

2011.2903.7

Université de Montréal

Caractérisation moléculaire et propriétés
biologiques de mutants LPS d'*Actinobacillus*
pleuropneumoniae sérotype 1

par

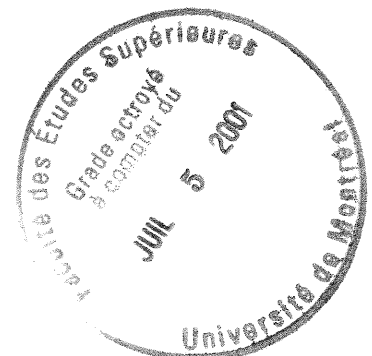
Josée Labrie

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

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

Décembre, 2000

©Josée Labrie, 2000



SF
607
U54
2001
N. 005

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Caractérisation moléculaire et propriétés
biologiques de mutants LPS d'*Actinobacillus*
pleuropneumoniae sérotype 1

présenté par:

Josée Labrie

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dre Josée Harel (président rapporteur)
Dr Mario Jacques (directeur de recherche)
Dr Marc Sirois (membre du jury)

Mémoire accepté le:

SOMMAIRE

Actinobacillus pleuropneumoniae est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine et il a été préalablement démontré que le lipopolysaccharide (LPS) est une adhésine importante de cette bactérie. Sept mutants issus de la souche de référence du sérotype 1 et exprimant des LPS rugueux ont été générés dans notre laboratoire en utilisant la technique de mutagenèse par transposition à l'aide du mini-Tn10. Le but de la présente étude était de caractériser ces mutants rugueux pour mieux comprendre la biosynthèse de l'antigène-O et l'organisation des gènes de biosynthèse sur le chromosome, de même que d'évaluer certaines propriétés de surface et la virulence chez le porc de ces mutants isogènes. Le gène inactivé chez chacun des mutants a été identifié par séquençage des régions adjacentes au site d'insertion du mini-Tn10 sur le chromosome. Nous avons identifié 4 différents cadres de lecture ouverts (ORFs), impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et situés sur 2 fragments *EcoRI* distincts. Ces 4 ORFs ont été identifiés à l'intérieur d'une région de 18 ORFs démontrant une homologie avec une région impliquée dans la biosynthèse de l'antigène-O spécifique de sérotype chez *A. actinomycetemcomitans* souche Y4 (sérotype b). Chez deux mutants, le mini-Tn10 était inséré dans un gène codant pour une protéine ayant un rôle au niveau du transfert d'un sucre (ORF12). Chez 2 autres mutants le produit du gène affecté par le transposon a démontré une homologie avec deux protéines distinctes ayant un rôle au niveau du transfert de rhamnose (ORF16 et ORF17). Finalement, chez les 3 derniers mutants le produit du gène muté présentait une homologie avec une protéine impliquée dans le transfert d'un galactose (ORF18). Ces 4 cadres de lecture ouverts se sont également avérés présents chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 9 et 11, lesquels expriment un antigène-O qui croise sérologiquement avec celui du sérotype 1. De plus, l'évaluation de plusieurs propriétés de surface semblent indiquer que l'absence de chaînes-O n'aurait pas d'influence sur la virulence de la bactérie chez le porc, de même que sur l'hydrophobicité et la charge de surface, la liaison de l'hémoglobine porcine et l'activité biologique des LPS de la bactérie dans un test LAL. Un mutant acapsulé a été incorporé à l'étude afin de comparer l'influence des chaînes-O et de la capsule polysaccharidique sur ces différentes propriétés de surface. Nos résultats suggèrent que les polysaccharides capsulaires auraient une influence beaucoup plus grande sur les propriétés de surface d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et sur sa virulence chez le porc, que les chaînes-O du LPS.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
DÉDICACE.....	ix
REMERCIEMENTS.....	x
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1. Généralités.....	4
1.1. Famille des <i>Pasteurellaceae</i>	4
1.2. Systématique.....	4
1.3. Caractéristiques bactériologiques.....	5
1.4. Caractères antigéniques.....	5
2. La pleuropneumonie porcine.....	5
2.1. Habitat et pouvoir pathogène.....	5
2.2. Signes cliniques et lésions.....	6
2.3. Diagnostic.....	8
2.4. Traitement.....	9
2.5. Prévention.....	9
3. Facteurs de pathogénicité.....	11
3.1. Polysaccharides capsulaires.....	11
3.2. Lipopolysaccharides.....	13
3.2.1. Structure des LPS.....	13
3.2.2. Fonction des LPS dans l'adhérence.....	15
3.2.3. La génétique des LPS.....	16
3.2.3.1. Le lipide A.....	16
3.2.3.2. Le noyau oligosaccharidique.....	17

3.2.3.3. L'antigène-O.....	19
3.3. Protéines de la membrane externe.....	21
3.4. Exotoxines.....	23
3.5. Autres facteurs de pathogénicité.....	26
4. Mutants d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	27
4.1. Mutants acapsulés.....	27
4.2. Mutants auxotrophes.....	28
4.3. Mutant superoxyde dismutase.....	28
4.4. Mutants Apx.....	28
4.5. Mutants uréase-négative.....	29
4.6. Mutants température-sensibles.....	30
4.7. Mutants LPS.....	30
III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....	32
Article 1:	
Labrie J., S. Rioux, M.M. Wade, F.R. Champlin, S. Holman, W.W. Wilson, C. Savoye, M. Kobisch, M. Sirois, C. Galarneau et M. Jacques. Identification of genes involved in biosynthesis of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants. (Soumis pour publication)	
IV. DISCUSSION.....	62
V. CONCLUSION.....	70
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	72
VII. ANNEXES.....	xi

LISTE DES TABLEAUX**Article 1**

Table 1. Bacterial strains and plasmids.....	52
Table 2. Primers used for PCR amplification <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 ORFs.....	53
Table 3. Predicted <i>A. pleuropneumoniae</i> gene products identified by the mini-Tn10 insertions in rough LPS mutants and similar proteins in the non-redundant sequence databases.....	54
Table 4. Comparaison of cell surface properties of various <i>A. pleuropneumoniae</i> mutants.....	55
Table 5. Virulence in pigs of <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 parent strain 4074 NaI ^r and rough mutant 27.1.....	56

LISTE DES FIGURES

Revue de la littérature

Figure 1. Schéma de la structure du lipopolysaccharide chez *Escherichia coli* K-12. Les groupements indiquent des substitutions partielles proposées: R1, phosphate; R2, KDO, rhamnose ou phosphoéthanolamine; R3, phosphate ou éthanolamine pyrophosphate; R4, phosphate; R5, heptose; R6, heptose ou GlcNAC (Modifiée selon Raetz et coll.(114)).....14

Figure 2. Organisation et fonction des gènes formant l'opéron *waa* d'*E. coli* K-12. Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes. (Modifiée selon Heinrichs et coll. (58)).....18

Figure 3. Organisation et fonction des gènes formant l'opéron *wb** (*rfb*) d'*E. coli* K-12 (A) et *Salmonella* Typhimurium (B). Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes. (Modifiée selon Raetz (114)).....21

Figure 4. Représentation schématique du génotype des toxines Apx et phénotypes retrouvés selon les sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Modifiée selon Frey (41)).....24

Article

Figure 1. Illustration of the genetic organization between (A) 18 ORFs of *A. pleuropneumoniae* 4074 NaI^r identified in this study; (B) ORFs in *A. actinomycetemcomitans* serotype-specific antigen region and its flanking regions (adapted from Yoshida et al., 1998). Arrows indicate the direction of the transcription. Asterisks indicate the different mini-Tn10 insertions in rough LPS mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1, while the numbers represent the respective mutants.57

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC:	cassette de liaison à l'ATP (ATP binding cassette)
Abe:	abequose
ABS:	albumine bovine sérique
ACP:	transporteur protéique acylé (acyl carrier protein)
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADP:	adénosine diphosphate
Apx:	toxines RTX d' <i>A. pleuropneumoniae</i>
ATP:	adénosine triphosphate
bp:	paire de base (base pair)
°C:	degré Celsius
CDP:	cystidine diphosphate
CPS:	polysaccharide capsulaire
DO:	densité optique
dTDP:	désoxythimidine diphosphate
ELISA:	enzyme linked immuno-sorbent assay
Gal:	galactose
GalNAc:	N-acétyl-D-glucosamine
GDP:	guanidine diphosphate
Glc:	glucose
Hb:	hémoglobine
Hep:	heptose
IgA:	immunoglobuline A
IPTG:	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kDa:	kilodalton
KDO:	acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique
LAL:	<i>Limulus</i> amebocyte lysate
Man:	mannose
NAD:	nicotinamide adenine dinucléotide
O:	antigène-O
OMP:	protéines de la membrane externe (outer membrane protein)
ONPG:	σ -nitrophényl- β -D-galactopyranoside

- ORF:** cadre de lecture ouvert (open reading frame)
- RBS:** site de liaison du ribosome
- Rha:** rhamnose
- RTX:** toxines ayant des répétitions dans le domaine structural (repeats in the structural toxin)
- SD:** déviation standard
- SOD:** superoxyde dismutase
- Tbp:** protéine qui lie la transferrine (transferrin-binding protein)
- TDP:** thymidine diphosphate
- UDP:** uridine diphosphate
- Und-P:** undecaprénil-phosphate

"Ce n'est pas dans la science qu'est le bonheur,
mais dans l'acquisition de la science"
(Edgar Allan Poe, Puissance de la parole)

À Carl, merci de partager ma vie
À ma famille qui m'a permis d'être ce que je suis
À mes amies à qui je dois beaucoup.... Stanisma Panajame!

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:

-Dr Mario Jacques, professeur titulaire, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal et directeur de mon projet de maîtrise pour la confiance, les précieux conseils et le soutien financier qu'il m'a offerts tout au long de mon projet;

-Dre Josée Harel, professeur titulaire, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal pour ses conseils en biologie moléculaire, pour avoir participé à mon comité conseil et pour avoir bien voulu être la présidente de mon jury d'évaluation de mémoire;

-Dr Khali R. Mittal, professeur titulaire, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal pour avoir participé à mon comité conseil;

-Dr Franklin R. Champlin, Dr. W. William Wilson, Dre Marylène Kobisch, Stéphane Rioux, Mary Margaret Wade, Steven C. Holman, Florence Héreault et Chantal Savoye pour leur précieuse collaboration à mon projet;

-les étudiantes du laboratoire pour les discussions et les conseils judicieux;

-le Fond pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) et le GREMIP pour leur appui financier.

I. INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une maladie causant des pertes économiques importantes à l'industrie porcine (135; 147). L'adhérence de micro-organismes à la surface des cellules de l'hôte représente une étape importante de la pathogenèse d'infections bactériennes. Des études ont démontré que le LPS était une adhésine importante d'*A. pleuropneumoniae* (12; 14; 69; 71; 104). De plus, la partie polysaccharidique du LPS a été identifiée comme étant la région responsable de l'adhérence de la bactérie aux cellules des voies respiratoires du porc (104). L'utilisation de mutants LPS a indiqué que la présence de l'antigène-O ne semble pas essentielle à l'adhérence de la bactérie; par contre un noyau oligosaccharidique intact semble requis (51; 122). Récemment, il a été démontré que le LPS d'*A. pleuropneumoniae* pouvait lier l'hémoglobine porcine et pourrait donc jouer un rôle dans l'acquisition du fer chez ce micro-organisme (6; 11).

La génétique d'*A. pleuropneumoniae* est très peu connue, notamment en ce qui concerne les gènes de biosynthèse du LPS. Des mutants LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 obtenus dans notre laboratoire ont permis de mieux comprendre la mécanique d'action des LPS dans la pathogénie de la bactérie et ont aussi permis d'identifier certains gènes impliqués dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique du LPS (51; 122). Cependant, rien n'est encore connu en ce qui concerne les gènes de biosynthèse de l'antigène-O chez *A. pleuropneumoniae*, leur organisation sur le chromosome et leur distribution parmi les sérotypes. Sept mutants issus de la souche de référence du sérotype 1 et exprimant des LPS rugueux ont été préalablement générés dans notre laboratoire en utilisant la technique de mutagenèse par transposition à l'aide du mini-Tn10 (122). L'objectif de cette étude consiste donc en la caractérisation de ces mutants rugueux dans le but d'identifier les gènes de biosynthèse de l'antigène-O d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et leur organisation sur le chromosome, de même que d'évaluer certaines propriétés de surface et la virulence chez le porc de ces mutants isogènes.

II. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Généralités

1.1. Famille des *Pasteurellaceae*

La pleuropneumonie porcine est une des principales maladies d'origine bactérienne en production porcine. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, est une bactérie faisant partie de la famille des *Pasteurellaceae*. Cette dernière est constituée des genres: *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella* et *Mannheimia*. Tous sont pathogènes pour une grande variété d'animaux, y compris l'homme, et causent diverses maladies caractéristiques. Ma revue de littérature ne concernera qu'*A. pleuropneumoniae*, la bactérie sur laquelle porte mon projet de maîtrise.

1.2. Systématique

En 1957, Pattison et coll. (106) isolent de lésions de pleuropneumonie porcine, une bactérie exigeante en NAD (nicotinamide-adénine-dinucléotide) qui sera dénommée *Haemophilus-like* avant d'être inscrite sur la liste officielle des dénominations bactériennes sous le nom de *Haemophilus pleuropneumoniae* (140; 160). Puis, en 1978, Bertschinger et Seifert (20) isolent de cas de pleuropneumonie une bactérie non exigeante en NAD, ressemblant à *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* et appelée *Pasteurella haemolytica-like*.

Ces deux bactéries présentent des analogies phénotypiques, et par hybridation ADN-ADN, Pohl et coll. (110) montrent que ces bactéries appartiennent à une espèce unique, que cette nouvelle espèce est fortement apparentée à *Actinobacillus lignieresii* et est éloignée de l'espèce type du genre *Haemophilus (Haemophilus influenzae)*. Compte tenu de ces données, ils proposent de créer un nouveau taxon, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, comprenant 2 biotypes: le biotype 1 pour les souches NAD-dépendantes et le biotype 2 pour les souches NAD-indépendantes. Ce dernier type requiert cependant la présence de certains précurseurs du NAD (103).

1.3. Caractéristiques bactériologiques

Actinobacillus pleuropneumoniae est un petit cocobacille ou un petit bacille, Gram négatif, non sporulé, non mobile, capsulé, se présentant de manière isolée, en paires ou en courtes chaînes. La bactérie est anaérobie facultative et son métabolisme est de type fermentatif. Un caractère positif est noté pour l'oxydase, l'uréase généralement rapide et intense (exceptionnellement, il est possible d'isoler des variants uréase négative), l'ONPG, la réduction des nitrates et des nitrites, la phosphatase alcaline, l'acidification du fructose, du mannose, du saccharose et du xylose. Sur gélose au sang de mouton, on note une étroite zone d'hémolyse, complète pour le biotype 1 et plus faible pour le biotype 2. La taille de la zone d'hémolyse est augmentée par l'hémolysine bêta des staphylocoques (ou réaction de CAMP: Christie, Atkin, Munch-Peterson) (82; 95).

1.4. Caractères antigéniques

La structure des polysaccharides capsulaires (65; 100) et la structure du lipopolysaccharide (LPS) (125) permettent de décrire 12 sérotypes numérotés de 1 à 12. Les sérotypes 1 à 5 ont été identifiés par Kilian et coll. en 1978 (83). Les sérotypes 1 et 5 ont eux-mêmes été subdivisés en 1a et 1b (77), et 5a et 5b (101) d'après la structure des antigènes capsulaires. Ensuite ce furent les sérotypes 6 et 7 (130), 8 (102), 9 (98), 10 (99), 11 (79) et 12 (100) qui furent proposés. Les 12 sérotypes se rencontrent au sein du biotype 1 alors que seuls les sérotypes 2 et 9 sont retrouvés chez les souches du biotype 2. Quelques sérotypes montrent une similarité au niveau de l'antigène-O de leur LPS, ce qui expliquerait les réactions croisées observées entre les sérotypes 1, 9 et 11 ; les sérotypes 3, 6, et 8 ; et les sérotypes 4 et 7 (107; 147).

2. La pleuropneumonie porcine

2.1. Habitat et pouvoir pathogène

Actinobacillus pleuropneumoniae est un parasite de l'appareil respiratoire du porc et il n'a été isolé ni de l'homme, ni des oiseaux, ni des rongeurs (96). Il est l'agent de la

pleuropneumonie porcine (135; 147), maladie retrouvée dans tous les pays où l'élevage porcin est très développé. La pleuropneumonie est une des affections majeures en élevage porcin, est largement distribuée dû à l'industrialisation de la production porcine et cause de grandes pertes économiques pour les producteurs. Même si quelques sérotypes prévalent dans certains pays comme par exemple le sérotype 2 en Suisse, au Danemark et en Suède et les sérotypes 1, 5 et 7 au Canada et aux États-Unis (91; 147), la prévalence des sérotypes varie d'une région à l'autre et peut également varier dans le temps pour une région donnée (34).

2.2. Signes cliniques et lésions

La survie de l'organisme dans l'environnement est considérée de courte durée. Cependant, lorsque protégée par une substance organique telle que le mucus par exemple, la bactérie peut survivre quelques jours. La transmission par voie indirecte joue un rôle important lorsque la maladie évolue sur un mode aigu et que le germe est excrété massivement dans les sécrétions nasales. La contamination d'un élevage résulte de l'introduction d'un porteur sain ou, éventuellement, d'une contamination par voie aérienne. Dans certains cas d'infection subclinique, le germe reste localisé aux amygdales ou à la cavité nasale et les animaux ainsi infectés peuvent ne pas produire d'anticorps. Les facteurs prédisposants (changement de température, humidité, ventilation défectueuse, surpeuplement,...) ont une influence majeure sur le cours de la maladie. Les taux de morbidité et de létalité sont également influencés par le statut immunitaire des animaux et lorsque la bactérie est introduite dans un troupeau dépourvu de toute immunité, l'infection est extrêmement contagieuse. Inversement, dans les porcheries chroniquement infectées, la maladie est souvent non apparente mais, à l'abattage, on note un taux élevé de lésions de pleurésie chronique. La maladie touche tous les animaux et notamment les porcs à l'engrais âgés de plus de 12 semaines et les porcelets. Après une durée d'incubation variant de quelques heures à quelques jours, la maladie évolue sous 3 formes cliniques principales soient les formes suraiguë, aiguë et chronique.

- La forme suraiguë sévit dans les cheptels nouvellement infectés. Elle débute par des signes généraux graves (hyperthermie de l'ordre de 41 à 42°C, abattement, anorexie) et

éventuellement par de la diarrhée et des vomissements de courte durée. Les animaux se couchent, la peau est cyanosée, on assiste à un choc circulatoire et en phase terminale on note une dyspnée sévère (parfois, l'animal cherche à compenser cette dyspnée en respirant par la bouche en position assise). La mort survient généralement entre 24 et 36 heures. Des cas de mort subite, sans symptôme préalable (147), sont régulièrement observés notamment chez les porcs charcutiers. Le taux de mortalité compris entre 15 et 40 p.cent dépend de la virulence de la souche, de la densité de l'inoculum, des conditions d'élevage et du statut immunitaire des animaux.

- La forme aiguë présente une évolution moins rapide et peut déboucher sur une forme chronique. Les animaux ont une température rectale de 40,5 à 41°C, ils sont abattus, anorexiques, et présentent un syndrome respiratoire grave avec dyspnée et toux. L'évolution clinique est très variable d'un animal à un autre et les porcs qui survivent demeurent porteurs et excréteurs de germes.

- La forme chronique est difficile à caractériser. On note des retards de croissance et une toux sporadique. La bactérie est présente dans des lésions pulmonaires nécrotiques et peut envahir les voies respiratoires et les amygdales. Les lésions sont principalement localisées à l'appareil respiratoire. Des lésions de pleurésie sérofibrineuse et de pneumonie nécrotique et fibrino-hémorragique, bilatérale, sous forme de foyers bien délimités, sont observées sur les lobes cardiaques, apicaux et au moins partiellement sur les lobes diaphragmatiques. Au début de la maladie on observe des changements histopathologiques tels nécrose, hémorragie, infiltration de neutrophiles, activation des macrophages et des plaquettes, thrombose vasculaire et oedème. De plus, la trachée et les bronches sont remplies d'un exsudat mousseux et sanguinolent (1618; 86). Dans les formes chroniques, des nodules entourés d'une épaisse capsule de tissu conjonctif et des foyers de nécrose sont visibles notamment sur les lobes diaphragmatiques. Les lésions nécrotiques peuvent héberger des bactéries durant plusieurs mois et les animaux peuvent transmettre l'infection. Des lésions de pleurésie fibrineuse se développent et, lors de guérison, elles sont souvent les seules lésions visibles à l'abattoir si bien que la mise en évidence d'un pourcentage de lésions de pleurésie chronique à l'abattage doit faire soupçonner l'infection de l'élevage par *A. pleuropneumoniae*.

