2/5	40	
LPS détoxiqué(15) <sup>*</sup>	AJF	ND	7/9	78	0/5	0	
LPS détoxiqué(15) <sup>*</sup>	Emulsion E/H	ND	7/7	100	2/5	40	
LPS détoxiqué(15) <sup>*</sup>	TiterMax	ND	1/4	25	ND	ND	
LPS détoxiqué(15) <sup>*</sup>	RIBI	ND	1/4	25	ND	ND	

Tableau I. Suite.

O-polysaccharide-BSA (7.5)	-	1/4	25	ND	ND
O-polysaccharide-BSA (15)	-	3/15	20	5/15	33
O-polysaccharide-BSA (7.5)	Quil A	2/5	40	ND	ND
<b>O-polysaccharide-BSA (15)</b>	<b>Quil A</b>	<b>8/10</b>	<b>80</b>	<b>3/10</b>	<b>30</b>
O-polysaccharide-BSA (7.5)	Al(OH) <sub>3</sub>	1/4	25	ND	ND
O-polysaccharide-BSA (15)	Al(OH) <sub>3</sub>	6/10	60	2/5	40
O-polysaccharide-BSA (15)	Huile végétale	6/10	60	2/5	40
O-polysaccharide-BSA (15)	AIF	6/9	67	1/5	20
O-polysaccharide-BSA (15)	Emulsion E/H	3/10	30	1/5	20
O-polysaccharide-BSA (15)	TiterMax	2/4	50	ND	ND
O-polysaccharide-BSA (15)	RIBI	0/4	0	ND	ND
Préparation membranes externes	Quil A	4/5	80	1/5	20
Bactérine	Quil A	6/10	60	2/5	40
Bactérine	Al(OH) <sub>3</sub>	8/10	80 <sup>c</sup>	1/4	25

<sup>a</sup> AIF: Adjuvant incomplet de Freund; Emulsion E/H: Huile minérale/Tween 85/Span 85.

<sup>b</sup> Moyenne ± déviation standard; ND: Non déterminé.

<sup>c</sup> Le nombre total de souris est la somme des animaux testés en une ou plusieurs expériences.

<sup>d</sup> Le nombre correspond à la quantité de sucres injectés (en µg).

\* Résultats additionnels qui n'apparaissent pas dans le Tableau 1 de l'article 1 (p. 47).