2.3. Diagnostic

L'isolement de *A. pleuropneumoniae* à partir de lésions est relativement aisé. Chez les animaux ne présentant pas de lésions, l'isolement est plus délicat, car le germe est généralement présent dans les amygdales ou dans les cavités nasales qui sont souvent fortement contaminées par d'autres bactéries. Les amygdales sont prélevées à l'abattoir, lors d'une autopsie ou encore sur animaux vivants à la faveur d'une biopsie. Le diagnostic indirect est largement utilisé pour le dépistage mais il peut poser certains problèmes. Tout d'abord, on note que la sensibilité n'est pas toujours bonne, car le portage ou l'infection subclinique ne conduisent pas toujours à la synthèse d'anticorps en quantité suffisante pour être détectés. De plus, la spécificité est parfois faible et des réactions croisées existent entre *A. pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Escherichia coli*, et même avec d'autres bactéries à Gram négatif. Enfin, les anticorps détectés sont spécifiques de sérotypes mais des réactions croisées sont notées entre plusieurs sérotypes (8890). Certains tests sérologiques sont néanmoins utilisés tels le test de la fixation du complément et l'ELISA (37). La spécificité et la sensibilité varient selon les tests; la fixation du complément possède une haute spécificité et une faible sensibilité et l'ELISA possède généralement une forte sensibilité et une faible spécificité. Par contre, des études ont été réalisées récemment afin d'augmenter la spécificité de la technique d'ELISA en employant les longues chaînes de LPS (9; 55; 85; 113; 142). La sérotypie se fait grâce à un test de coagglutination (92; 93) ou un test à l'aide d'anticorps fluorescents (147).

Plus récemment, une technique de séparation immunomagnétique pour l'isolation sélective d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 a été développée (50). Des billes de polystyrène superparamagnétiques (billes immunomagnétiques) ont été couplées avec des immunoglobulines G purifiées de lapin, spécifiques à *A. pleuropneumoniae* sérotype 1. La sensibilité de cette technique a été démontrée comme étant 1000 fois supérieure à celle de cultures directes (50). Cette méthode représente donc une approche innovatrice et très sensible pour l'isolement de cette bactérie des animaux porteurs.

2.4. Traitement

On peut combattre l'infection grâce aux antibiotiques. Les plus actifs sont les quinolones (danofloxacin et enrofloxacin) et les céphalosporines (ceftiofur) (152; 153). Cependant, depuis quelques années, des résistances acquises ont été notées particulièrement vis-à-vis des tétracyclines et de l'érythromycine (158). Les antibiotiques réduisent le taux de mortalité et permettent de retrouver un gain de poids normal mais ils ne suppriment pas l'état de porteur. On doit donc séparés les porcelets des mères, les placer dans un endroit propre et les traiter avec de fortes doses d'antibiotiques. Par la suite, les animaux plus âgés de l'élevage sont éliminés progressivement au moment le moins préjudiciable pour l'éleveur.

2.5. Prévention

Quelles que soient les techniques de prévention utilisées, le contrôle des facteurs prédisposants (contrôle de la ventilation, conduite en bande unique, nettoyage, désinfection, diminution de la densité...) est essentiel pour la réussite. Les techniques sérologiques permettent de détecter les porteurs sains et donc d'éliminer les animaux infectés et de prévenir l'introduction d'un animal infecté au sein d'un troupeau. L'élimination de ces porteurs chroniques, le repeuplement à partir d'animaux indemnes et la quarantaine sont les éléments fondamentaux de la prophylaxie sanitaire (147).

De nombreux travaux ont été consacrés à la vaccination mais de plusieurs problèmes restent à résoudre avant d'obtenir le vaccin idéal :

- Les facteurs de virulence de *A. pleuropneumoniae* sont nombreux ce qui complique la mise au point de vaccins sous-unitaires parfaitement efficaces. De plus, étant donné que les vaccins sont fabriqués à partir d'un sérotype spécifique et qu'il n'y a pas ou peu d'immunité croisée contre tous les sérotypes (60), il est extrêmement difficile d'obtenir une protection complète. Plusieurs investigateurs ont démontré qu'un certain degré de protection était observable lors de l'utilisation d'antigènes capsulaires, de protéines de la membrane externe ou de toxines RTX d'*A. pleuropneumoniae* (34; 52; 64; 112; 131).

Une diminution de la mortalité de même que de la morbidité a pu être observée grâce à l'utilisation de ces vaccins, mais aucun n'a entraîné un contrôle satisfaisant de la maladie. Lorsque les porcs sont vaccinés avec une préparation de cellules, on ne remarque que peu ou pas de réponse en anticorps contre les LPS d'*A. pleuropneumoniae* comparativement aux animaux en convalescence qui présentent un fort taux d'anticorps anti-LPS (39). Cependant, il a été démontré que des souris immunisées avec différentes préparations de LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 étaient protégées lors d'une réexposition à ce même sérotype (121). Rioux et coll. (124) ont voulu évaluer la protection des porcs contre une infection expérimentale à *A. pleuropneumoniae* suite à une immunisation avec l'une des préparations suivantes: LPS détoxiqués, conjugué polysaccharide O-ABS (albumine bovine sérique) ou bactérine commerciale. Ils ont démontré que la meilleure protection était observée avec la bactérine commerciale mais les résultats indiquent aussi qu'une protection comparable peut être notée avec les LPS détoxiqués confirmant ainsi le rôle important des LPS d'*A. pleuropneumoniae* dans la protection contre la pleuropneumonie porcine. De plus amples études seraient cependant nécessaires afin d'améliorer la protection des porcs, en particulier en réussissant à induire une protection croisée entre les différents sérotypes.

D'autres études ont été consacrées aux vaccins sous-unitaires, constitués des trois toxines Apx et d'une protéine de membrane externe ou de plusieurs antigènes capsulaires. Ces vaccins ont des avantages théoriques importants car ils confèrent une protection contre tous les sérotypes. Les résultats du terrain montrent qu'ils permettent de réduire l'intensité des signes cliniques, de réduire la sévérité des lésions, d'augmenter les performances et de réduire le coût des traitements. Expérimentalement, les résultats sont similaires mais ces vaccins n'empêchent pas toujours la colonisation des voies respiratoires par la souche d'épreuve puisque, dans une étude récente (27), 12 animaux vaccinés sur 18 hébergent *A. pleuropneumoniae*. La mise au point d'un vaccin efficace est donc encore sous investigation.

3. Facteurs de pathogénicité

La pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae*, comme beaucoup d'autres bactéries pathogènes d'ailleurs, est multifactorielle. Différents facteurs de virulence incluant les polysaccharides capsulaires (67), les lipopolysaccharides (39), les exotoxines (hémolysines et cytotoxines) (119; 145), les protéines membranaires (53; 116) et les facteurs d'adhésion (36) jouent un rôle important dans la pathogénicité (19; 38; 56; 62; 63; 97). Des différences de virulence entre les sérotypes et même à l'intérieur du même sérotype ont souvent été observées (23; 33; 132). On suggère que ces différences soient dues à la structure de la capsule (70), à la composition du LPS (76) ou au type d'hémolysine (47).

3.1. Polysaccharides capsulaires

La spécificité des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* est déterminée par les polysaccharides capsulaires (65) et mise en évidence à l'aide de diverses techniques telles l'agglutination et la coagglutination (93). Ces polysaccharides sont formés d'unités répétées d'oligosaccharides chargées négativement dû aux acides carboxyliques ou aux phosphates (107). La composition et la structure de la capsule de tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ont été déterminées par l'équipe de Perry en 1990 (107). La capsule d'*A. pleuropneumoniae* est d'une épaisseur variant de 80 à 230 nm dépendant du sérotype. Jacques et coll. (70) ont suggéré que la différence dans la quantité de polysaccharides capsulaires pourraient expliquer des variations dans la virulence notée entre les sérotypes. Le matériel capsulaire purifié n'a aucune activité biologique (40). Cependant, certaines évidences suggèrent que la capsule est essentielle pour la virulence d'*A. pleuropneumoniae in vivo*. La capsule joue un rôle important car elle protège les bactéries de la phagocytose (64) et est considérée comme étant la barrière de défense principale de la bactérie contre les mécanismes humoraux de l'hôte (64; 134).

L'importance de la capsule est illustrée par l'étude de souches ou de mutants dépourvus de capsule ou possédant un matériel capsulaire très réduit. Des études ont démontré que des mutants acapsulés du sérotype 5a d'*A. pleuropneumoniae* sont tués par le sérum de

porc normal et sont sensibles à l'activité de la voie alterne du système du complément (155; 157). Ils ont également une très faible virulence et sont rapidement éliminées. Les souches capsulées quant à elles résistent à l'attaque du complément retrouvé dans le sérum de porc (64; 155). Par contre, un mutant acapsulé du sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae* obtenu par Rioux et coll. (123) a démontré une résistance au sérum de porc normal, comparable à la souche mère, démontrant ainsi l'implication et l'importance des antigènes-O du LPS dans la résistance au sérum. On sait également que le matériel capsulaire ne prévient pas l'activation du complément (149; 155) ou de C3 (un des composants impliqué dans la cascade du complément) mais limite la quantité d'anticorps et l'accumulation de C9 qui se dépose à la surface bactérienne (155).

Récemment, Ward et Inzana (156) ont identifié, cloné et séquencé une région d'ADN impliquée 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'*H. influenzae* type b, une bactérie apparentée. Cette région d'ADN consiste en 4 gènes, désignés *cpxABCD*, qui démontrent un haut degré d'homologie avec le groupe de gènes responsable de l'exportation des polysaccharides capsulaires de groupe II d'*H. influenzae* type b (*bexDCBA*) et de *Neisseria meningitidis* group b (*ctrABCD*). Cette homologie suggère qu'*A. pleuropneumoniae* synthétiserait également une capsule de groupe II. L'étude de l'ADN en amont de cet opéron a révélé la présence de 4 gènes spécifiques pour la biosynthèse de la capsule du sérotype 5a (157). Trois démontrent une faible homologie avec des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des LPS ou des polysaccharides capsulaires de plusieurs bactéries et le quatrième gène présente une forte homologie avec les protéines KdsA (acide 3-déoxy-D-manno-2-octulosonique 8-phosphate synthétase) de d'autres bactéries à Gram négatif (157). L'étude approfondie des gènes impliqués dans l'exportation et la biosynthèse a permis de confirmer le rôle de cette dernière dans la résistance au sérum déterminé par cette même équipe.

3.2. Lipopolysaccharide (LPS)

3.2.1. Structure des LPS

Les LPS sont des molécules complexes faisant partie de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS (ou endotoxine) est composé de trois parties bien définies: le lipide A, le noyau oligosaccharidique et la chaîne O-spécifique. Les deux derniers composants forment la partie polysaccharidique, laquelle est reliée à la partie lipidique (Figure1, p.14). Le composant lipidique des endotoxines, nommé lipide A, est en fait le principal constituant de la couche externe de la membrane externe des cellules bactériennes. Il est responsable du pouvoir toxique et du pouvoir immunostimulant des endotoxines et malgré sa complexité, il a été démontré que le lipide A tout entier est nécessaire à l'activité biologique optimale des endotoxines. La structure du LPS d'*A. pleuropneumoniae* n'est connue que pour l'antigène-O (107); des travaux sont en cours afin de déterminer celle du noyau oligosaccharidique (M. Monteiro et M. Perry, communications personnelles).

Le noyau oligosaccharidique est composé d'un noyau interne (la partie liée au lipide A) et d'un noyau externe (la partie liée à la chaîne O-spécifique). Le noyau interne est composé de deux sucres inhabituels: l'heptose, qui possède 7 atomes de carbone, et le KDO (l'acide 2-céto-3-désoxyoctonoïque). Le KDO (un octose) est un sucre unique toujours présent dans les LPS. Le noyau externe est pour sa part composé d'hexoses. Il a été démontré que la plus grande diversité du noyau oligosaccharidique se situe dans la partie du noyau externe (69).

Dans une étude récente, Jacques et coll. (72) ont démontré que 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. Ils ont également observé que ces deux types électrophorétiques étaient aussi antigéniquement différents. Ainsi leurs résultats, basés sur la mobilité électrophorétique et l'antigénicité, suggèrent la présence de deux types de

noyau oligosaccharidique chez les LPS d'*A. pleuropneumoniae*. Ces différences de mobilité et d'antigénicité reflètent probablement des différences dans la composition ou dans la structure du noyau externe, habituellement composé d'hexoses, étant donné que le noyau interne est pour sa part généralement bien conservé.

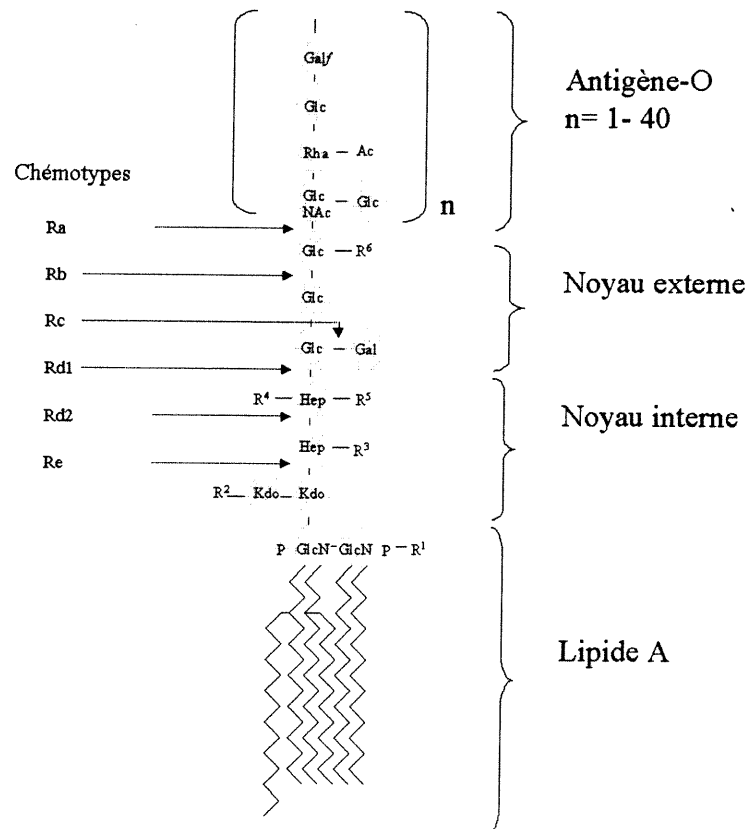


Figure 1. Schéma de la structure du lipopolysaccharide chez *Escherichia coli* K-12. Les groupements indiquent des substitutions partielles proposées: R1, phosphate; R2, KDO, rhamnose ou phosphoéthanolamine; R3, phosphate ou éthanolamine pyrophosphate; R4, phosphate; R5, heptose; R6, heptose ou GlcNAc (Modifiée selon Raetz et coll. (114)).

La chaîne O-spécifique est le segment le plus variable de l'endotoxine. Elle consiste en un polymère d'unités répétées comprenant de 1 à 8 résidus glycosyl (69). Ainsi, la présence et le nombre d'unités répétées d'antigène-O, déterminent le profil du LPS sur gel d'électrophorèse (25; 39; 107). Une souche bactérienne présentant de longues chaînes est dite lisse et une sans antigène-O, rugueuse; certaines souches ne présentant

pas toutes les longueurs de chaînes d'une souche lisse sont dites semi-rugueuses (par exemple les sérotypes 2, 4 et 7 d'*A. pleuropneumoniae* ont un LPS lisse, les sérotypes 1 et 5 ont un LPS semi-rugueux et les sérotypes 3 et 6 ont un LPS rugueux). Certains LPS ne présentent pas d'antigène-O et sont appelés lipo-oligosaccharides (LOS) (87).

3.2.2. Fonction des LPS dans l'adhérence

La colonisation des muqueuses de l'hôte est l'étape initiale de l'infection par un micro-organisme. Les bactéries possèdent des molécules ou structures de surface (appelées adhésines) capable de se lier de façon spécifiques à d'autres molécules (appelés récepteurs) situées à la surface des muqueuses de l'hôte (32; 71). L'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* au mucus du tractus respiratoire porcine (14) et aux cellules épithéliales de la trachée (12) a été attribué aux LPS. Le LPS joue donc un rôle dans les mécanismes d'adhésion :

- 1) le LPS adhère à des anneaux de trachée de porcelet maintenus en culture ainsi qu'à l'endothélium vasculaire et au mésenchyme de coupes de poumons (12; 13). De plus, des différences d'adhésion sont observées entre les 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*; par exemple les sérotypes 2 et 7 (LPS lisses) adhèrent fortement, tandis que les sérotypes 1 et 5 (LPS semi-rugueux) adhèrent plus faiblement (12). Il a ensuite été démontré que les LPS de haut poids moléculaires sont principalement impliqués dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules des voies respiratoires, par contre le lipide A ne serait pas impliqué;
- 2) le LPS purifié inhibe l'adhésion d'*A. pleuropneumoniae* et cette inhibition est due à la partie polysaccharidique (104);
- 3) le LPS d'*A. pleuropneumoniae* peut lier des protéines de 10 et de 11 kDa qui se retrouvent dans les sécrétions des voies respiratoires du porc (13) et ces protéines présentent une forte homologie avec les chaînes alpha et bêta de l'hémoglobine porcine (11). Ces recherches ont également mené à l'identification du lipide A comme site de liaison de l'hémoglobine;

4) en dépit de la présence d'une capsule, le LPS est exposé à la surface (104) de la bactérie notamment au niveau de vésicules de membrane externe (ou "blebs") faisant saillie à travers la capsule et il peut donc interagir avec des récepteurs cellulaires, mais l'adhésion au mucus est meilleure lorsque les souches possèdent une capsule peu épaisse. L'intensité de cette adhésion dépend de la structure du LPS et les cellules ayant un LPS de type lisse adhèrent en plus grand nombre que les cellules ayant un LPS de type semi-rugueux (12).

3.2.3. La génétique des LPS

3.2.3.1. Le lipide A

Le lipide A est relativement bien conservé parmi les différentes bactéries à Gram négatif et la plupart des caractéristiques de la voie de biosynthèse du lipide A de *E. coli* sont également bien conservées. La biosynthèse du lipide A est sous le contrôle de quatre gènes: *lpxA*, *B*, *C* et *D*. La première étape consiste au transfert d'une chaîne d'acide gras du R-3-hydroxymyristoyl-ACP au groupement 3-OH de l'UDP-GlcNAc. L'acylation est codée par le produit du gène *lpxA*, l'UDP-GlcNAc acyltransférase (3; 4; 29). Par la suite, il y a déacylation de cette molécule et transfert d'une seconde chaîne d'acide gras (du R-3-hydroxymyristoyl-ACP) au groupement aminé pour former le UDP-2,3-diacylglucosamine; précurseur du sucre du lipide A.

La déacylation est codée par le gène *lpxC* (164) et comme *lpxA*, *lpxC* est essentiel pour la croissance de *E. coli*. La N-acyltransférase est catalysée par le produit du gène *lpxD* (81). Si le UDP est clivé d'un des deux pyrophosphates, on retrouve alors le 2,3-diacylglucosamine-1-phosphate, mieux connu sous le nom de lipide X.

La réaction qui forme le corps du lipide A implique la liaison d'une molécule de UDP-2,3-diacylglucosamine avec une molécule de lipide X pour former un lien β ,1'-6 entre les deux glucosamines retrouvés dans les molécules du lipide A de tous les LPS connus. Chaque sucre est substitué par deux groupements 3-hydroxymyristoyl qui portent un résidu unique de phosphate à la position 1 du sucre réducteur. Cette réaction de liaison est catalysée par le produit du gène *lpxB* (31).

L'étape suivante consiste en l'addition d'un phosphate à la position 4' par une kinase spécifique générant ainsi le lipide IV_A (117). Ce dernier liera deux molécules de KDO préalablement formées à partir de phosphoénolpyruvate et d'arabinose-5-P et formera le KDO₂-lipide IV_A. Dans les dernières étapes, des résidus laurate et myristate sont incorporés au lipide IV_A par deux enzymes, la lauroytransférase (codée par le gène *waaM -htrB-*) (28) et l'acyltransférase (codée par le gène *waaN -msbB-*) (28). Le produit final est le KDO-lipide A qui servira par la suite à la liaison avec les autres sucres du noyau oligosaccharidique. Le lipide A seul n'existe pas chez les cellules, le LPS minimal requis pour la viabilité bactérienne (chemotype Re; Figure 1, p.14) (114) est constitué du lipide A glycosylé et de deux résidus d'acides 2,3-déoxy-D-manno-octulosonic (KDO).

3.2.3.2. Le noyau oligosaccharidique

La biosynthèse du noyau oligosaccharidique est sous le contrôle de l'opéron *waa* (*rfa*). Or, chez *E.coli*, la région *waa* consiste en 14 gènes organisés en deux opérons majeurs transcrits en des directions opposées mais convergentes (Figure 2, p.18) (8; 126). Un petit opéron contenant le gène impliqué dans l'attachement du KDO (*waaA*, anciennement *kdtA*) (15) et le gène *orf18* (de fonction inconnue), est situé immédiatement à côté du plus grand opéron *waa*. Ce dernier débute avec le gène *waaQ* (*rfaQ*) et est régulé par le gène *waaH* (*rfaH*) (situé à l'extérieur de la région *waa*) (111). Les gènes *waaGBIJK* seraient impliqués au niveau de l'attachement séquentiel de résidus glucose et galactose au niveau de la biosynthèse de la région externe du noyau oligosaccharidique. Le rôle des gènes *waaQ*, *-S*, *-Y*, *-Z*, et *-K* d'*E.coli* et de souches de *Salmonella* est encore incertain (105; 141). Chez *E.coli*, *waaQ* pourrait coder pour une heptosyltransférase additionnelle qui attache un des résidus héptose au noyau. Chez *Salmonella*, *waaK* pourrait pour sa part coder pour une enzyme qui lie le GlcNAc au noyau externe (138). Cette liaison serait apparemment requise pour l'attachement subséquent de l'antigène-O (138). Les gènes *waaS* et *waaZ* pourraient être requis pour la formation d'un noyau alternatif- nommé lipooligosaccharide.

Le plus petit opéron *waa* débute par *waaD*, code pour quatre gènes (*DFCL*) et est sous un contrôle de type thermique (115). Les gènes *waaD*, *waaC* et *waaF* sont impliqués dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique interne. Le gène *waaD* code

pour une ADP-heptose épimérase (30). Des mutants au niveau de ce gène ont en effet démontré une déficience dans l'épimérisation de l'ADP-D-glycéro-D-manno-heptose en ADP-L-glycéro-D-manno-heptose. Les gènes *waaC* et *waaF* codent pour des transférases qui ajoutent respectivement le premier et le deuxième résidus heptose sur la molécule KDO₂-lipide A (124). Or, une certaine homologie de séquences au niveau protéiques entre ces gènes et *rfaQ* et *kdtA* laissent présager le fait que ces quatre protéines peuvent être considérées comme appartenant à des familles voisines qui auraient présumément un rôle au niveau du transfert de sucres au niveau de la région noyau interne-lipide A.

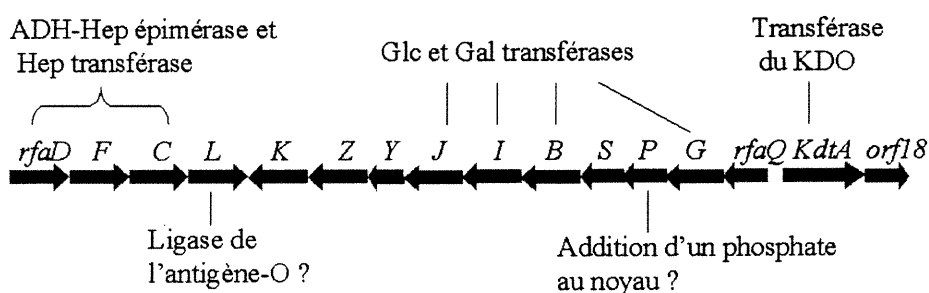


Figure 2. Organisation et fonction des gènes formant l'opéron *waa* d'*E. coli* K-12. Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes. (Modifiée selon Heinrichs et coll. (58))

De tous les gènes de la région *waa*, seulement *waaA* et *waaL* (ligase probable de l'antigène-O) possèdent des domaines transmembranaires. Le noyau complet est probablement assemblé du côté cytoplasmique de la membrane interne avant la translocation à la surface périplasmique et l'attachement de l'antigène-O. Cependant, l'assemblage complet du noyau n'est pas nécessaire pour la translocation considérant le fait que le LPS Re est exporté à un niveau tout à fait normal.

Plusieurs gènes qui participent à la biosynthèse du noyau oligosaccharidique sont situés à l'extérieur de la région *waa*. On retrouve le gène *waaH* qui contrôle le gène *waaQ*, le gène *waaE* qui est requis pour la fabrication de l'ADP-heptose et le gène *galU* qui serait impliqué dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique externe chez *H. influenzae*

(61). Dans le cas d'*H. influenzae*, les gènes impliqués dans la synthèse du noyau oligosaccharidique ne se retrouvent pas sous forme d'opéron mais plutôt dispersés sur le chromosome bactérien (61).

3.2.3.3. L'antigène-O

La structure de l'antigène-O varie considérablement chez les bactéries à Gram négatif. Au moins 160 arrangements chimiques de l'antigène-O ont été identifiés chez *E. coli* seulement. Reeves et coll. (118) ont séquencé l'opéron *wb** (*rfb*) chez *E. coli* K-12 et chez plusieurs autres bactéries à Gram négatif. Les gènes *wb** codent pour la plupart des enzymes requis pour l'assemblage de l'antigène-O, incluant la biosynthèse de 6-déoxy et 3,6-didéoxyhexoses (lorsque présents). Les études de Reeves et coll. ont démontré que les opérons *wb** de différentes souches de *Salmonella* et de *E. coli* sont fortement divergentes.

Les enzymes qui génèrent le dTDP-rhamnose sont codés par les quatre premiers gènes (*rmlABCD*, anciennement *rfbABCD*) de plusieurs opérons *wb** et les séquences de ces quatre gènes sont généralement bien conservées (Figure 3, p.21). Suivant les gènes requis pour l'assemblage du dTDP-rhamnose, on retrouve souvent un groupe de gènes (*abeIFGHJ* dans le cas de *Salmonella* Typhimurium groupe B) (Figure 3, p.21) qui code pour des enzymes ayant un rôle dans la formation 3,6-didéoxyhexose (138). La structure du didéoxyhexose est relativement variable chez les différentes bactéries à Gram négatif. Ces deux sucres (dTDP-rhamnose et 3,6-didéoxyhexose) sont utilisés comme substrat dans la biosynthèse de l'antigène-O. Au centre de la plupart des opérons *wb** on retrouve un ORF (*wzx-rfbX*-) qui code pour une protéine hydrophobe comportant environ 12 segments transmembranaires. Malgré des profils d'hydrophobicité similaires, la séquence du gène *wzx* de différents organismes n'est pas conservée. La fonction de ce gène n'est pas connue, mais on lui suggère un rôle dans le transport étant donné son profil hydrophobe.

Finalement, la partie distale de plusieurs opérons *wb** contient des gènes codant pour des enzymes requis pour la formation de certains sucres (tels que GDP-mannose). Ces gènes peuvent aussi coder pour des glycosyltransférases qui sont impliquées dans le

cycle d'assemblage de l'antigène-O oligosaccharidique. Or, étant donné les variations dans la composition et la configuration oligosaccharidique de l'antigène-O, la portion distale de l'opéron *wb** est également variable.

L'antigène-O est synthétisé indépendamment du lipide A et du noyau oligosaccharidique sur un transporteur lipidique, l'undécaprénol-phosphate (Und-P) (161). Le cycle de biosynthèse de l'antigène-O est initié, pour *Salmonella* Typhimurium, par le transfert réversible d'une molécule de galactose 1-phosphate (Gal-1-P) du précurseur uridine diphosphogalactose (UDP-Galp) au Und-P. Chez *S. Typhimurium* LT2 et chez toutes les autres souches chez lesquelles la synthèse de l'antigène-O débute avec un galactose, cette réaction réversible est catalysée par le produit du gène *wbaP* (*rfbP*), une enzyme associée à la membrane qui joue également un rôle lors de l'exportation de l'antigène-O. Les gènes *wbaVUN* (*rfbVUN*) codent pour des transférases qui catalysent ensuite trois glycosylations séquentielles (114). Chez *E. coli* la première étape de synthèse de l'antigène-O est le transfert réversible de GlcNAc 1-phosphate du UDP-GlcNAc au Und-P, étape analogue au transfert de galactose 1-phosphate au Und-P retrouvée chez *S. Typhimurium*. Ce transfert de GlcNAc 1-phosphate est codé par le gène *rfe*, situé à l'extérieur de l'opéron *wb**. Alors que les fonctions de *wbaP* sont confinées à la synthèse de l'antigène-O, Rfe est pour sa part requis pour la synthèse de polysaccharides de surface additionnels qui peuvent être coexprimés avec les antigènes-O.

Par la suite, il y a polymérisation de la chaîne de l'antigène-O. La synthèse de l'antigène-O implique 2 différents modèles de polymérisation. Ainsi, une caractéristique importante de la polymérisation du premier modèle réside dans le fait que les unités oligosaccharidiques nouvellement synthétisées sont introduites au bout réducteur de la chaîne en croissance par l'enzyme WbbH (Rfc), liée à la membrane cytoplasmique du côté périplasmique. Le nombre d'unités oligosaccharidiques ajoutées à la chaîne-O est sous le contrôle du gène *wzz* (Rol- regulator of O-chain length- ou Cld-O-chain length determinant) codant pour une protéine membranaire de fonction inconnue mais qui pourrait en quelque sorte influencer l'efficacité catalytique de la protéine WbbH à chaque étape de l'élongation. Le deuxième modèle de polymérisation de la chaîne de l'antigène-O est WbbH-indépendant. La polymérisation est initiée par l'enzyme Rfe et implique un transfert séquentiel sur le bout non-réduit de résidus

glycosylés et par une seule molécule de Und-P. La ligase qui transfère ensuite l'antigène-O au noyau externe serait sous le contrôle du gène *waaL* (161). Par la suite, le LPS complet peut finalement être exporté à la surface bactérienne par un mécanisme encore méconnu (161).

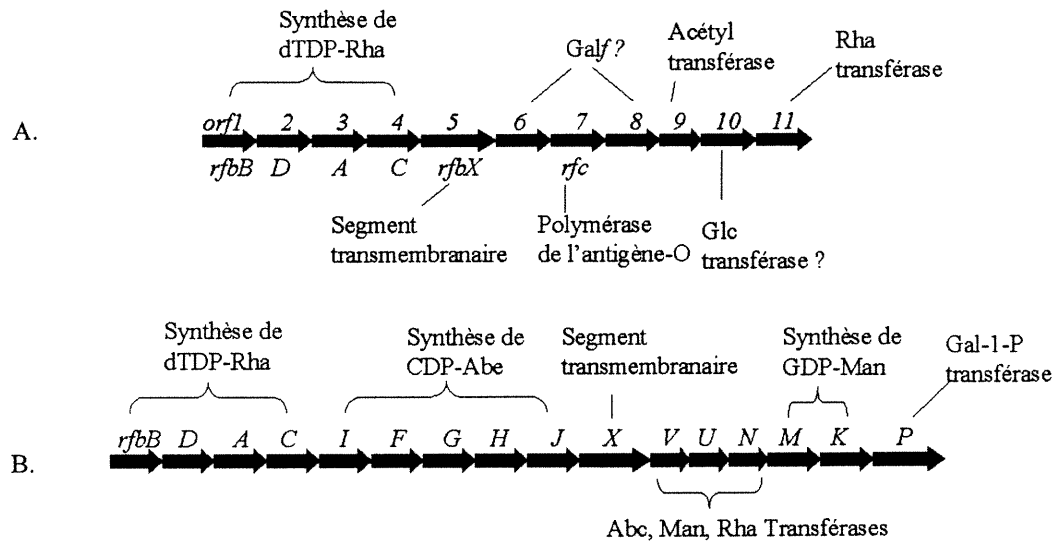


Figure 3. Organisation et fonction des gènes formant l'opéron *wb** (*rfb*) d'*E. coli* K-12 (A) et *Salmonella* Typhimurium (B). Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes. (Modifiée selon Raetz (114))

3.3. Protéines de la membrane externe

D'une manière générale, les bactéries acquièrent le fer indispensable à leur croissance par la synthèse de sidérophores. Il était admis que les souches d'*A. pleuropneumoniae* des biotypes 1 et 2 ne synthétisaient pas de sidérophore. Toutefois, Diarra et coll. (35) ont montré qu'une souche du sérotype 1 et une souche du sérotype 5 sont capables d'excréter un sidérophore lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu pauvre en fer. Cependant, ce sidérophore n'est ni de type phénolate ni de type hydroxamate.

D'autres mécanismes de captation du fer sont connus chez les bactéries et certains d'entre eux existent chez *A. pleuropneumoniae*.

- Certaines espèces des genres *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Moraxella*, *Neisseria* ou *Mannheimia* sont aptes à acquérir le fer par un mécanisme ne faisant pas intervenir les sidérophores. Lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux pauvres en fer, ces bactéries expriment 2 protéines de membrane externe désignées Tbp1 et Tbp2 (Tbp: transferrin-binding protein) (54). La protéine Tbp1 est une protéine transmembranaire et la protéine Tbp2 est une lipoprotéine ancrée dans la membrane externe grâce à sa partie lipidique. Ces deux protéines semblent agir en synergie pour capter le fer lié à la transferrine puis la protéine Tbp1 permettrait le transport du fer au travers de la membrane externe suivi de sa fixation à une protéine périplasmique. Sauf exception la culture de *A. pleuropneumoniae* dans un milieu pauvre en fer augmente la synthèse de Tbp capables de fixer directement la transferrine porcine mais non la lactoferrine. La protéine pTbp1 ou TbpA est une protéine de haut poids moléculaire (99-110 kDa) alors que la protéine pTbp2 ou TbpB possède un poids moléculaire de l'ordre de 60 kDa. Ces Tbp sont spécifiques pour la transferrine porcine (120) ce qui expliquerait, en partie, la spécificité d'hôte d' *A. pleuropneumoniae*.

- L'acquisition du fer peut également se faire à partir de l'hémoglobine, et le lipide A du LPS et des protéines seraient impliqués dans cette fixation. Comme il a été mentionné précédemment, il a été démontré que les LPS extraits d'*A. pleuropneumoniae* pouvaient lier deux protéines, ayant des poids moléculaires d'environ 10 et 11 kDa, présentent dans les sécrétions des voies respiratoires du porc (13) et qui, suite à une analyse plus approfondie de la séquence en acides aminés se sont avérées présenter une forte homologie avec les chaînes alpha et bêta de l'hémoglobine du porc (11). La liaison de l'hémoglobine aux LPS d'*A. pleuropneumoniae* peut modifier certaines propriétés biologiques et physiques des LPS (6; 7). En utilisant une procédure de purification par affinité à l'aide d'hémine- ou d'hémoglobine-agarose, une protéine majeure de la membrane externe (OMP) de 75 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine a été isolée chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 souche 4074 après croissance dans des conditions de restriction en fer. Des OMPs mineures de 47 et 36 kDa liant l'hémine ou l'hémoglobine ont également été identifiées (5).

3.4. Exotoxines

A. pleuropneumoniae produit des hémolysines actives sur les érythrocytes de différentes espèces et des cytotoxines actives sur les cellules endothéliales, les pneumocytes, les macrophages et les neutrophiles du poumon du porc. De nombreux travaux ont montré que les activités hémolytiques et/ou cytotoxiques étaient liées à 3 protéines différentes (Apx I, II et III) d'un poids moléculaire variant de 100 à 120 kDa et présentant des spécificités antigéniques différentes. Deux de ces protéines sont à la fois hémolytiques et cytotoxiques (Apx I et II) alors que la troisième est uniquement cytotoxique (Apx III). Plus récemment, une quatrième protéine (ApxIV) a été mise en évidence.

Ces protéines sont membres de la famille des toxines RTX ("repeats in the structural toxin" (159), de la famille des "pore forming toxin") (43). Elles présentent des séquences répétées constituées de 9 acides aminés, riches en glycine et elles agissent en s'insérant dans les membranes et en formant des pores (144). Des protéines de la famille RTX sont produites par plusieurs espèces bactériennes.

De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, les toxines RTX sont constituées de 4 domaines :

- un domaine hydrophobe qui joue un rôle dans la formation des pores membranaires;
- un domaine qui constitue environ 40% de la molécule qui semble nécessaire pour l'attachement aux cellules cibles;
- un domaine formé par les séquences riches en glycine qui chélatent les ions calcium et qui interviennent dans la reconnaissance des récepteurs cellulaires;
- un domaine constituant un signal de sécrétion permettant le transport de la toxine au travers de la paroi cellulaire.

Typiquement, les opérons codant pour les toxines RTX sont constitués de 4 gènes contigus dans l'ordre C A B D. Le gène A code pour une protoxine, le gène C code pour un activateur transformant la protoxine en toxine active (68), les gènes B et D codent pour des protéines associées à la membrane et permettant la sécrétion de la toxine (159). Les protéines codées par les gènes B et D d'un opéron sont capables d'assurer la

sécrétion de la protoxine codée par un autre opéron mais par contre, le produit du gène C n'est pas interchangeable.

Actuellement, la nomenclature des toxines d' *A. pleuropneumoniae* a été unifiée et elles sont appelées Apx (*Actinobacillus pleuropneumoniae* toxine) comprenant des hémolysines et des cytolysines (42). Trois types d'Apx ont été clairement identifiés et bien analysés(41) et une quatrième a été découverte plus récemment (44). Le profil génétique des Apx (I, II et III) a été établi pour les souches de référence des 12 sérotypes (Figure 4, p.24) (41).

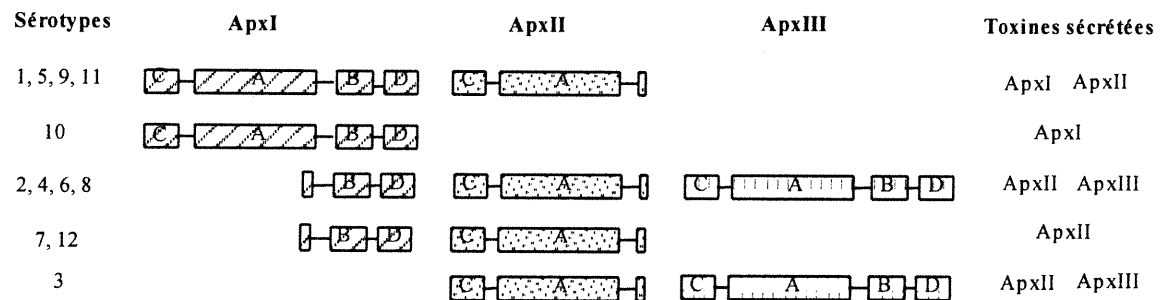


Figure 4. Représentation schématique du génotype des toxines Apx et phénotypes retrouvés selon les sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Modifiée selon Frey (41)).

- La toxine ApxI a initialement été décrite comme une puissante hémolysine (hémolysine I = hlyI) (46) puis il a été montré qu'elle était également dotée de propriétés cytotoxiques pour les cellules endothéliales, les macrophages alvéolaires et les neutrophiles (78) et elle a également été appelée cytolysine I (ClyI). Cette toxine est notamment produite par les souches de référence des sérotypes 1, 5, 9, 10 et 11 qui contiennent un opéron *apxI* complet (10; 42; 43; 80) (les souches de référence des sérotypes 2, 4, 6, 7, 8 et 12 ne possèdent pas les gènes *apxIC* et *apxIA* et la souche de référence du sérotype 3 est totalement dépourvue de l'opéron *apxI*). La synthèse de cette toxine est régulée positivement par les ions Ca^{2+} (45). Cette toxine a un poids moléculaire de 110,2 kDa, elle contient 13 séquences répétées riches en glycine et fixe

les ions Ca^{2+} , ce qui est nécessaire à son activité hémolytique et à son attachement aux neutrophiles. Elle présente de fortes analogies avec l'hémolysine alpha de *E. coli* (Hly A) et elle est produite par *A. suis*.

- La toxine ApxII a été initialement décrite comme un facteur faiblement hémolytique (HlyII) puis comme une cytotoxine pour les cellules endothéliales, les macrophages alvéolaires et les neutrophiles (ClyII). Cette toxine, proche de la leucotoxine de *M. haemolytica*, est produite par toutes les souches de référence sauf celle du sérotype 10 (46; 48; 78). Cette protéine a un poids moléculaire de 102,5 kDa et contient 8 séquences répétées riches en glycine. Cette toxine présente de fortes analogies avec la leucotoxine de *M. haemolytica* (Lkta) et elle est aussi produite par *A. suis*.

- La toxine ApxIII a initialement été dénommée cytolysine III (ClyIII) ou pleurotoxine (Ptx) ou toxine macrophagique (Mat). Cette toxine, dépourvue d'activité hémolytique est fortement cytotoxique pour les cellules endothéliales, les macrophages broncho-alvéolaires et les neutrophiles (78; 136). Cette toxine d'un poids moléculaire 112,8 kDa, contenant 13 séquences répétées riches en glycine (26; 74), est produite par les souches de référence des sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8. L'opéron codant pour cette toxine est un opéron complet.

La quatrième toxine RTX récemment identifiée chez *A. pleuropneumoniae* a été désignée ApxIVA (44). Lorsqu'exprimé chez *E. coli*, un recombinant de cette toxine a démontré une faible activité hémolytique et une synergie co-hémolytique avec la spingomyélinase (toxine bêta) de *Staphylococcus aureus*. Le produit du gène *apxIVA* n'a pu être détecté dans des cultures d'*A. pleuropneumoniae*, sous différentes conditions de croissance *in vitro*; toutefois, des porcs infectés expérimentalement avec *A. pleuropneumoniae* sérotypes 1, 5 et 7 ont produit des anticorps qui réagissaient avec la protéine recombinante, 14 jours suite à l'infection, indiquant que le gène *apxIVA* est exprimé *in vivo* (137). Le gène *apxIVA* de la souche d'*A. pleuropneumoniae* 4074 code pour une protéine ayant une masse moléculaire prédite de 202 kDa; caractéristique typique des protéines RTX (137).

3.5. Autres facteurs de pathogénicité

- Utera et Pijoan (150) ont démontré en 1991 que certaines souches d'*A. pleuropneumoniae* portaient des fimbriae pérित्रiches de 0,5 à 2 nm de largeur sur 60 à 450 nm de longueur et qui pourraient être impliquées dans l'adhésion aux cellules épithéliales du rhino-pharynx. Selon leur étude, les fimbriae ne sont présentes que si la souche est cultivée sur milieux solides (*in vitro*) et elles ne sont plus synthétisées après 2 ou 3 repiquages. Récemment, des fimbriae de type 4 ont été identifiées à la surface cellulaire d'*A. pleuropneumoniae* par microscopie électronique et analyse de la séquence N-terminale des acides aminés (165). La sous-unité protéique du fimbriae de type 4, appelée ApfA, démontre que les 12 premiers acides aminés sont identiques à ceux de d'autres sous-unités protéiques de fimbriae de type 4 retrouvés chez plusieurs bactéries pathogènes à Gram négatif.

- *A. pleuropneumoniae* produit une immunoglobuline A protéase, active sur les IgA du porc mais non sur les IgA de l'homme. Cette protéase pourrait intervenir dans la pathogénie et sa spécificité serait un des facteurs expliquant que cette bactérie ne soit naturellement pathogène que pour le porc. Toutefois, en utilisant une sonde d'ADN hybridant avec le gène de l'IgA protéase de *H. influenzae*, Mulks et coll. (94) ne retrouvent pas de séquence homologue chez *A. pleuropneumoniae*.

- Les souches d'*A. pleuropneumoniae* (au moins celles des sérotypes 1, 3, 5, 7 et 8) produisent une superoxyde dismutase dont le nombre d'acides aminés est estimé à 190. La présence d'une région hydrophobe de 23 acides aminés à l'extrémité N-terminale de la molécule semble suggérer que cette protéine est excrétée. Le rôle exact de cette enzyme dans la virulence n'est pas connu mais elle pourrait conférer une résistance à la phagocytose (84).

- L'uréase est un autre facteur de pathogénicité qui a été étudié. Les premiers résultats obtenus démontraient toutefois qu'*A. pleuropneumoniae* ne requiert pas l'activité uréase pour le développement de la pleuropneumonie aiguë chez le porc (146). Cependant, une étude plus récente effectuée à l'aide de deux mutants uréase-négative suggère que

l'activité de l'uréase serait nécessaire pour qu'*A. pleuropneumoniae* puisse (à faible dose) causer une infection au niveau du système respiratoire des porcs (22).

4. Mutants d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de ces différents facteurs dans la virulence de la bactérie. Cependant, leur rôle exact dans la pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae* n'a pas encore été déterminé. L'utilisation et l'analyse de mutants peut donc aider à l'étude de ces facteurs de virulence. Différentes techniques peuvent être utilisées pour produire des mutants telles que la mutagenèse spontanée, la mutagenèse chimique, la mutagenèse dirigée ou la mutagenèses à l'aide d'un transposon. La mutagenèse d'*A. pleuropneumoniae* à l'aide d'un transposon a été développé par Tascòn et coll. (143). Elle implique l'utilisation d'un plasmide suicide conjugatif pLOF/km. Ce dernier porte le transposon mini-Tn10 lequel possède une transposase inductible par l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) située à l'extérieur de l'élément mobile (59). Lorsque le plasmide est transféré de *E. coli* (pir) à *A. pleuropneumoniae* en présence d'IPTG, il y a génération de mutants stables de façon aléatoire dans le chromosome d'*A. pleuropneumoniae* d'une fréquence de 10^{-5} . La résistance à la kanamycine, portée par le transposon, permet la sélection des mutants.

4.1. Mutants acapsulés

Suite à une mutagenèse chimique avec l'éthyl méthanesulfonate, Inzana et coll. (67) ont obtenu des mutants acapsulés d'*A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 et 5. Ces mutants ont été testés pour leur utilisation dans la fabrication d'un vaccin vivant. Ils semblent efficaces, sécuritaires et stables et on a démontré une certaine protection envers les souches virulentes. Rosendal et coll. (133) ont également obtenu des mutants acapsulés du sérotype 1 en utilisant pour leur part la technique de l'atténuation (70 passages successifs sur un milieu "trypticase soy agar" enrichi de 5% de sang de veau chauffé et 0.01% de NAD). Ils ont conclu que la présence de la capsule est nécessaire pour la pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae* étant donné qu'ils ont noté une baisse de la virulence du mutant acapsulé lorsque testé chez la souris. Rioux et coll. (123) ont

obtenu un mutant acapsulé du sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae* suivant la technique de mutagenèse de Tascón et coll. (143). Le transposon s'est inséré dans le gène *cpxC* de l'opéron régulant l'exportation de la capsule produisant conséquemment un mutant exempt de capsule. Ce mutant a démontré une augmentation de l'adhérence (20X) aux cellules de la trachée de porcelet comparativement à la souche mère 4074 NaI^r, et une forte diminution de la virulence lors d'infections expérimentales effectuées chez le porc (123).

4.2. Mutants auxotrophes

Une première démonstration de l'atténuation d'*A. pleuropneumoniae* par l'introduction d'une mutation dirigée dans un gène du métabolisme a été effectuée par Fuller et coll. (49). Un mutant d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1, incapable de croître en absence de riboflavine exogène, a été produit. Une portion de l'opéron codant pour la biosynthèse de la riboflavine a été remplacée par une cassette portant le gène de la résistance à la kanamycine. Des infections expérimentales chez le porc ont démontré que cette mutation causait une atténuation de la virulence chez cet animal.

4.3. Mutant superoxide dismutase

A. pleuropneumoniae contient au niveau périplasmique des cofacteurs superoxide dismutase (SOD) à cuivre et zinc qui permettent à la cellule bactérienne de se débarrasser des molécules oxydantes générées par les phagocytes de l'hôte, prévenant ainsi leur destruction. L'utilisation d'un mutant SOD d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 n'a cependant démontré aucune diminution de virulence lors d'infections expérimentales chez le porc (139).

4.4. Mutants Apx

De plus, plusieurs mutants Apx ont été obtenus permettant ainsi de préciser le rôle des toxines dans la pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae*. En 1991, Inzana et coll. (66) ont produit des mutants non hémolytiques d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5 grâce à la mutagenèse chimique. Ils ont ainsi pu conclure que l'hémolysine de 110 kDa (ApxI)

joue un rôle important dans la virulence de la bactérie et la pathogénicité de la pleuropneumonie. La même année, Rycroft et coll. (136) ont produit des mutants Apx du sérotype 2 également à l'aide de la mutagenèse chimique utilisant le N-méthyl-N'-nitrosoguanidine. Ils ont proposé une distinction entre le polypeptide de 120 kDa représentant la cytotoxine (appelée pleurotoxine) et l'hémolysine d'*A. pleuropneumoniae*. Également en 1991, Anderson et coll. (2) ont obtenu des mutants spontanés d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 7 ayant une mutation au niveau du gène *apxIIA* codant pour une cytolyse. Une excision d'environ 8.5 kb de l'ADN chromosomique, incluant la partie de la région répétée de la toxine, a pu être notée suite à la mutation. Puis, en 1994, Tascón et coll. (145) ont obtenu des mutants d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 déficients en hémolysine à l'aide de la méthode de mutagenèse par transposition qu'ils ont mise au point (143). Ils ont pu noter une diminution significative de la virulence chez la souris et chez le porc grâce à ces mutants, suggérant de nouveau l'implication des hémolysines dans la pathogénicité de la bactérie. Ils ont également constaté qu'ApxI et II sont toutes les deux nécessaires pour une virulence complète. Plus récemment, Jansen et coll. (75) ont mis au point un système de recombinaison homologue entre le chromosome bactérien d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et le plasmide pVE6063 portant une copie altérée des gènes *apxICA*, *apxIBD* ou *apxIICA*. Une série de mutants a ainsi été obtenue leur permettant de préciser le rôle des toxines dans la pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae*. Plus encore, ils ont démontré qu'*apxIBD* était essentiel pour la sécrétion des deux toxines ApxI et ApxII.

4.5. Mutants uréase-négative

Tascón et coll. (146) ont obtenu des mutants d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 uréase-négative à l'aide de la méthode de mutagenèse par transposition. Suite aux tests de virulence qu'ils ont effectués chez le porc, ils n'ont noté aucune différence dans la virulence du mutant par rapport à la souche mère, suggérant ainsi que l'activité uréase d'*A. pleuropneumoniae* n'a aucun impact sur la virulence. Par contre, Bossé et MacInnes (22) ont produit deux autres mutants uréase-négative à l'aide d'un transposon et les résultats qu'elles ont obtenus suite à des infections expérimentales effectuées chez le

porc suggèrent que l'activité uréase serait nécessaire, selon la dose infectante, pour qu'*A. pleuropneumoniae* puisse coloniser au niveau du système respiratoire porcin.

4.6. Mutants température-sensibles

Inzana et coll. (66) ont obtenu des mutants température-sensibles d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 à l'aide de la mutagenèse à l'acide éthylméthanesulfonique. Plus récemment, ce type de mutant a été isolé, par Byrd et Hooke (24), après traitement avec le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine et enrichi avec la pénicilline et le D-cyclosérine. Les antigènes de surface présents demeurent intacts chez les souches mutantes ce qui ne compromet par leur immunogénicité. On remarque également chez ces souches mutantes une induction de la production d'anticorps contre les antigènes de surface et les hémolysines.

4.7. Mutants LPS

Rioux et coll. ont voulu isoler et caractériser des mutants LPS pour mieux comprendre leur rôle dans la pathogénicité de la pleuropneumonie porcine (122). Dans un premier temps, des mutants spontanés LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ont été obtenus. Ces derniers présentent des mutations au niveau de l'antigène-O et du noyau oligosaccharidique. Une diminution de l'adhérence à la trachée de porcelet et de la virulence chez la souris est observée chez certains de ces mutants.

Récemment, dans une autre étude, Rioux et coll. ont isolé et caractérisé 8 mutants LPS grâce à la mutagenèse à l'aide du mini-Tn10 (122). Ils ont démontré qu'une mutation dans la région de l'antigène-O ne semble pas avoir d'effet sur l'adhérence de la bactérie aux cellules de l'appareil respiratoire du porc, tandis qu'une mutation dans la région du noyau-lipide A (mutant *galU*) diminue le degré d'adhérence de la bactérie de façon significative. Ces résultats suggèrent donc que même si la présence de l'antigène-O ne semble pas essentielle pour l'adhérence, une région noyau-lipide A intacte semble requise pour l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae*.

De plus, 3 autres mutants au niveau du noyau oligosaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ont été obtenus plus récemment. En effet, Galarneau et coll. (51) ont voulu définir le rôle du noyau oligosaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 dans l'adhérence aux cellules respiratoires du porc en utilisant différents mutants isogènes obtenus également grâce à l'insertion du transposon mini-Tn10. L'ensemble de leurs résultats confirment que le noyau oligosaccharidique semble impliqué dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules de l'hôte, une situation également observée chez *Pseudomonas aeruginosa* (109).

À la lumière de ces informations, de plus amples connaissances sur les gènes de biosynthèse des LPS, l'organisation de ces derniers sur le chromosome d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1, et certaines propriétés biologiques de mutants rugueux pourraient aider à mieux comprendre le rôle des LPS dans la pathogénie de cette bactérie.

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Identification of genes involved in biosynthesis of *Actinobacillus pleuropneumoniae*
serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants

Keywords: lipopolysaccharide, adherence, surface charge, surface hydrophobicity, virulence.

Josée Labrie¹, Stéphane Rioux^{1,2}, Mary Margaret Wade³, Franklin R. Champlin³, Steven C. Holman⁴, W. William Wilson⁴, Chantal Savoye⁵, Marylène Kobisch⁵, Marc Sirois⁶, Catherine Galarneau¹ and Mario Jacques^{1*}

Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6¹; Present address: Unité de recherche en vaccinologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2²; Department of Biological Sciences, Mississippi State University, Mississippi State, MS 39762 USA³; Department of Chemistry, Mississippi State University, Mississippi State, MS 39762 USA⁴; Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Laboratoire d'études et de recherches avicoles et porcines, Unité de recherche Mycoplasmologie Bactériologie, Zoopôle, BP 53, 22440 Ploufragan, France⁵; Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7⁶

*Corresponding author: Dr. M. Jacques, Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6. Phone: (450) 773-8521 ext. 8348; Fax: (450) 778-8108; Electronic mail address: mario.jacques@umontreal.ca

Abstract

Actinobacillus pleuropneumoniae is an important pathogen of swine. Lipopolysaccharide (LPS) has been identified as the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* and it is involved in adherence to porcine respiratory tract cells. We previously generated seven rough LPS mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 by using a mini-Tn10 transposon mutagenesis system [Rioux et al., Can. J. Microbiol., 45 (1999) 1017-1026]. The purpose of the present study was to characterize these mutants in order to learn more about LPS O-antigen biosynthesis genes and their organization in *A. pleuropneumoniae*, and to determine the surface properties and virulence in pigs of these isogenic mutants. By mini-Tn10 insertions in rough mutants, four putative genes (ORF12, ORF16, ORF17, and ORF18) involved in O-antigen biosynthesis in *A. pleuropneumoniae* serotype 1 were found within a region of 18 ORFs. This region is homologous to the gene cluster of serotype-specific O-polysaccharide biosynthesis from *A. actinomycetemcomitans* strain Y4 (serotype b). Two mutants showed homology to a protein with identity to glycosyl transferases (ORF12); two others had the mini-Tn10 insertion localized in genes encoding for two distinct proteins with identity to rhamnosyl transferases (ORF16 and ORF17) and three showed homology to a protein which is known to initiate polysaccharide synthesis (ORF18). These four ORFs were also present in *A. pleuropneumoniae* serotypes 9 and 11 that express an O-antigen that serologically cross-reacts with serotype 1. Evaluation of some biological properties of rough mutants seems to indicate that the absence of O-chains does not appear to have an influence on the virulence of the bacteria in pigs and on the overall surface hydrophobicity, charge and hemoglobin-binding activity, or on LAL activation. An acapsular mutant was included in the present study in order to compare the influence of O-chains and capsular polysaccharides on different cell surface properties. Our data suggest that capsular polysaccharides and not O-chains polysaccharides have a major influence on surface properties of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 and its virulence in pigs.

1. Introduction

Actinobacillus pleuropneumoniae is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a worldwide disease that contributes important economic losses to the swine industry (Taylor, 1999). Twelve serotypes of *A. pleuropneumoniae* have been identified based on the structure of capsular polysaccharides (Nielsen, 1986). Lipopolysaccharide (LPS) of *A. pleuropneumoniae* is an important virulence factor. LPS, a complex molecule, is composed of three well defined regions: lipid A; the core, an oligosaccharide containing 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid (KDO); and the O-antigen, a polysaccharide consisting of repeating units (Hitchcock et al., 1986). Depending on the presence and the number of O-antigen repeating units, LPS can be rough, semi-rough (for example in *A. pleuropneumoniae* serotype 1), or smooth (for example in *A. pleuropneumoniae* serotype 2) (Hitchcock et al., 1986; Byrd and Kadis, 1989; Bélanger et al., 1990). We observed that *A. pleuropneumoniae* LPS was able to bind pig hemoglobin (Bélanger et al., 1995; Archambault et al., 1997). In addition, LPS has been identified by our group as an adhesin of *A. pleuropneumoniae* (Bélanger et al., 1990; Bélanger et al., 1992; Paradis et al., 1994; Jacques, 1996; Jacques and Paradis, 1998). The polysaccharide portion of LPS, but not the lipid A portion is responsible for binding to porcine respiratory tract cells and mucus (Paradis et al., 1994). Use of *A. pleuropneumoniae* LPS mutants indicated that mutations in the O-antigen region have apparently no effect on adherence to porcine respiratory tract cells, while an intact core oligosaccharide region seems to be required (Rioux et al., 1999; Galarnau et al., 2000). The structure of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen was previously described by Altman et al. (Altman et al., 1986) as branched tetrasaccharide repeating units composed of two α -L-rhamnopyranosyls, one α -D-glycopyranosyl and one 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose residues. Previous studies (Perry et al., 1990; Beynon et al., 1992) revealed a number of structural similarities among the LPS O-antigens of *A. pleuropneumoniae* capsular serotypes 1, 9 and 11, which are responsible for serological cross-reactions between these serotypes (Perry et al., 1990).

In *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, the genes of the O-antigen locus encode enzymes for the synthesis of nucleotide sugar precursors, for the transfer of sugars to build the O-antigen units, and for carrying out the specific assembly

steps to convert a single O-antigen unit into the LPS (Goldberg, 1999). Genes of the *wb** (*rfb*) clusters have been shown to code for most of the unique enzymes required for O-antigen assembly. On the other hand, the gene involved in the LPS biosynthesis of *Haemophilus influenzae*, a member of the *Pasteurellaceae* family as is *A. pleuropneumoniae*, have been shown to be spread all around the chromosome (Hood et al., 1996). Nothing is known about either the genes involved in *A. pleuropneumoniae* O-antigen biosynthesis, their organization on the chromosome, or their distribution among serotypes.

Our purpose was to characterize seven rough mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 that were isolated in a previous study (Rioux et al., 1999). We wished to learn more about the LPS O-antigen biosynthesis genes and their organization in this important swine pathogen, and to determine the surface properties of these isogenic mutants and their virulence in pigs.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and culture conditions

Bacterial strains and plasmids are described in Table 1. All *A. pleuropneumoniae* reference strains were grown on brain-heart infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) agar plates supplemented with 15 µg/ml of β nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD). The nalidixic acid-resistant mutant (4074 Nal^r) obtained from *A. pleuropneumoniae* reference strain representing serotype 1 (strain 4074) was grown on BHI agar plates supplemented with 15 µg/ml NAD and 30 µg/ml nalidixic acid (Nal). BHI agar plates supplemented with 15 µg/ml NAD, 30 µg/ml Nal, and 75 µg/ml kanamycin (Km) were used for the growth of *A. pleuropneumoniae* mutants. For the selection of transformed plasmid pBR325 in *E. coli* XL1-Blue, 50 µg/ml Km and 50 µg/ml ampicillin (Ap) were added to LB agar plates (Difco Laboratories, Detroit, MI). Plates were incubated at 37°C in 5% CO₂ atmosphere for 18 to 24 h.

2.2. Transpositional mutagenesis and selection of mutants

A. pleuropneumoniae serotype 1 rough LPS mutants (Rioux et al., 1999) were generated by mutagenesis with a Tn10 derivative (Tascón et al., 1993; de Lorenzo and Timmis, 1994) and selected as described previously by Rioux et al. (Rioux et al., 1999).

2.3. DNA techniques

Restriction and modification enzymes were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada) and were used according to the supplier's specifications. Plasmid DNA was extracted with the Plasmid QIAprep spin miniprep kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada). Chromosomal DNA was purified following the method from Pitcher et al. (1989), using guanidium thiocyanate. Briefly, cell lysis was induced by GES-buffer (5 M guanidine thiocyanate, 100 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% sodium-lauryl-sarcosinate) and proteins precipitation by 7.5 M ammonium acetate. A solution of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1; Sigma, Oakville, ON, Canada) was used to removed remaining exonucleases and lipoproteins from the DNA. The DNA was then precipitated with isopropanol.

Mutated genes were identified by cloning genomic DNA of the mutants in pBR325. Chromosomal DNA of *A. pleuropneumoniae* mutants was digested with restriction enzyme *EcoRI*, which does not cut in the transposon mini-Tn10, and ligated in pBR325 plasmid digested with the same enzyme. The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* XL1-Blue prepared by CaCl₂/MOPS transformation following procedure C of the U.S.E. Mutagenesis kit (Amersham Pharmacia Biotech). The transformants were plated on LB agar plates supplemented with 50 µg/ml each of Km and Ap. The kanamycin-resistance cassette of the mini-Tn10 was used to detect recombinants containing the transposon and to identify the flanking chromosomal DNA from the *A. pleuropneumoniae* mutants.

DNA sequencing of the recombinant plasmids was performed using the primers *EcoRI*-Rev (5'-GGTTTTACCGTAACACGC-3') and *EcoRI*-For (5'-AAGCACAAGTTTTATCCGG-3') specific for the pBR325 plasmid, at Laboratoire d'analyse d'acides nucléiques of Université Laval (Québec, QC, Canada) by using an ABI model 373A stretch DNA sequencer. Subsequent primers were based on the obtained sequence. DNA sequence information was analyzed with software from the University of Wisconsin Genetic Computer Group (Devereux et al., 1984) using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases.

A DNA library of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain 4074 (Vezina et al., 1997) constructed in Lambda Zap Express phage vector (Stratagene, La Jolla, CA) was screened with DIG-labeled probes designed for Southern blotting. Digoxigenin (DIG) labeling of the probes was done in a standard PCR. The first probe was synthesized using the primers *EcoRI*-Rev and ORF12-W1F (5'-CTCCGAGCCAATATTTACG-3'), which is specific to *A. pleuropneumoniae* ORF12. We used pBR1.1 as template and an annealing temperature of 55°C under standard conditions (Ausubel et al., 1990). The second probe was synthesized using primers FORF16 and RORF16 (Table 2). PCR was carried out at an annealing temperature of 55°C using *A. pleuropneumoniae* serotype 1 DNA as template under standard conditions (Ausubel et al., 1990). Both PCR reactions were supplemented with 50 µM DIG-11-dUTP (Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada). Strongly reacting plaques were purified by successive rounds of screening. The pBK-CMV phagemid of the positive clones that

survived three rounds of screening was excised using ExAssist Helper Phage. Finally, the plasmids were digested with restriction enzymes (*Sma*I and *Sa*II) known to cut once within the vector in order to evaluate the size(s) of their insert(s). The dideoxynucleotide sequencing reaction was carried out with universal primers T3 and T7.

PCR amplification of each ORF was achieved by using the oligonucleotide primers (Table 2) which were designed based on the DNA sequence of the ORF. We amplified the specific expected size fragment for each ORF. The reactions were carried out at an annealing temperature of 53°C using standard conditions (Ausubel et al., 1990). DIG labeling of each ORF was carried out as described above using *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 NaI^r DNA as template. *Eco*RI-digested genomic DNA from reference strains representing each *A. pleuropneumoniae* serotype was analyzed by Southern blotting using a standard protocol (Ausubel et al., 1990). There were several washings: two washes for 5 min at room temperature with 2 X SSC, twice for 15 min at 68°C with 0.2 X SSC for high stringency or at room temperature with 2 X SSC for low stringency, in all conditions containing 0.1% SDS. The DIG-labeled probe was detected using phosphatase-labeled anti-DIG antibodies with CDP-Star as substrate (Roche) according to the manufacturer's instructions.

2.4. Cell surface hydrophobicity and charge assays

To obtain cells for cell surface hydrophobicity and charge assays, cultures consisting of 100 ml of BHI containing 15 µg/ml NAD were inoculated with stationary-phase cells from overnight starter culture (approximately 15 h) to an initial optical density (O.D.) of 0.05 at 620nm (Spectronic 20D optical spectrophotometer; Milton Roy Inc. Rochester, NY). Cultures were incubated at 37°C with rotary aeration at 180 rpm in a model G24 Environmental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) until late-exponential phase for cell surface hydrophobicity assays and until an OD₆₂₀ = 0.10 for cell surface charge assays. Cell surface hydrophobicity was measured by assessing the degree to which wild-type and mutant strains were able to partition into *n*-hexadecane (Sigma) using the method of Rosenberg et al. (Rosenberg et al., 1980) as modified by Darnell et al. (Darnell et al., 1987). The only differences were that cells were harvested and washed using centrifugation for 12 min at 12,000 x g at 4°C, and that assay mixtures consisted of 1 ml *n*-hexadecane added to 4 ml cells standardized to

an O.D. of 0.5 at 620 nm. Cell surface electrostatic charge properties were assessed on the basis of zeta potential values. These were obtained by measuring electrophoretic light scattering by cells in an electric field (Wilson et al., 2001) using a Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Southborough, MA) in a manner similar to that employed previously in this laboratory (Morris et al., 1995). Exponential-phase cultures ($OD_{620} = 0.10$) were placed on ice and analyzed as soon as possible by injecting a 1 ml volume of each sample into the instrument that was then run at 25°C, pH 7 with analytical parameters adjusted to manufacturer's specifications.

2.5. Hemoglobin-binding assay

Overnight cultures of *A. pleuropneumoniae* were washed and resuspended in PBS to O.D. of 0.2 at 540 nm, equivalent to approximately 10^8 CFU/ml. Bacterial suspensions (1 ml) were incubated with FLUOS-labeled pig hemoglobin (Hb) (1mg/ml) (Archambault et al., 1999) for 60 min at room temperature. Cells were washed twice in PBS and fixed with 2% paraformaldehyde. Suspensions of *A. pleuropneumoniae* cells not incubated with pig Hb served as controls. Cells were maintained in the dark at 4°C until analyzed by flow cytometry as previously described (Paradis et al., 1994; Archambault et al., 1999). Flow cytometry results were expressed as percentage of gated fluorescent events, which is the percentage of fluorescent cells out of 10,000 cells. The hemoglobin-binding assay was performed with samples in duplicate.

2.6. Chromogenic *Limulus* amoebocyte lysate (cLAL) test

Activation of cLAL (Pyrochrome, Associates of Cape Cod, Woods Hole, MA) by LPS was used to compare the biological activity of LPS of mutants with that of the wild-type strain *A. pleuropneumoniae* 4074 NaI^r. Some modifications were introduced to previously described experiments (Archambault et al., 1997). Experiments were conducted with ten-, hundred-, and thousand-fold dilutions of bacterial cells (starting concentration 1 mg/ml). Dilutions were prepared using pyrogen-free water in nontreated polystyrene microplates. cLAL (50 μ l) was then added to each well and the plates were incubated at 37°C for 30 min. Absorbance was determined with an automated plate reader (Dynatech Laboratories VA) at 410 nm. The cLAL test was performed with samples in duplicate.

2.7. *Experimental pig infection*

The use of animals was reviewed and approved by the appropriate Animal Care Review Committee at the institution where the experiments were carried out. Twenty-one specific pathogen-free, 12-week-old piglets reared in a pathogen-free environment were used. One group of seven piglets received the wild type strain *A. pleuropneumoniae* 4074 Nal^r, one group of seven piglets received rough LPS mutant 27.1 and one group of seven piglets served as control. These three groups were housed separately. The infection and examination were done as described previously (Rioux et al., 1999; Rioux et al., 2000) with one difference: parent strain and mutant 27.1 were grown on PPLO agar plates supplemented with 1 mg/ml of glucose, 10 µg/ml of NAD and 5% horse serum.

2.8. *Nucleotide sequence accession numbers*

The sequences reported here have been submitted to GenBank and assigned accession numbers: ORF12: AF329453; ORF16, ORF17, and ORF18: AF329452.

2.9. *Statistical analysis*

Differences between mean values were analyzed for statistical significance by determining P values using the Student's *t*-test with the two-tailed table. P values of less than 0.05 and 0.01 indicated statistical significance at the 95% and 99% confidence levels, respectively.

3. Results

3.1. Identification of genes interrupted by mini-Tn10 in O-antigen mutants and their neighboring genes

Seven rough LPS mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 were obtained following transposon mutagenesis (Rioux et al., 1999). These mutants showed a rough LPS profile on SDS-PAGE gels and did not react with monoclonal antibody 5.1 G8F10 directed against an epitope located in the O-antigen of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS. All these mutants resulted from a single insertion of mini-Tn10. In order to identify the site of insertion of the mini-Tn10 in each of these rough mutants, genomic DNA was digested with the restriction enzyme *EcoRI* and ligated into pBR325. Sequencing analysis allowed us to determine that two of the mutants (1.1 and 15.1) were mutated in the same *EcoRI* restriction fragment (of approximately 13.5 kb) and the five other mutants (24.1, 27.1, 36.1, 44.1, 51.1) in another *EcoRI* restriction fragment (of approximately 3.5 kb) (Fig. 1A).

Sequencing of the 13.5 kb *EcoRI* fragment demonstrated 12 ORFs overall (Fig. 1A). The encoded proteins had high homologies: ORF1 to peptidylprolyl isomerase, ORF2 to aquaporin Z and ORF3 to a hypothetical protein. The ORF4 product showed homology to the *menA* gene of *Haemophilus ducreyi*. The *menA* gene codes for the enzyme 1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase that is involved in the biosynthesis of menaquinone. ORF5 encoded a homologue of YadR, a conserved hypothetical protein of unknown function that is also found downstream to the *menA* gene in *H. ducreyi*. ORF6, ORF7, ORF8 and ORF9 displayed strong homology (82%) to the ORF6, ORF7, ORF8 and ORF9 previously identified in a cluster of genes of *A. actinomycetemcomitans* coding for the serotype b specific O-polysaccharide (Fig. 1B). The proteins encoded by these four ORFs showed high homology to the *rml* genes involved in dTDP-rhamnose biosynthesis in *N. meningitidis*, *E. coli* and *Shigella flexneri* (Yoshida et al., 1998). dTDP-L-rhamnose is known to be synthesized from dTTP and D-glucose-1-phosphate by the combined action of four *rml* gene products in these bacteria. Moreover, in *A. actinomycetemcomitans* Y4 serotype b, the dTDP-rhamnose synthesis genes are thought to be responsible for the biosynthesis of the serotype-specific antigen that consists of 2 deoxyhexoses, D-fucose and L-rhamnose (Yoshida et al., 1998). It was previously reported that the polysaccharide region of *A.*

actinomycetemcomitans Y4 LPS contains the serotype b-specific antigen of this species (Perry et al., 1996).

The proteins encoded by ORF10 and ORF11 had high homologies (74% and 72% respectively) to ORF10 and ORF11 of *A. actinomycetemcomitans* serotype b gene cluster (Fig. 1) whose products belong to the ABC superfamily of active transporters. Further nucleotide sequence analysis demonstrated that the mini-Tn10 insertion in mutants 1.1 and 15.1 were located in a gene (ORF12: 2766 bp) encoding a protein with identity to the ExpE4 protein of *Sinorhizobium meliloti* (25%) and to the RfbU protein of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (22%) that are both involved in the transfer of sugar (Table 3). However, an *EcoRI* site present in gene ORF12: 2766 bp prevented us from obtaining the entire sequence. We then tried another approach: screening a DNA library of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain 4074 constructed in Lambda Zap Express phage vector. The screening was conducted with a DIG-labeled probe designed for Southern blotting and specific to the available sequence of ORF12. After three rounds of screening, a positive clone was isolated and sequenced allowing us to obtain the entire sequence of the ORF12 and sequences downstream. Sequence information stretching over 2.7 kb downstream of ORF12 identified 3 different ORFs that we called ORF13, ORF14 and ORF15. The proteins encoded by these 3 ORFs had high homology to ORF15, ORF16 and ORF17 and were previously reported (Yoshida et al., 1998) in *A. actinomycetemcomitans* serotype b gene cluster (Fig. 1). These ORFs, while indispensable for serotype-specific antigen synthesis in *A. actinomycetemcomitans* (Yoshida et al., 1998), did not show significant homology to any previously reported proteins.

Sequencing of the 3.5 kb *EcoRI* fragment demonstrated three ORFs (ORF16, ORF17 and ORF18) (Fig. 1A). Mutant 51.1 had the mini-Tn10 insertion localized in a gene (ORF16: 873 bp) encoding a protein with identity to the RfbF protein of *S. flexneri* (42%), the ORF33X8 protein of *Vibrio anguillarum* (37%) and the RfbQ protein of *Shigella dysenteriae* (31%) (Table 3). The insertion of the transposon in mutant 44.1, localized at the 3' end of a gene (ORF17: 912 bp) showed identity with the RfbN protein of *A. actinomycetemcomitans* (60%) and WbaN of *Salmonella* Typhimurium (54%) and *Salmonella choleraesuis* (53%) (Table 3). All these proteins are rhamnosyl transferases. Mutants 24.1 and 27.1 had the mini-Tn10 insertion at different positions in the same gene (ORF18: 1419 bp) which encoded a protein with homology to RfbP (WbaP)

proteins of *H. influenzae* (64%), *E. coli* (57%) and *S. Typhimurium* (56%) (Table 3) all of which have galactosephosphotransferase activity. As for mutant 36.1, the insertion of the mini-Tn10 proved to be at exactly the same position as in mutant 24.1 (after bp 1334). Additionally, ORF17 and ORF18 in *A. pleuropneumoniae* correspond to ORF20 and ORF21 in *A. actinomycetemcomitans* serotype b gene cluster (Fig. 1). Sequence information downstream of ORF18 revealed homology with *H. influenzae* ribosomal protein S21 that is not related to LPS biosynthesis. Preliminary sequence information upstream of ORF16 was not sufficient to demonstrate significant homology with any known genes in the database. This led us to resort to screening the aforementioned phagemid bank with a probe specific to the ORF16. The region immediately upstream of ORF16 proved to be ORF15 (Fig. 1), hence demonstrating that the two distinct EcoRI fragments were initially only 2.7 kb apart.

The four putative O-antigen biosynthesis genes identified in this study (ORF12, ORF16, ORF17, ORF18) have a low G+C content (between 28% and 31% (Table 3)) when compared to the estimated G+C content (43.2%) of the entire *A. pleuropneumoniae* chromosome (Pohl et al., 1983). Sequence analysis of regions upstream and downstream of the individual genes in all 4 ORFs were further investigated. A potential ribosomal binding site (RBS) was situated at a distance of -16 for ORF17 and -11 for ORF18.

3.2. Distribution of LPS biosynthesis genes among *A. pleuropneumoniae* serotypes

To determine whether the four putative genes involved in O-antigen biosynthesis of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 that we identified by transposon mutagenesis (ORF12, ORF16, ORF17, and ORF18) are conserved among the 12 serotypes of *A. pleuropneumoniae*, we performed PCR amplifications and Southern blotting analyses with DIG-labeled probes of each ORF. Oligonucleotide primers (internal to each ORF) were used for amplification (Table 2). The probes were approximately lengths of 1900 bp for ORF12, 650 bp for ORF16, 800 bp for ORF17 and 1200 bp for ORF18. All four ORFs were also present in serotypes 9 and 11 which was expected considering that serotypes 1, 9 and 11 reveal a number of structural similarities to the O-antigen and show serological cross-reactivity (Perry et al., 1990; Beynon et al., 1992).

We also performed PCRs and Southern blotting with three previously identified ORFs coding for genes involved in core LPS biosynthesis of *A. pleuropneumoniae*

serotype 1 (Rioux et al., 1999; Galarnau et al., 2000). The sizes of these DIG-labeled probes were approximately 950 bp for ORF5.1, 1000 bp for ORFc_{g1} and 900 bp for ORFc_{g3}. Our findings showing that these ORFs were present in all 12 serotypes confirmed that the LPS core is usually more conserved between serotypes than O-antigen which is the more variable region of LPS.

3.3. Cell surface hydrophobicity and charge assays

A hydrocarbon adherence assay (Rosenberg et al., 1980) was employed in order to determine the relative cell surface hydrophobicity properties of the *A. pleuropneumoniae* rough mutants with respect to core-LPS mutants, an acapsular mutant and the wild type strain. Data in Table 4 reveal that the surface of O-antigen- and core-LPS mutants and the surface of the parental wild type strain were clearly hydrophilic. In contrast, the surface of an acapsular mutant (33.2) was significantly more hydrophobic than the surface of the wild type strain. This acapsular mutant was incorporated in the present study in order to compare the impact of O-chains and capsule polysaccharides on different cell surface properties.

A laser-based Zetasizer 3000 (Malvern Instruments) was employed to measure the electrophoretic mobility of cells in an electrical field, thereby allowing for the generation of zeta potential values reflective of cell surface electrostatic charge. Data in Table 4 reveal that capsulated LPS mutants are more electronegative than the acapsular mutant (33.2). No difference in zeta potential was observed among the capsulated mutants regardless of LPS mutation, except for mutant CG1 that appeared to be less electronegative (Table 4).

3.4. Hemoglobin-binding assay

Hb-binding activity of the LPS and acapsular mutants was tested in flow cytometry using *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain 4074 Na^r as control. The purpose was to evaluate the influence of surface polysaccharides on Hb-binding activity. All *A. pleuropneumoniae* mutants were able to bind FLUOS-Hb and their percentages of fluorescent events were significantly different ($P < 0.05$) from the control cells that were not incubated with FLUOS-Hb (data not shown). A slight increase ($0.01 < P < 0.05$) in the percentage of gated fluorescent events of acapsular mutant 33.2 compared to the

wild type strain 4074 NaI^r was observed (Table 4). However, no significant differences were observed between rough or core mutants and the wild type parent strain.

3.5. Chromogenic *Limulus ameobocyte lysate* (cLAL) test

We used a chromogenic LAL test to evaluate biological activity of LPS of the mutants compared to the LPS of the wild type strain of *A. pleuropneumoniae* 4074 NaI^r. All *A. pleuropneumoniae* mutants showed similar biological activity, and no significant differences were observed between the biological activity of any mutants and the parent strain (Table 4).

3.6. Virulence in pigs

The virulence of a rough LPS mutant of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was evaluated in pigs and compared to the virulence of the wild type parental strain 4074 NaI^r. Since the seven rough LPS mutants characterized in this study showed the same LPS profile and surface properties, we arbitrarily tested the virulence of mutant 27.1. After intranasal challenge with rough mutant 27.1 mortality was 43% (3/7), identical to the percentage of mortality observed after challenge with the parent strain 4074 NaI^r (Table 5). As observed in Table 5, the body temperature was higher than normal for 86% (6/7) of the pigs infected with mutant 27.1 and 100% (7/7) of the pigs infected with the parent strain 4074 NaI^r. A necropsy was done on all the pigs, with particular attention to lung lesions. Upon macroscopic examination, fibrinohemorrhagic pleuropneumonia, compatible with *A. pleuropneumoniae* infection (Dungworth, 1993) was observed in all pigs infected with the parent strain 4074 NaI^r and with rough mutant 27.1. We also observed lung lesions in one control pig but these lesions did not result from an *A. pleuropneumoniae* infection, as shown by bacteriological and histological examination, but rather from the ingestion of feed particles. *A. pleuropneumoniae* was isolated from the lungs of all pigs infected with the parent strain 4074 NaI^r and with rough mutant 27.1. We then looked for serum antibodies in all the pigs with a Swinecheck kit (Vetoquinol) which allows the detection of antibodies against LPS *A. pleuropneumoniae* serotype 1, 9 and 11. Prior to infection all the pigs were seronegative but we noticed a seroconversion during the second week after the challenge in the pigs infected with the parent strain 4074 NaI^r as well as in the pigs infected with rough mutant 27.1 (data not shown). However, the antibody level was markedly lower in pigs

infected with mutant 27.1 due to the absence of O-chain polysaccharides. It is worth noting that the growth curves in liquid culture for the parent strain and the LPS mutant 27.1 were identical (data not shown).

4. Discussion

Although LPS has been identified as an important adhesin of *A. pleuropneumoniae* (Paradis et al., 1994) and as an important virulence factor (Tascón et al., 1996), no information exists about LPS biosynthesis genes and their organization in this important swine pathogen. The aim of the present study was to characterize seven *A. pleuropneumoniae* O-antigen mutants obtained previously (Rioux et al., 1999), to identify the genes interrupted by a mini-Tn10 insertion and the neighboring genes, and to determine some biological properties of these rough mutants.

Localization of the mini-Tn10 transposon in the mutants allowed us to identify four different ORFs involved in O-antigen biosynthesis of *A. pleuropneumoniae* serotype 1. Two mutants (1.1, and 15.1) allowed the identification of a gene (ORF12: 2766 bp) whose product showed homology to a protein known to play a role in exopolysaccharide biosynthesis by transferring glycosyl residues. Two others (51.1 and 44.1) (ORF16: 873 bp and ORF17: 912 bp) showed homology to two distinct proteins involved in the biosynthesis of the O-antigen by transferring rhamnose residues. The three others (24.1, 27.1 and 36.1) (ORF18: 1419 bp) showed homology to a protein that is known, along with Rfe (WecA), to initiate polysaccharide synthesis through the transfer of sugar residues onto the carrier lipid molecule undecaprenol phosphate (Und-P) in *Enterobacteriaceae* (Wang et al., 1996).

The genes that we identified coded for functions associated with LPS biosynthesis in other Gram-negative microorganisms. The structure of the O-polysaccharide in *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS consists of branched tetrasaccharide repeating units composed of α -L-Rha_p (2 residues), α -D-Glc_p and β -D-Glc_pNAc (Altman et al., 1986). Interestingly, one of the ORFs we identified by transposon mutagenesis (ORF12) coded for a glycosyltransferase and two (ORF16 and ORF17) for rhamnosyl transferases. The exact function of the gene product of the ORF18 is presently unknown but could be associated with the transfer of sugar residues onto the lipid carrier.

The identification of a region of 18 ORFs in *A. pleuropneumoniae* serotype 1 led us to the observation that, in construct in the regions studied, significant similarity exists between this organism and *A. actinomycetemcomitans* serotype b. Eleven ORFs proved to be present in both organisms and in the same consecutive order (Fig. 1). In *A. actinomycetemcomitans* these ORFs comprise a large cluster associated with the

biosynthesis of the serotype-specific antigen (Yoshida et al., 1998) which was previously reported as a constituent of the polysaccharide region of LPS in this organism (Perry et al., 1996). The same region could therefore be implicated also in O-antigen biosynthesis in *A. pleuropneumoniae*. In enteric bacteria such as *E. coli*, *S. Typhimurium* and *Y. enterocolitica*, the chromosome contains an uninterrupted *rfb* cluster composed of 11 to 18 genes that direct biosynthesis of the entire O-antigen whereas in *H. influenzae* genes involved in LPS biosynthesis are spread around the chromosome (Hood et al., 1996). The ORFs identified in this study have a significant similarity with a cluster of genes associated with O-antigen biosynthesis in *A. actinomycetemcomitans* serotype b. We remain cautious about applying the term cluster for *A. pleuropneumoniae* serotype 1 given that the four different LPS biosynthesis genes we have identified are separated by other genes whose functions are still to be described.

We then studied the distribution of the 4 putative LPS biosynthesis genes (ORF12, ORF16, ORF17, and ORF18) amongst the 12 serotypes of *A. pleuropneumoniae*. They were also present in serotypes 9 and 11. This agrees with the structural similarities reported for serotypes 1, 9 and 11 (Perry et al., 1990; Beynon et al., 1992) and the observed serological cross-reactivity amongst them. We also looked at the distribution of three genes involved in *A. pleuropneumoniae* core LPS biosynthesis identified in previous studies (Rioux et al., 1999; Galarneau et al., 2000) amongst the 12 serotypes of *A. pleuropneumoniae* and found them ubiquitously present. This is not surprising, given that the core structure is generally more conserved than the O-antigen in bacteria.

Noteworthy is that the putative O-antigen biosynthesis genes identified in this study (ORF12, ORF16, ORF17, and ORF18) have a low G+C content (30%) as compared to the estimated G+C content of the entire *A. pleuropneumoniae* chromosome which is 43.2% (Pohl et al., 1983). This is characteristic of the *rfb* clusters identified in many other bacteria such as *Vibrio cholerae* O1 (Yamasaki et al., 1999) and *Azotobacter vinelandii* (Hausman et al., 1998) and may be indicative of the acquisition of the *rfb* genes by interspecific gene transfer.

We determined different surface properties of the *A. pleuropneumoniae* rough mutants. We first explored the cell surface hydrophobicity of the rough mutants by measuring the relative abilities of the cells to partition into *n*-hexadecane. The results revealed O-antigen mutants to be hydrophilic and similar to the parent strain, while an acapsular mutant was relatively more hydrophobic. These results indicate that

hydrophobic moieties are more exposed at the cell surface in the absence of a capsular material layer and that the loss of O-chains in rough mutants does not significantly influence the overall hydrophobicity/hydrophilicity of the cell surface.

In the absence of charged capsular material, the overall zeta potential of the cell is significantly affected as seen by the lower electronegativity of the acapsular mutant. However, the capsule is not solely responsible for the overall charge of the cells, attested to by one LPS core mutant (CG1). This mutant, with the transposon insertion in a gene which showed homology to the *waaB* of *S. Typhimurium* (Galarneau et al., 2000), displayed the same zeta potential as the acapsular mutant. Given that the *waaB* gene is responsible for the substitution of hexose during synthesis of the core oligosaccharide, one speculates that the anomaly is due to the addition of a negatively charged residue such as phosphate. We will confirm our speculation when the structure of the core OS in *A. pleuropneumoniae* is elucidated.

The influence of surface polysaccharides on Hb-binding activity of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was tested in flow cytometry. A significant increase in the percentage of gated fluorescent events of acapsular mutant 33.2 compared to the wild-type parent strain Na1^f was observed. This result indicates that the surface molecules with Hb-binding activity are more exposed at the cell surface in the absence of a capsular material layer. The absence of O-chains in the rough LPS mutants did not allow a significant increase of Hb-binding to surface proteins and to the core-lipid A region of LPS that are both thought to play a role in Hb-binding (Archambault et al., 1997; Archambault et al., 1999). We also evaluated the biological activity of LPS of the mutants compared to the LPS of the wild type strain of *A. pleuropneumoniae* in a chromogenic LAL test. No significant differences between the biological activity of any of the mutants and the parent strain were observed. These results were not surprising considering the fact that the lipid A portion of LPS is known to be responsible for activation of LAL. Based on the putative functions of the ORFs we identified in the present study, there should not be any difference in the lipid A portion of these LPS mutants.

A. pleuropneumoniae O-antigen mutant 27.1 was shown to be as virulent in pigs as the wild type parent strain and a similar percentage of pigs died following experimental infection. However, previous studies have shown a core LPS mutant (5.1)

(Rioux et al., 1999) and the acapsular mutant (33.2) (Rioux et al., 2000) of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 to be markedly less virulent in pigs than the parent strain.

The organization of genes in *A. pleuropneumoniae* serotype 1 identified in this study shows similarities to the construct in *A. actinomycetemcomitans* serotype b. In *A. actinomycetemcomitans* the genes involved in serotype-specific antigen synthesis, a constituent of the polysaccharide region of LPS, are arranged in a cluster. The genes we identified in *A. pleuropneumoniae* that were involved in O-antigen biosynthesis were both common to some of those in *A. actinomycetemcomitans* serotype b and similar organization. We identified for the first time four different putative genes involved in *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen biosynthesis (ORF12, ORF16, ORF17 and ORF18). These genes were also present in serotypes 9 and 11. These two serotypes express an O-antigen, which serologically cross-reacts with serotype 1. Evaluation of some surface properties of the rough mutants indicates that the absence of O-chains does not appear to have a significant influence on the overall surface hydrophobicity, charge and Hb-binding activity and LAL activation. In addition, we showed that a rough LPS mutant was highly virulent in pigs. Taken together, our data suggest that capsular polysaccharides and not O-chain polysaccharides have a major influence on surface properties of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 and its virulence in pigs.

Acknowledgements

This work was supported by grant OGPIN0003428 to M.J. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and grant 99-ER-0214 from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). We thank M. Archambault for Hb-binding assay and cLAL protocols, L. Mikael and J. Harel for reviewing the manuscript and R. Cariolet and his group for assistance in experimental infections.

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant traits ^a	Source or reference
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	<i>supE hsdR lac</i> ⁻ F ⁺ proAB + lacI ^q lacZ M15	(Bullock et al., 1987)
Plasmid		
pBR325	Ap ^r Cm ^r Tc ^r general purpose cloning vector derived from pBR322	(Bolivar, 1978)
pBR1.1	Recombinant plasmid obtained from the cloning of ORF16 from mutant 1.1 in pBR325	This study
<i>A. pleuropneumoniae</i>		
reference strains		
4074	Serotype 1	K.R. Mittal ^b
4226	Serotype 2	K.R. Mittal ^b
1421	Serotype 3	K.R. Mittal ^b
1462	Serotype 4	K.R. Mittal ^b
K17	Serotype 5	K.R. Mittal ^b
FEMO	Serotype 6	K.R. Mittal ^b
WF.83	Serotype 7	K.R. Mittal ^b
405	Serotype 8	K.R. Mittal ^b
13261	Serotype 9	K.R. Mittal ^b
13039	Serotype 10	K.R. Mittal ^b
56153	Serotype 11	K.R. Mittal ^b
8329/85	Serotype 12	K.R. Mittal ^b
<i>A. pleuropneumoniae</i>		
serotype 1 wild type and mutants ^c		
4074 Nal ^r	Serotype 1 (Nal ^r)	(Rioux et al., 1999)
1.1	LPS O-antigen mutant (O ⁻ , CPS ⁺)	(Rioux et al., 1999)
15.1	LPS O-antigen mutant (O ⁻ , CPS ⁺)	(Rioux et al., 1999)
24.1	LPS O-antigen mutant (O ⁻ , CPS ⁺)	(Rioux et al., 1999)
27.1	LPS O-antigen mutant (O ⁻ , CPS ⁺)	(Rioux et al., 1999)
36.1	LPS O-antigen mutant (O ⁻ , CPS ⁺)	(Rioux et al., 1999)
44.1	LPS O-antigen mutant (O ⁻ , CPS ⁺)	(Rioux et al., 1999)
51.1	LPS O-antigen mutant (O ⁻ , CPS ⁺)	(Rioux et al., 1999)
5.1	LPS core oligosaccharide mutant (O ⁺ , CPS ⁺)	(Rioux et al., 1999)
CG1	LPS core oligosaccharide mutant (O ⁺ , CPS ⁺)	(Galarneau et al., 2000)
CG3	LPS core oligosaccharide mutant (O ⁺ , CPS ⁺)	(Galarneau et al., 2000)
CG5	LPS core oligosaccharide mutant (O ⁺ , CPS ⁺)	(Galarneau et al., 2000)
33.2	Acapsular mutant (O ⁺ , CPS ⁻)	(Rioux et al., 2000)

^aAbbreviation: Ap^r, Cm^r, Tc^r, Nal^r resistance to ampicillin, chloramphenicol, tetracycline and nalidixic acid respectively; O, O-antigen; CPS, capsular polysaccharide

^bFaculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal

^cAll derived from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 4074 Nal^r

Table 2. Primers used for PCR amplification of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 ORFs

Primers	Sequence	Mutant ^a	Reference
Sense primers			
FORF12	AACGCTTCTTCCTATGCA	1.1; 15.1	This study
FORF16	GGATTTTACCGGTAGTGG	51.1	This study
FORF17	AGGATTATCTTGGCAGGA	44.1	This study
FORF18	TATCCACTTATCGTTAGG	24.1; 27.1; 36.1	This study
F5.1 ^b	CTTAAGGGAAGAAAACTATC	5.1	(Rioux et al., 1999)
Fcg1 ^c	CTTTAGTAATGGGTGGGG	CG1	(Galarneau et al., 2000)
Fcg3 ^d	GAGAGTGCTTTAAACGGT	CG3; CG5	(Galarneau et al., 2000)
Antisense primers			
RORF12	ACTTGGTATAGATCCGTG	1.1; 15.1	This study
RORF16	GAGATACTCCATCCGATT	51.1	This study
RORF17	CCATCTAGGTAATTTCTC	44.1	This study
RORF18	CCTTCTCGGATCCTTAAT	24.1; 27.1; 36.1	This study
R5.1 ^b	GTCGACTATGCACCTTGTA	5.1	(Rioux et al., 1999)
Rcg1 ^c	CACTCCTTACTCACTTCA	CG1	(Galarneau et al., 2000)
Rcg3 ^d	GATCATTACACTCTGC	CG3; CG5	(Galarneau et al., 2000)

^aMutant from which the ORF was first identified

^bF5.1 (forward) and R5.1 (reverse) primers designed from ORF of mutant 5.1 (AF053017) that has homology with GalU of *H. influenzae* (U32753). F5.1 introduced a *SalI* site at the 5'- end and R5.1 an *EcoRI* site at the 3'- end of the amplified product

^cFcg1 (forward) and Rcg1 (reverse) primers designed from ORF of mutant CGI (AF143904) that has homology with WaaB of *S. Typhimurium* (AF0263861)

^dFcg3 (forward) and Rcg3 (reverse) primers designed from ORF of mutant CG3 and CG5 (AF143905) that has homology with LbgB of *H. ducreyi* (U58147)

Table 3. Predicted *A. pleuropneumoniae* gene products identified by the mini-Tn10 insertions in rough LPS mutants and similar proteins in the non-redundant sequence databases

Genes	G+C (%)	Size (a.a.)	Similar proteins	Putative function	Identity (%)	Database accession number
ORF12	30	922	ExpE4- <i>S. meliloti</i> (420 a.a.)	Glycosyltransferase	25	CAB01935
			RfbU- <i>M. thermoautotrophicum</i> (350 a.a.)	Probable hexosyltransferase	22	D69143
ORF16	28	291	RfbF- <i>S. flexneri</i> (296 a.a.)	dTDP-Rhamnosyl transferase	42	X71970
			ORF33X8- <i>V. anguillarum</i> (294 a.a.)	Putative rhamnosyl transferase	37	AF025396
					31	L07293
ORF17	32	304	RfbQ- <i>S. dysenteriae</i> (303 a.a.)	Rhamnosyl transferase I	60	AB002668
			RfbN- <i>A. actinomycetemcomitans</i> (318a.a.)	Rhamnosyl transferase	54	X56793
			WbaN- <i>S. Typhimurium</i> (314 a.a.)	Rhamnosyl transferase	53	X60665
			WbaN- <i>S. choleraesuis</i> (315 a.a.)	Rhamnosyl transferase		
ORF18	31	473	RfbP- <i>H. influenzae</i> (471 a.a.)	Undecaprenyl-Gal-1-P transferase	64	U32769
			WbaP- <i>E.coli</i> (476 a.a.)	Undecaprenyl-Gal-1-P transferase	57	AF104912
			WbaP- <i>S. Typhimurium</i> (476 a.a.)	Undecaprenyl-Gal-1-P transferase	56	S15314

Table 4. Comparison of cell surface properties of various *A. pleuropneumoniae* mutants

Strain	Hydrophobicity ^a	Zeta potential ^b	Hb-binding ^c	cLAL ^d
Parental wild type				
<i>A. pleuropneumoniae</i> 4074 NaI ^f	0.4 ± 0.8	-21.4 ± 1.3	69.8 ± 0.5	0.496 ± 0.006
Rough LPS mutants (O ⁻ , CPS ⁺)				
1.1	-0.1 ± 0.5 ^e	-23.5 ± 1.4 ^e	70.3 ± 16.1 ^g	0.495 ± 0.008 ^g
15.1	0.3 ± 0.4 ^e	-24.1 ± 1.8 ^e	63.8 ± 6.2 ^g	0.513 ± 0.014 ^g
24.1	0.2 ± 0.2 ^e	-23.0 ± 0.6 ^e	62.2 ± 14.6 ^g	0.428 ± 0.055 ^g
27.1	1.1 ± 0.7 ^e	-24.1 ± 2.4 ^e	73.2 ± 16.4 ^g	0.507 ± 0.003 ^g
36.1	0.5 ± 0.6 ^e	-22.2 ± 1.7 ^e	74.3 ± 15.7 ^g	0.458 ± 0.032 ^g
44.1	0.2 ± 0.1 ^e	-23.0 ± 2.0 ^e	73.2 ± 12.0 ^g	0.482 ± 0.012 ^g
51.1	-0.1 ± 0.6 ^e	-22.9 ± 1.8 ^e	78.2 ± 10.9 ^g	0.490 ± 0.012 ^g
Core LPS mutants (O ⁺ , CPS ⁺)				
5.1	0.3 ± 0.3 ^e	-23.2 ± 1.4 ^e	67.7 ± 11.0 ^g	0.502 ± 0.003 ^g
CG1	0.7 ± 0.5 ^e	-9.5 ± 4.1 ^f	77.1 ± 8.5 ^g	0.498 ± 0.021 ^g
CG3	0.7 ± 0.2 ^e	-25.1 ± 0.8 ^e	71.1 ± 6.2 ^g	0.532 ± 0.038 ^g
CG5	0.4 ± 0.3 ^e	-23.7 ± 2.6 ^e	79.6 ± 9.4 ^g	0.455 ± 0.020 ^g
Acapsular mutant (O ⁺ , CPS ⁻)				
33.2	35.7 ± 4.0 ^f	-5.6 ± 0.3 ^f	71.7 ± 0.4 ^h	0.487 ± 0.019 ^g

^aPercent decrease in turbidity of standardized cell suspension ± standard deviation after mixing with 1 ml of *n*-hexadecane. Each value represents the mean of three to five independent determinations, expressed as the % adherence to hexadecane ± SD

^bZeta potential of standardized cell suspension ± SD, expressed in mV. Each value represents the mean of data obtained from three to six independent cultures

^cCells labeled with FLUOS-Hb as determined by flow cytometry and expressed as % gated fluorescent events ± SD (*n*=2)

^dActivation of cLAL by LPS (dilution 1:10) expressed as mean ± SD (*n*=2)

^eP > 0.01 compared to parent strain

^fP < 0.01 compared to parent strain

^gP > 0.05 compared to parent strain

^h0.01 < P < 0.05 compared to parent strain

Table 5. Virulence in pigs of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain 4074 NaI^r and rough mutant 27.1

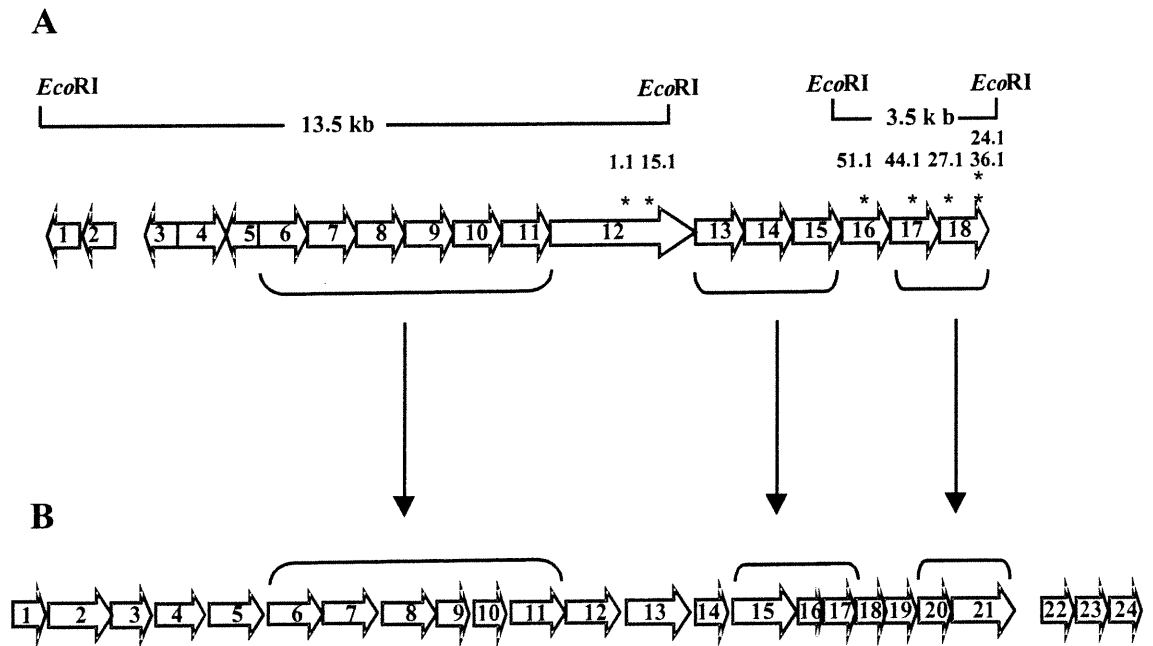
Group	Number of pigs (n)	Mortality (%)	Fever (%) ^a	Pigs with lung lesions ^b (%)	Pigs in which <i>App</i> was isolated from lungs (%)
Control	7	0	0	14 ^c	0
Parent strain 4074 NaI ^r	7	43	100	100	100
Rough mutant 27.1	7	43	86	100	100

^aT > 40°C

^bMacroscopic lung lesions

^cLesions were not due to *A. pleuropneumoniae* infection but rather to feed ingestion

Fig. 1. Comparison of the genetic organization between (A) 18 ORFs of *A. pleuropneumoniae* 4074 Nal^r identified in this study; (B) ORFs in *A. actinomycetemcomitans* serotype-specific antigen region and its flanking regions (adapted from Yoshida et al., 1998). Arrows indicate the direction of the transcription. Asterisks indicate the different mini-Tn10 insertions in rough LPS mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1. Numbers represent the respective mutants.



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.
- Archambault, M., Olivier, M., Foiry, B., Diarra, M.D., Paradis, S.-É. and Jacques, M., 1997. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.*, 4: 53-65.
- Archambault, M., Rioux, S. and Jacques, M., 1999. Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.*, 173: 17-25.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., 1990. *Current protocols in molecular biology.*, Wiley interscience, New York, State.
- Bélanger, M., Bégin, C. and Jacques, M., 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.*, 63: 656-662.
- 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., 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.
- Beynon, L.M., Griffith, D.W., Richards, J.C. and Perry, M.B., 1992. Characterization of the lipopolysaccharide O antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 9 and 11: antigenic relationships among serotypes 9, 11, and 1. *J. Bacteriol.*, 174: 5324-5331.
- Bolivar, F., 1978. Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *EcoRI* sites for selection of *EcoRI* generated recombinant DNA molecules. *Gene*, 4: 121-136.

- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M., 1987. A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotech.*, 5: 376.
- Byrd, W. and Kadis, S., 1989. Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect. Immun.*, 57: 3901-3906.
- Darnell, K.R., Hart, M.E. and Champlin, F.R., 1987. Variability of cell surface hydrophobicity among *Pasteurella multocida* somatic serotype and *Actinobacillus lignieresii* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 67-71.
- de Lorenzo, V. and Timmis, K.N., 1994. Analysis and construction of stable phenotype in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.*, 235: 386-405.
- Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O., 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.*, 12: 387-395.
- Dungworth, D.L., 1993. The respiratory system. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N. (Eds.), *Pathology of domestic animals*. Academic Press Inc., San Diego, pp. 539-699.
- Galarneau, C., Rioux, S. and Jacques, M., 2000. Core oligosaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 obtained by mini-Tn10 mutagenesis. *Pathogenesis*, 1: 253-264.
- Goldberg, J.B., 1999. Genetics of *Pseudomonas aeruginosa* polysaccharides. In: Goldberg, J.B. (Ed.), *Genetics of bacterial polysaccharides*. CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 1-21.
- Hausman, B.S., Williamson, J.A., Schreiner, R.P., Pulakat, L. and Gavini, N., 1998. The *rfb* genes in *Azobacter vinelandii* are arranged in a *rfbFGC* gene cluster: a significant deviation to the arrangement of the *rfb* genes in *Enterobacteriaceae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245: 572-582.
- Hitchcock, P.J., Leive, L., Mäkelä, P.H., Rietschel, E.T., Strittmatter, W. and Morrison, D.C., 1986. Lipopolysaccharide nomenclature: past, present, and future. *J. Bacteriol.*, 166: 699-705.
- Hood, D.W., Deadman, M.E., Allen, T., Masoud, H., Martin, A., Brisson, J.R., Fleischmann, R., Venter, J.C., Richards, J.C. and Moxon, E.R., 1996. Use of the

- complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol. Microbiol.*, 22: 951-965.
- Jacques, M., 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.*, 4: 408-410.
- Jacques, M. and Paradis, S.-É., 1998. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22: 45-59.
- Morris, C.M., George, A., Wilson, W.W. and Champlin, F.R., 1995. Effect of polymyxin B nonapeptide on daptomycin permeability and cell surface properties in *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Pasteurella multocida*. *J. Antibiotics*, 48: 67-72.
- Nielsen, R., 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet. Scand.*, 27: 453-455.
- Paradis, S.-É., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottshalk, 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. *Serol. Immunother. Inf. Dis.*, 4: 299-308.
- Perry, M.B., MacLean, L.L., Gmür, R. and Wilson, M.E., 1996. Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype b. *Infect. Immun.*, 64: 1215-1219.
- Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiksen, W. and Mannheim, W., 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33: 510-514.
- Rioux, S., Galarnau, C., Harel, J., Frey, J., Nicolet, J., Kobisch, M., Dubreuil, J.D. and Jacques, M., 1999. Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Microbiol.*, 45: 1017-1026.

- Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Kobisch, M., Frey, J., Gottschalk, M. and Jacques, M., 2000. Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb. Pathogen.*, 28: 279-289.
- Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 9: 29-33.
- Tascón, R.I., Rodríguez-Ferri, E.F., Gutiérrez-Martín, C.B., Rodríguez-Barbosa, J.I., Berche, P. and Vázquez-Boland, J.A., 1993. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. *J. Bacteriol.*, 175: 5717-5722.
- Tascón, R.I., Vázquez-Boland, J.A., Gutiérrez-Martín, C.B., Rodríguez-Barbosa, I. and Rodríguez-Ferri, E.F., 1996. Virulence factors in the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiologia SEM*, 12: 171-184.
- Taylor, D.J., 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L. and Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of swine*. Iowa State University Press, Ames, pp. 343-354.
- Vezina, G., Sirois, M., Clairoux, N. and Boissinot, M., 1997. Cloning and characterization of the groE locus from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 147: 11-16.
- Wang, L., Liu, D. and Reeves, P.R., 1996. C-terminal half of *Salmonella enterica* WbaP (*RfbP*) is the galactosyl-1-phosphate transferase domain catalyzing the first step in O-antigen synthesis. *J. Bacteriol.*, 178: 2598-2604.
- Wilson, W.W., Wade, M.M., Holman, S.C. and Champlin, F.R., 2001. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J. Microbiol. Meth.*, 43: 153-164.
- Yamasaki, S., Garg, S., Nair, G.B. and Takeda, Y., 1999. Distribution of *Vibrio cholerae* O1 antigen biosynthesis genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 179: 115-121.
- Yoshida, Y., Nakano, Y., Yamashita, Y. and Koga, T., 1998. Identification of a genetic locus essential for serotype b-specific antigen synthesis in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.*, 66: 107-114.

IV. DISCUSSION

L'adhérence est un événement qui intervient très tôt dans la pathogénie bactérienne. La colonisation des muqueuses de l'hôte est en fait l'étape initiale de l'infection par un micro-organisme. Pour ce faire, des molécules à la surface bactérienne, nommées adhésines, doivent interagir avec des molécules spécifiques à la surface de la cellule hôte, dites récepteurs. L'adhérence d'*A. pleuropneumoniae*, l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine (135; 147), au mucus du tractus respiratoire porcine et aux cellules épithéliales de la trachée implique le LPS (11; 69; 104). Des études effectuées récemment dans notre laboratoire ont démontré qu'une mutation dans la région de l'antigène-O ne semble pas avoir d'effets sur l'adhérence de la bactérie aux cellules des voies respiratoires du porc, tandis qu'une mutation dans la région du noyau oligosaccharidique diminue le degré d'adhérence de la bactérie de façon significative (51; 122). De plus amples connaissances sur les gènes de biosynthèse des LPS et l'organisation de ces derniers sur le chromosome de la bactérie pourraient aider à mieux comprendre le rôle de ce facteur de virulence dans la pathogénie d'*A. pleuropneumoniae*. Sept mutants LPS rugueux issus de la souche de référence du sérotype 1 ont été générés dans notre laboratoire en utilisant la technique de mutagenèse par transposition à l'aide du mini-Tn10 (122).

Mon projet de maîtrise avait donc pour but de caractériser au niveau moléculaire ces différents mutants, de même que d'évaluer certaines propriétés de surface et la virulence chez le porc de ces mutants isogènes.

L'analyse génétique d'*A. pleuropneumoniae* a nécessité le séquençage de grands fragments d'ADN de part et d'autre du site d'insertion du mini-Tn10 de chacun des mutants. Nous avons identifié 4 cadres de lecture ouverts (ORFs) différents impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O du sérotype 1. Deux mutants (1.1 et 15.1) montraient une insertion du transposon dans un même fragment de restriction *EcoRI* d'environ 13.5 kb, tandis que les cinq autres mutants (24.1, 27.1, 36.1, 44.1 et 51.1) montraient une insertion du mini-Tn10 dans un autre fragment *EcoRI* d'environ 3.5 kb. Étant donné que les mutants 1.1 et 15.1 montraient une insertion du mini-Tn10 sur un grand fragment *EcoRI*, de nombreuses réactions de séquençage ont été nécessaires. Nous avons identifié sur ce fragment un total de 12 ORFs. Les protéines codant pour les ORF1, ORF2 et ORF3 ont démontré une grande homologie avec une isomérase

peptidylprolyl, une aquaporine Z et une protéine hypothétique, respectivement. Le produit de l'ORF4 a démontré une homologie avec le gène *menA* d'*H. ducreyi*. Ce gène code pour l'enzyme 1,4-dihydroxy-2-naphtoate octaprényltransférase qui est impliqué dans la biosynthèse de ménaquinone. Le produit de l'ORF5 code pour un homologue à YadR, une protéine hypothétique conservée, de fonction inconnue, également retrouvée en amont du gène *menA* chez *H. ducreyi*. Les ORFs 6, 7, 8 et 9 démontraient une grande homologie (82%) avec les ORFs 6, 7, 8 et 9 précédemment identifiés dans une région de gènes spécifiques au polysaccharide-O chez *A. actinomycetemcomitans* sérotype b. Ces 4 ORFs codent pour des protéines qui ont révélé une grande homologie avec les gènes *rml* impliqués dans la biosynthèse de dTDP-rhamnose chez *N. meningitidis*, *E. coli* et *S. flexneri* (163). Le dTPP-L-rhamnose est synthétisé du dTTP et du D-glucose-1-phosphate par l'action combinée du produit de 4 gènes *rml* chez ces bactéries. Chez *A. actinomycetemcomitans*, on croit que les gènes de synthèse du dTDP-rhamnose sont responsables de la biosynthèse de l'antigène spécifique de sérotype qui consiste en 2 déoxyhexoses, D-fucose et L-rhamnose (163). De plus, il a été précédemment rapporté que la région lipopolysaccharidique du LPS d'*A. actinomycetemcomitans* Y4 contient l'antigène spécifique du sérotype b de cette espèce (108). Les protéines codant pour les ORFs 10 et 11 ont démontré de fortes homologies (74% et 72%, respectivement) avec les ORFs 10 et 11 de la région impliquée dans la biosynthèse de polysaccharide-O chez *A. actinomycetemcomitans* sérotype b. Chez cet organisme, ces ORFs présentaient une grande homologie avec des protéines d'un système de transport ABC. Des analyses de séquences ont démontré que l'insertion du mini-Tn10 des mutants 1.1 et 15.1 était localisée dans un gène (ORF12: 2766 pb) (Annexe 1) codant pour une protéine ayant une homologie avec la protéine ExpE4 de *S. meliloti* (25%). Cet ORF se situait à une extrémité du fragment *EcoRI* de 13500 pb. En fait, près du milieu de l'ORF12 (après la 576^{ième} pb) on retrouvait un site *EcoRI* qui nous empêchait à prime abord d'obtenir la séquence complète de cet ORF. Nous avons donc dû envisager une autre approche qui consistait à utiliser la séquence d'ADN connue de cet ORF afin de préparer une sonde marquée à la DIG et utiliser cette dernière pour cribler une banque phagique d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (151). Après trois rondes de criblage successives, un des clones positifs a été séquencé en utilisant une amorce spécifique à l'ORF12. Il nous a donc été possible d'obtenir la séquence complète de cet ORF et des informations concernant les séquences retrouvées en aval de l'ORF12. Nous avons donc pu mettre en

évidence 3 autres ORFs (les ORFs 13, 14 et 15) qui ont démontré de fortes homologies avec les ORF15, ORF16 et ORF17 précédemment identifiés chez *A. actinomycetemcomitans* sérotype b. Cependant, même si ces ORFs font partie d'une région de gènes impliqués dans la biosynthèse de polysaccharide-O chez *A. actinomycetemcomitans* (163), aucune homologie avec des protéines rapportées précédemment n'a été retrouvée.

Le séquençage du fragment *EcoRI* de 3.5 kb a révélé 3 ORFs (ORF16, ORF17 et ORF18). Pour le mutant 51.1, le produit de l'ORF (ORF16; 873 pb) (Annexe 2) dans lequel était inséré le mini-Tn10 avait une homologie (42%) avec la protéine RfbF de *S. flexneri*. En ce qui concerne le mutant 44.1 (ORF17; 912 pb) (Annexe 2), on retrouvait une homologie (58%) avec la protéine RfbN d'*A. actinomycetemcomitans*. Ces deux protéines sont impliquées dans le transfert de rhamnose (rhamnosyl transférases). Chez les mutants 24.1, 27.1 et 36.1 (ORF18; 1419 pb) (Annexe 2) le produit du gène muté avait pour sa part une homologie (64%) avec la protéine RfbP d'*H. influenzae*. Cette protéine est reconnue comme étant importante dans la formation de l'antigène-O puisqu'elle agit sur la liaison du premier sucre au transporteur lipidique (Und-P) (114); la perte de cette fonction inhibe la formation de l'antigène-O et aucun sucre ne peut se lier au complexe noyau-lipide A préformé (138). Il est à noter que les mutants 24.1 et 36.1 montraient une insertion du mini-Tn10 exactement à la même position sur l'ORF18 (après le nucléotide 1334). De plus, il est intéressant de constater que les ORFs 17 et 18 identifiés chez *A. pleuropneumoniae* correspondent aux ORFs 20 et 21 mis en évidence chez *A. actinomycetemcomitans* sérotype b. Les séquences (environ 250 pb) en aval de l'ORF18 ont révélé une homologie avec une protéine ribosomale S21 d'*H. influenzae*. Par contre, les 100 pb retrouvées en amont de l'ORF16 se sont avérées n'avoir aucune homologie avec les séquences retrouvées dans les banques de données. Nous avons donc décidé d'utiliser de nouveau la banque phagique et de la cribler en utilisant cette fois avec sonde spécifique à l'ORF16. Or, la région immédiatement en amont de l'ORF16 s'est finalement avérée comporter l'ORF15, démontrant ainsi que les deux fragments *EcoRI* distincts n'étaient seulement qu'à 2.7 kb l'un de l'autre.

Nous avons ensuite analysé plus précisément les séquences retrouvées en amont et en aval des 4 ORFs impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Un site potentiel de liaison du ribosome a pu être

identifié à une distance de -16 de l'ORF17 et de -11 en ce qui concerne l'ORF18 (Annexe 2).

La structure de l'antigène-O chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 consiste en un tétrasaccharide d'unités répétées composées de 2 résidus de rhamnose, d'un résidu de glucose et d'un résidu de N-acétyl glucosamine (1). Or, il est intéressant de noter que l'ORF12 code pour une protéine impliquée dans le transfert d'un sucre (glycosyltransférase) et que deux des ORFs que nous avons identifiés (ORF16 et ORF17) codent pour des protéines impliquées dans le transfert de rhamnose. Quant à l'ORF18, il code pour une protéine ayant une homologie avec l'undécaprényl-phosphate galactosephosphotransférase (RfbP) d'*Haemophilus* et de *Salmonella*. RfbP catalyse le transfert réversible d'un galactose 1-phosphate au Und-P, étape initiale lors de la biosynthèse des chaînes-O chez toutes les souches dont la synthèse de l'antigène-O débute avec un galactose (114). Cependant, étant donné l'absence de galactose dans l'antigène-O d'*A. pleuropneumoniae*, il est fort probable que le produit de ce gène ait la même fonction mais reconnaisse un sucre différent. Une autre fonction est également attribuée à RfbP qui agirait en fait lors de l'exportation de l'antigène-O (114). Cependant, ce mécanisme demeure encore relativement peu connu.

L'identification d'une région de 18 ORFs chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 nous a permis de constater une très grande similarité entre cette bactérie et *A. actinomycetemcomitans* sérotype b étant donné qu'onze ORFs se sont avérés présents chez ces deux organismes et dans le même ordre consécutif. Chez *A. actinomycetemcomitans* sérotype b, ces ORFs font partie d'une région associée à la biosynthèse d'un antigène spécifique de sérotype (163) qui a été rapporté précédemment comme étant un constituant de la région polysaccharidique du LPS chez cet organisme (108). La même région pourrait donc être impliquée dans la biosynthèse de l'antigène-O chez *A. pleuropneumoniae*. Chez les bactéries entériques telles que *E. coli*, *S. Typhimurium* et *Y. enterocolitica*, le chromosome contient un opéron *rfb*, composé de 11 à 18 gènes, qui est impliqué directement dans la biosynthèse de l'antigène-O chez ces bactéries. Par contre, chez *H. influenzae* les gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS sont plutôt distribués de façon aléatoire sur le chromosome bactérien. Or, même si les ORFs identifiés au cours de cette étude ont démontré une grande homologie avec un

opéron associé à la biosynthèse de l'antigène-O chez *A. actinomycetemcomitans* sérotype b, nous demeurons prudents quant à l'utilisation du terme opéron en ce qui concerne *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 étant donné que les 4 différents gènes de biosynthèse de LPS que nous avons identifiés sont séparés par d'autres gènes dont la fonction demeure encore inconnue pour l'instant.

Nous avons par la suite voulu déterminer si les 4 ORFs impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (ORF12, ORF16, ORF17, ORF18) étaient conservés parmi les 12 sérotypes. Des amplifications par PCR et des analyses par hybridation avec des sondes marquées à la DIG nous ont révélé que ces 4 ORFs étaient également retrouvés chez les sérotypes 9 et 11. Nous savons que des similarités au niveau de la structure de l'antigène-O ont pu être observées chez les sérotypes 1, 9 et 11 et ces similarités sont responsables des réactions sérologiques croisées retrouvées parmi ces sérotypes (21; 107). Nous avons également étudié la distribution des 3 gènes impliqués dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique identifiés lors d'études précédentes (51; 122) et ces 3 gènes se sont avérés être présents chez les 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. La structure du noyau oligosaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* n'est pas connue pour l'instant (des travaux sont cependant en cours afin de la déterminer) mais il s'agit de façon générale d'une partie beaucoup plus conservée chez les bactéries que l'antigène-O. De plus, il est intéressant de noter que les 4 gènes putatifs impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O et identifiés dans notre étude (ORF12, ORF16, ORF17, ORF18) possèdent un pourcentage en G+C d'environ 30%, ce qui est beaucoup plus faible que le pourcentage de G+C du chromosome d'*A. pleuropneumoniae* qui se situe aux alentours de 43.2% (110). Cependant, ceci semble caractéristique aux opérons *rfb* qui ont été identifiés chez d'autres bactéries. En effet, des études effectuées entre autres chez *V. cholerae* O139 (162) ont démontré que les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O chez cette bactérie ont un pourcentage de G+C variant de 32 à 39% comparativement à 48% pour le génome complet de cette bactérie. D'autres études ont démontré des résultats comparables chez plusieurs bactéries telles qu'*E. coli* O157 (154) et *Azotobacter vinelandii* (57). L'ensemble de ces résultats indiquent donc que de façon assez courante, les gènes responsables de la biosynthèse de l'antigène-O chez les bactéries ont été acquis de

d'autres espèces par transfert horizontal. Cependant, rien n'indique que ces gènes proviennent tous de la même espèce.

Les LPS sont des molécules complexes faisant partie de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. La partie polysaccharidique du LPS est hydrophile en comparaison avec le lipide A qui sert d'ancrage à la membrane. Nous savons que les interactions hydrophobes ont été impliquées dans une variété de phénomènes d'adhésion (129). Ainsi, nous avons voulu déterminer l'hydrophobicité des mutants par rapport à la souche mère grâce à une technique qui est basée sur le degré d'adhérence des cellules avec un hydrocarbure (128). Les mutants LPS rugueux se sont tous montrés clairement hydrophiles, tout comme la souche mère, en comparaison avec le mutant acapsulé qui s'est révélé plus hydrophobe. Or, différents isolats d'*A. pleuropneumoniae* avaient été testés lors d'une étude précédente pour leur hydrophobicité de surface (73) et ces derniers étaient tous hydrophiles confirmant ainsi l'ensemble des études qui révèlent que la capsule polysaccharidique semble diminuer l'hydrophobicité de surface (127; 129; 148). Les molécules hydrophobes seraient donc plus accessibles à la surface de cellules peu ou pas capsulées.

Nous avons par la suite évalué la charge de surface des mutants en déterminant leur potentiel zêta. Nos résultats indiquent qu'en absence de matériel capsulaire chargé négativement, le potentiel zêta est affecté significativement, comme le démontre une plus faible électronégativité observé chez le mutant acapsulé. Par contre, la capsule ne semble pas être la seule responsable de la charge de surface cellulaire. En effet, un des mutants au niveau du noyau oligosaccharidique a démontré un potentiel zêta comparable à celui observé chez le mutant acapsulé. Ce mutant possède une insertion du mini-Tn10 dans un gène présentant une homologie avec *waaB* de *S. Typhimurium* (51). Étant donné que le gène *waaB* est responsable de la substitution d'un hexose lors de la synthèse de noyau oligosaccharidique, nous pouvons penser que cette substitution consiste en fait en l'addition d'un résidu chargé négativement tel un groupement phosphate. Cependant, étant donné que la structure du noyau oligosaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* n'est pas encore connue, nous ne pouvons valider cette hypothèse pour l'instant.

Récemment, la liaison de l'hémoglobine porcine au LPS d'*A. pleuropneumoniae* a été démontrée (6; 11) et cette liaison serait attribuable au lipide A de la molécule de LPS. Nous avons voulu voir le rôle que pouvait jouer les polysaccharides de surface dans l'activité de liaison de l'hémoglobine. Les mutants isogènes LPS et le mutant acapsulé d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ont été testés par cytométrie en flux. L'activité liant l'hémoglobine des mutants LPS analysés dans cette étude était comparable à celle de la souche mère. Ces résultats semblent indiquer que des mutations dans la région du noyau oligosaccharidique ou de l'antigène-O n'affectent pas ou peu l'activité liant l'hémoglobine qui implique d'ailleurs le lipide A. Par contre, les expériences menées avec le mutant acapsulé ont indiqué que des molécules de surface possédant une activité liant l'hémoglobine étaient plus exposées à la surface cellulaire en absence de polysaccharide capsulaire. Le matériel capsulaire semble donc masquer des composantes importantes de la membrane externe qui sont impliquées dans l'activité liant l'hémoglobine. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés précédemment dans notre laboratoire par Archambault et coll (7).

Nous voulions aussi évaluer l'activité biologique des LPS des mutants comparativement à celle de la souche mère. Les résultats du test cLAL nous ont indiqué que les mutants avaient tous une activité biologique comparable à celle de la souche mère. Ces résultats ne nous ont pas tellement surpris étant donné que la partie lipidique du LPS est impliquée dans l'activation des facteurs LAL et qu'il ne devrait y avoir aucune différence au niveau du lipide A entre les mutants et la souche mère.

Finalement, des études précédentes avaient révélé que le mutant acapsulé (*cpxC*) (123) et qu'un mutant noyau oligosaccharidique (*galU*) d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 étaient beaucoup moins virulents que la souche mère lorsque testés expérimentalement chez le porc. Nous avons donc voulu évaluer le pouvoir pathogène expérimental d'un mutant rugueux toujours en comparaison avec la souche mère. Le mutant rugueux testé (27.1) a démontré une virulence et des signes cliniques caractéristiques à la pleuropneumonie identiques à ceux retrouvés chez la souche-mère, ce qui indique que l'absence de chaînes-O n'a pas d'influence significative sur la virulence de la bactérie lorsque testée expérimentalement chez le porc.

V. CONCLUSION

Ce travail apporte de nouvelles connaissances sur les LPS d'*A. pleuropneumoniae* principalement en ce qui concerne leur biosynthèse et leur influence sur certaines propriétés de surface et la virulence chez le porc. Différents gènes d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ont été identifiés dans cette étude et leur organisation semble être similaire à celle retrouvée chez *A. actinomycetemcomitans* sérotype b. Chez cet organisme, les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antigène spécifique de sérotype, un constituant de la région polysaccharidique du LPS, sont regroupés en opéron. Or, les gènes identifiés chez *A. pleuropneumoniae* et ayant un rôle dans la biosynthèse de l'antigène-O ont démontré des homologies et une organisation similaire à quelques-uns des gènes de l'opéron impliqué dans la synthèse de polysaccharide-O chez *A. actinomycetemcomitans* sérotype b. La caractérisation de mutants rugueux a permis d'identifier pour la première fois 4 ORFs impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Ces ORFs se sont avérés également présents chez les sérotypes 9 et 11 lesquels possèdent un antigène-O qui croise sérologiquement avec celui du sérotype 1. L'évaluation de quelques propriétés de surface de ces mutants semblent indiquer que l'absence de chaînes-O n'aurait pas d'influence sur la virulence, de même que sur l'hydrophobicité, la charge de surface, la liaison de l'hémoglobine porcine et l'activité biologique des LPS dans un test cLAL. Nos résultats suggèrent plutôt que les polysaccharides capsulaires auraient une influence plus grande sur les propriétés de surface d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et sur sa virulence chez le porc que les chaînes-O du LPS.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. **Altman, E., J.-R. Brisson and M. B. Perry.** 1986. Structure of the O-chain of the lipopolysaccharide of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1. *Biochem. Cell Biol.* **64**: 1317-1325.
2. **Anderson, C., A. A. Potter and G.-F. Gerlach.** 1991. Isolation and molecular characterization of spontaneously occurring cytolysin-negative mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Infect. Immun.* **59**: 4110-4116.
3. **Anderson, M. S., H. S. Bull, S. M. Galloway, T. M. Kelly, S. Mohan, K. Radika and 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.
4. **Anderson, M. S. and 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.
5. **Archambault, M.** 1999. Étude de la liaison de l'hémoglobine porcine chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Thèse de doctorat. Université de Montréal. 150 p.
6. **Archambault, M., M. Olivier, B. Foiry, M. D. Diarra, S.-É. Paradis and M. Jacques.** 1997. Effects of pig hemoglobine binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.* **4**: 53-65.
7. **Archambault, M., S. Rioux and M. Jacques.** 1999. Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**: 17-25.
8. **Austin, E. A., J. F. Graves, L. A. Hite, C. T. Parker and C. A. Schnaitman.** 1990. Genetic analysis of lipopolysaccharide core biosynthesis by *Escherichia coli* : insertion mutagenesis of the *rfa* locus. *J. Bacteriol.* **172**: 5312-5325.
9. **Bada Alamedji, R. and J. D. Dubreuil.** 1993. Comparaison de deux antigènes de nature polysaccharidique pour le diagnostic sérologique par ELISA de la pleuropneumonie porcine (sérotipe 5). *J. Vet. Med* **B40**: 253-260.
10. **Beck, M., J. F. Van Den Bosch, I. M. C. A. Jongenelen, P. L. W. Loeffen, R. Nielsen, J. Nicolet and J. Frey.** 1994. RTX toxins and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2749-2754.
11. **Bélanger, M., C. Bégin and M. Jacques.** 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**: 656-662.

12. **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.
13. **Bélanger, M., D. Dubreuil and M. Jacques.** 1994. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **62**: 868-873.
14. **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.
15. **Belunis, C. J., T. Clementz, S. M. Carty and C. R. H. Raetz.** 1995. Inhibition of lipopolysaccharide biosynthesis and cell growth following inactivation of the *kdtA* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**: 27646-27652.
16. **Bertram, T. A.** 1985. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.* **22**: 598-609.
17. **Bertram, T. A.** 1986. Intravascular macrophages in lungs of pigs infected with *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Pathol.* **23**: 681-691.
18. **Bertram, T. A.** 1988. Pathobiology of acute pulmonary lesions in swines infected with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* **29**: 574-577.
19. **Bertram, T. A.** 1990. *Actinobacillus pleuropneumoniae* : molecular aspects of virulence and pulmonary injury. *Can. J. Vet. Res.* **54**: S53-S56.
20. **Bertschinger, H. U. and P. Seifert.** 1978. Isolation of *Pasteurella haemolytica*-like organism from porcine necrotic pleuropneumoniae. *Proc 5th Int. Pig Vet. Soc. Cong.* Abstract M19.
21. **Beynon, L. M., D. W. Griffith, J. C. Richards and M. B. Perry.** 1992. Characterization of the lipopolysaccharide O antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 9 and 11: antigenic relationships among serotypes 9, 11, and 1. *J. Bacteriol.* **174**: 5324-5331.
22. **Bosse, J. T. and J. I. MacInnes.** 2000. Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Can. J. Vet. Res.* **64**: 145-150.
23. **Brandreth, S. R. and I. M. Smith.** 1987. Comparative virulence of some English strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 2 and 3 in the pig. *Res. Vet. Sci.* **42**: 187-193.
24. **Byrd, W. and A. M. Hooke.** 1997. Temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* induce protection in mice. *Infect. Immun.* **65**: 2206-2210.

25. **Byrd, W. and S. Kadis.** 1989. Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect. Immun.* **57**: 3901-3906.
26. **Chang, Y.-F., D.-P. Ma, J. Shi and M. M. Chengappa.** 1993. Molecular characterization of a leukotoxin gene from a *Pasteurella haemolytica*-like organism, encoding a new member of the RTX toxin family. *Infect. Immun.* **61**: 2089-2095.
27. **Chiers, K., I. Van Overbeke, P. Delaender, R. Ducatelle, S. Carel and F. Haesebrouck.** 1998. Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the APX toxins. *Vet. Quarterly* **20**: 65-69.
28. **Clementz, T., J. Bednarski and C. R. H. Raetz.** 1995. *Escherichia coli* genes encoding Kdo dependant acyltransferase that incorporate laurate and myristate into lipid A. *FASEB J.* **9**: A1311.
29. **Coleman, J. and 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.
30. **Coleman, W. G. J.** 1983. The *rfaD* gene codes for ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase. *J. Biol. Chem.* **258**: 1985-1990.
31. **Crowell, D. N., W. S. Reznikoff and C. R. H. Raetz.** 1987. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene for lipid A disaccharide synthase. *J. Bacteriol.* **169**: 5727-5734.
32. **Cundell, D. R. and E. Tuomanen.** 1995. Attachment and interaction of bacteria at respiratory mucosal surfaces. Dans: *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. Édité par: J. A. Roth, C. A. Bolin, K. A. Brogden, F. C. Minion and M. J. Wannemuehler. Washington, D. C., American Society for Microbiology: 3-20.
33. **Desrosiers, R., K. R. Mittal and R. Malo.** 1984. Porcine pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 3 in Quebec. *Vet. Rec.* **115**: 628-629.
34. **Devendish, J., S. Rosendal and J. T. Bossé.** 1990. Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunisation with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **58**: 3829-3832.
35. **Diarra, M. S., J. A. Dolence, E. K. Dolence, I. Darwish, M. J. Miller, F. Malouin and M. Jacques.** 1996. Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 853-859.

36. **Dom, P., F. Haesebrouck, R. Ducatelle and G. Charlier.** 1994. In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infect. Immun.* **62**: 1262-1267.
37. **Fedorka-Cray, P. J., L. Hoffman, W. C. J. Cray, J. T. Gray, S. Breish and G. A. Anderson.** 1993. *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Part I. History, Epidemiology, Serotyping, and Treatment. *Compend. Cont. Edu. Pract. Vet.* **15**: 1447-1455.
38. **Fenwick, B. W.** 1990. Virulence attributes of the lipopolysaccharides of HAP group of organisms. *Can. J. Vet. Res.* **54**: S28-S32.
39. **Fenwick, B. W. and B. I. Osburn.** 1986. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect. Immun.* **54**: 575-5832.
40. **Fenwick, B. W., B. I. Osburn and H. J. Olander.** 1986. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 1433-1441.
41. **Frey, J.** 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* **3**: 257-261.
42. **Frey, J., M. Beck, U. Stucki and J. Nicolet.** 1993. Analysis of hemolysins operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* **123**: 51-58.
43. **Frey, J., J. T. Bosse, 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. Rycroft, R. P. A. M. Segers, M. A. Smits, E. Stenbaek, D. K. Struck, J. F. van der Bosch, P. J. Willson and R. Young.** 1993. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of hemolysins, cytolysins, pleurotoxin, and their genes. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1723-1728.
44. **Frey, J., R. Kuhn, J. MacInnes and J. Nicolet.** 1997. Characterization of a novel RTX determinant in *Actinobacillus pleuropneumoniae* which is not expressed under culture conditions. Eighth European Workshop Conference on Bacterial Protein Toxin, Kloster Banz, Staffelstein, Allemagne
45. **Frey, J., R. Meier, D. Gygi and J. Nicolet.** 1991. Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **59**: 3026-3032.
46. **Frey, J. and J. Nicolet.** 1988. Purification and partial characterization of a hemolysin produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* type strain 4074. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**: 41-46.

47. **Frey, J. and J. Nicolet.** 1990. Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Clin. Microbiol. **28**: 232-236.
48. **Frey, J., H. van den Bosch, R. Segers and J. Nicolet.** 1992. Identification of a second hemolysin (HlyII) in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 and expression of the gene in *Escherichia coli*. Infect. Immun. **60**: 1671-1676.
49. **Fuller, T. E., B. J. Thacker and M. H. Mulks.** 1996. A riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is attenuated in swine. Infect. Immun. **64**: 4659-4664.
50. **Gagné, A., S. Lacouture, A. Broes, S. D'Allaire and M. Gottschalk.** 1998. Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. J. Clin. Microbiol. **36**: 251-254.
51. **Galarneau, C., S. Rioux and M. Jacques.** 2000. Core oligosaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 obtained by mini-Tn10 mutagenesis. Pathogenesis **1**: 253-264.
52. **Gerlach, G. F., C. Anderson, S. Klashinsky, A. Rossicampos, A. A. Potter and J. P. Willson.** 1993. Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Infect. Immun. **61**: 565-572.
53. **Gerlach, G. F., C. Anderson, A. A. Potter, S. Klashinsky and P. J. Willson.** 1992. Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun. **60**: 892-898.
54. **Gonzalez, G. C., D. L. Caamano and A. B. Schryvers.** 1990. Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mol. Microbiol. **4**: 1173-1179.
55. **Gottschalk, M., E. Altman, S. Lacouture, F. Delasalle and J. D. Dubreuil.** 1997. Serodiagnosis of swine pleuropneumoniae due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 7 and 4 using long-chain lipopolysaccharides. Can. J. Vet. Res. **61**: 62-65.
56. **Haesebrouck, F., K. Chiers, I. Van Overbeke and R. Ducatelle.** 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. Vet. Microbiol. **58**: 238-249.
57. **Hausman, B. S., J. A. Williamson, R. P. Schreiner, L. Pulakat and N. Gavini.** 1998. The *rfb* genes in *Azobacter vinelandii* are arranged in a *rfbFGC* gene cluster: a significant deviation to the arrangement of the *rfb* genes in *Enterobacteriaceae*. Biochem. Biophys. Res. Commun **245**: 572-582.

58. **Heinrichs, D. E., M. A. Monteiro, M. B. Perry and C. Whitfiel.** 1998. The assembly system for the lipopolysaccharide R2 core-type of *Escherichia coli* is a hybrid of those found in *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella enterica*. *J. Biol. Chem.* **273**: 8849-8859.
59. **Herrero, M., V. de Lorenzo and K. N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosome insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
60. **Higgins, R., S. Larivière, K. R. Mittal, G.-P. Martineau, P. Rousseau and J. Cameron.** 1985. Evaluation of killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* **26**: 86-89.
61. **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.
62. **Inzana, T. J.** 1990. Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. *Can. J. Vet. Res.* **54**: S22-S27.
63. **Inzana, T. J.** 1991. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Pathogen.* **11**: 305-316.
64. **Inzana, T. J., J. N. Ma, T. Workman, R. P. Gogolewski and P. Anderson.** 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **56**: 1880-1889.
65. **Inzana, T. J. and B. Mathison.** 1987. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **55**: 1580-1587.
66. **Inzana, T. J., J. M. Todd, J. N. MA and H. P. Veit.** 1991. Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in the virulence and immunoprotection. *Microb. Pathogen.* **10**: 281-296.
67. **Inzana, T. J., J. M. Todd and H. P. Veit.** 1993. Safety, stability and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect. Immun.* **61**: 1682-1686.
68. **Issartel, J.-P., V. Koronakis and C. Hugues.** 1991. Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* **351**: 759-761.
69. **Jacques, M.** 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **4**: 408-410.

70. **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.
71. **Jacques, M. and S. Paradis.** 1998. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 45-59.
72. **Jacques, M., S. Rioux, S.-É. Paradis, C. Bégin and M. Gottschalk.** 1996. Identification of two core types in lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* representing serotypes 1 to 12. *Can. J. Microbiol.* **42**: 855-858.
73. **Jacques, M., G. Roy and K. R. Mittal.** 1988. Hemagglutinating properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1046-1049.
74. **Jansen, R., J. Briaire, E. M. Kamp, A. L. J. Gielkens and M. A. Smits.** 1993. Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin III (Apx III) gene. *Infect. Immun.* **61**: 947-954.
75. **Jansen, R., J. Briaire, H. E. Smith, P. Dom, F. Haesebrouck, E. M. Kamp, A. L. J. Gielkens and 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.
76. **Jensen, A. E. and T. A. Bertram.** 1986. Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolate of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **51**: 419-424.
77. **Jolie, R. A., M. H. Mulks and B. J. Thacker.** 1994. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.* **38**: 329-349.
78. **Kamp, E. M., J. K. Popma, J. Anakotta and M. A. Smits.** 1991. Identification of a hemolytic and cytolytic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **59**: 3079-3085.
79. **Kamp, E. M., J. K. Popma and L. A. M. G. van Leengoed.** 1987. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the Netherland with emphasis on heterogeneity within serotype 2 and (proposal) serotype 9. *Vet. Microbiol.* **13**: 249-257.
80. **Kamp, E. M., T. M. M. Vermeulen, M. A. Smits and J. Haagsma.** 1994. Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.* **62**: 4063-4065.
81. **Kelly, T. M., S. A. Stahcula, C. R. H. Raetz and M. S. Anderson.** 1993. The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-a-D-glucosamine-N-acyltransferase the third step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**: 19866-19874.

82. **Kilian, M.** 1976. The haemolytic activity of *Haemophilus* species. Acta Vet. Scand. **84**: 339-341.
83. **Kilian, M., J. Nicolet and E. Biberstein.** 1978. Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Matthews and Patterson 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. Int. J. Syst. Bacteriol. **28**: 20-26.
84. **Kroll, J. S., P. R. Langford, K. E. Wilks and A. D. Keil.** 1995. Bacterial [Cu, Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eucaryotic enzyme, and not so rare after all! Microbiology **141**: 2271-2279.
85. **Lacouture, S., K. R. Mittal, M. Jacques and M. Gottschalk.** 1997. Serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the use of monoclonal antibodies. J. Vet. Diagn. Invest. **9**: 337-341.
86. **Liggett, A. D. and L. R. Harrison.** 1987. Sequential study of lesion development in experimental *Haemophilus pleuropneumoniae*. Res. Vet. Sci. **42**: 204-221.
87. **Mandrell, R. E. and M. A. Apicella.** 1993. Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS immunobiology. Immunobiology **187**: 382-402.
88. **Mittal, K. R.** 1990. Cross-reactions between *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 and 9. J. Clin. Microbiol. **29**: 535-539.
89. **Mittal, K. R.** 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Québec. Vet. Microbiol. **32**: 135-148.
90. **Mittal, K. R. and S. Bourdon.** 1991. Cross-reactivity and antigenic heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 4 and 7. J. Clin. Microbiol. **29**: 1344-1347.
91. **Mittal, K. R., S. Bourdon and R. Higgins.** 1998. Évolution de la distribution des différents sérotypes d'*Actionobacillus pleuropneumoniae* provenant de porcs malades au Québec. Méd. Vét. Québec **28**: 91-92.
92. **Mittal, K. R., R. Higgins and S. Larivière.** 1983. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. J. Clin. Microbiol. **18**: 1351-1354.
93. **Mittal, K. R., R. Higgins and S. Larivière.** 1987. An evaluation of agglutination and coagglutination techniques for serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates. Am. J. Vet. Res. **48**: 219-226.
94. **Mulks, M. H., E. R. Moxon, J. Bricker, A. Wright and A. G. Plaut.** 1984. Examination of *Haemophilus pleuropneumoniae* for immunoglobulin A protease activity. Infect. Immun. **45**: 276-277.

95. **Nicolet, J.** 1970. Aspects microbiologiques de la pleuropneumonie contagieuse du porc. Thèse d'habilitation. Université de Berne. Berne.
96. **Nicolet, J.** 1985. *Haemophilus pleuropneumoniae* bacteriology and epidemiology. Dans: Compendium of swine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Édité par: R. A. Schultz, Proc. Am. Assoc. Swine Pract.: 7-11.
97. **Nicolet, J.** 1990. Overview of the virulence attributes of the HAP-group of bacteria. Can. J. Vet. Res. **54**: S12-S15.
98. **Nielsen, R.** 1985. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 9. Acta Vet. Scand. **26**: 501-512.
99. **Nielsen, R.** 1985. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 10. Acta Vet. Scand. **26**: 581-585.
100. **Nielsen, R.** 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. Acta Vet. Scand. **27**: 453-455.
101. **Nielsen, R.** 1986. Serology of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtype a and b. Acta Vet. Scand. **27**: 49-58.
102. **Nielsen, R. and P. J. O'Connor.** 1984. Serological characterization: *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of new serotype: serotype 8. Acta Vet. Scand. **25**: 96-106.
103. **Niven, D. F. and M. Lévesque.** 1988. V-factor dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008/76). Int. J. Syst. Bacteriol. **38**: 319-320.
104. **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.
105. **Parker, C. T., E. Pradel and 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.
106. **Pattison, I. H., D. J. Howell and J. Elliot.** 1957. A *Haemophilus*-like organism isolated from pigs lung and associated pneumonic lesion. J. Comp. Pathol. **67**: 320-329.
107. **Perry, M. B., E. Altman, J.-R. Brisson, L. M. Beynon and J. C. Richards.** 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus*

- (*Haemophilus pleuropneumoniae* strains. Serol. Immunother. Inf. Dis. **4**: 299-308.
108. **Perry, M. B., L. L. MacLean, R. Gmür and M. E. Wilson.** 1996. Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. Infect. Immun. **64**: 1215-1219.
 109. **Pier, G. B.** 2000. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 8822-8828.
 110. **Pohl, S., H. U. Bertschinger, W. Frederiksen and W. Mannheim.** 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int. J. Syst. Bacteriol. **33**: 510-514.
 111. **Pradel, E. and C. A. Schnaitman.** 1991. Effect of the *rfaH* (*sfrB*) and temperature on the expression of *rfa* genes of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **173**: 6428-6431.
 112. **Prideaux, C. T., C. Lenghaus, J. Krywult and A. L. Hodgson.** 1999. Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the ApxII operon. Infect. Immun. **67**: 1962-1966.
 113. **Radacovici, S., M. Gottschalk and J. D. Dubreuil.** 1994. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotype 1): a readily obtainable antigen for ELISA serodiagnosis of pig pleuropneumonia. Vet. Microbiol. **39**: 219-230.
 114. **Raetz, C. R. H.** 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. Dans: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Édité par: F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham et al. Washington, D. C., Am. Soc. Microbiol. **1**: 1035-1063.
 115. **Raina, S. and C. Georgopoulos.** 1991. The *htrM* gene, whose product is essential for *Escherichia coli* viability only at elevated temperature, is identical to the *rfaD* gene. Nucleic Acids Res. **19**: 3811-3819.
 116. **Rapp, V. J., R. S. J. Munson and R. F. Ross.** 1986. Outer membrane protein profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Infect. Immun. **52**: 414-420.
 117. **Ray, B. and C. R. H. Raetz.** 1987. The biosynthesis of gram-negative endotoxin: a novel kinase in *Escherichia coli* membrane that incorporates the 4'phosphate of lipid A. J. Biol. Chem. **262**: 1122-1128.

118. **Reeves, P.** 1994. Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide. Dans: Bacterial cell wall: new comprehensive biochemistry. Édité par: A. Neuberger and L. L. M. van Deenen. New York, Elsevier Science Publishers. **27**.
119. **Reimer, D., J. Frey, R. Jansen, H. P. Veit and 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.
120. **Ricard, M. A., F. S. Archibald and D. F. Niven.** 1991. Isolation and identification of a putative porcine transferrin receptor from *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2733-2740.
121. **Rioux, S., D. Dubreuil, C. Bégin, C. Laferrière, D. Martin and M. Jacques.** 1997. Evaluation of protective efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 lipopolysaccharide-protein conjugate in mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **20**: 63-74.
122. **Rioux, S., C. Galarneau, J. Harel, J. Frey, J. Nicolet, M. Kobisch, J. D. Dubreuil and M. Jacques.** 1999. Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Microbiol.* **45**: 1017-1026.
123. **Rioux, S., C. Galarneau, J. Harel, M. Kobisch, J. Frey, M. Gottschalk and M. Jacques.** 2000. Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb. Pathogen.* **28**: 279-289.
124. **Rioux, S., C. Girard, J. D. Dubreuil and M. Jacques.** 1998. Evaluation of the protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 detoxified lipopolysaccharides or O-polysaccharide-protein conjugate in pigs. *Res. Vet. Sci.* **65**: 165-167.
125. **Rodriguez-Barbosa, J. I., C. B. Gutiérrez, R. I. Tascon, J. Suarez and E. F. Rodriguez-Ferri.** 1995. Evidence obtained with monoclonal antibodies that O antigen is the major antigen responsible for the cross-reactivities between serotypes 4 and 7 of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **2**: 563-568.
126. **Roncero, C. and M. Casaban.** 1992. Genetic analysis of the genes involved in the synthesis of lipopolysaccharide core in *E. coli* K12: three operons in the *rfa* locus. *J. Bacteriol.* **174**: 3250-3260.
127. **Rosenberg, E., N. Kaplan, O. Pines, M. Rosenberg and D. Gutnick.** 1983. Capsular polysaccharides of *Acinetobacter calcoaceticus* to hydrocarbon. *FEMS Microbiol. Lett.* **17**: 157-160.
128. **Rosenberg, M., D. Gutnick and E. Rosenberg.** 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 29-33.

129. **Rosenberg, M. and S. Kjelleberg.** 1986. Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. *Adv. Microb. Ecol.* **9**: 353-393.
130. **Rosendal, S. and D. A. Boyd.** 1982. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 840-843.
131. **Rosendal, S. and D. A. Boyd.** 1986. *Haemophilus*. Dans: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Édité par: C. L. Gyles and C. O. Thoen. Ames, Iowa, Iowa State University Press: 132-134.
132. **Rosendal, S., D. A. Boyd and K. A. Gilbride.** 1985. Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. *Can. J. Comp. Med.* **49**: 68-74.
133. **Rosendal, S. and J. I. MacInnes.** 1990. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* **51**: 711-717.
134. **Rycroft, A. N. and J. M. Cullen.** 1990. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. *Am. J. Vet. Res.* **51**: 1449-1453.
135. **Rycroft, A. N. and L. H. Garside.** 2000. *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *Vet. J.* **159**: 18-36.
136. **Rycroft, A. N., D. William, J. M. Cullen and J. MacDonald.** 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.
137. **Schaller, A., R. Kuhn, P. Kuhnert, J. Nicolet, T. J. Anderson, J. I. MacInnes, R. P. Segers and J. Frey.** 1999. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **145**: 2105-2116.
138. **Schnaitman, C. A. and J. D. Klena.** 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 655-682.
139. **Sheehan, B. J., P. R. Langford, A. N. Rycroft and J. S. Kroll.** 2000. [Cu, Zn]-superoxide dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are unattenuated in infections of the natural host. *Infect. Immun.* **68**: 4778-4781.
140. **Shope, R. E.** 1964. Porcine contagious pleuropneumonia I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. Exp. Med.* **119**: 357-368.
141. **Sirinera, D. M., K. A. Brozek, P. R. MacLachlan, K. E. Sanderson and 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.

142. **Stenbaek, E. I., F. Delasalle and M. Gottschalk.** 1997. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 using an inhibition enzyme immunoassay. *Can. J. Vet. Res.* **61**: 1-7.
143. **Tascón, R. I., E. F. Rodríguez-Ferri, C. B. Gutiérrez-Martín, J. I. Rodríguez-Barbosa, P. Berche and J. A. Vásquez-Boland.** 1993. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. *J. Bacteriol.* **175**: 5717-5722.
144. **Tascón, R. I., J. A. Vásquez-Boland, C. B. Gutiérrez-Martín, I. Rodríguez-Barbosa and E. F. Rodríguez-Ferri.** 1996. Virulence factors in the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiologia SEM* **12**: 171-184.
145. **Tascón, R. I., J. A. Vásquez-Boland, C. B. Gutiérrez-Martín, J. 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.
146. **Tascón, R. I., J. A. Vásquez-Boland, C. B. Gutiérrez-Martín, J. I. Rodríguez-Barbosa and E. F. Rodríguez-Ferri.** 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* does not require urease activity to produce acute swine pleuropneumonia. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**: 53-57.
147. **Taylor, D. J.** 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Dans: Diseases of swine. Édité par: B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling and D. J. Taylor. Ames, Iowa State University Press: 343-354.
148. **Thies, K. L. and F. R. Champlin.** 1989. Compositional factors influencing cell surface hydrophobicity of *Pasteurella multocida* variants. *Curr. Microbiol.* **18**: 385-390.
149. **Udeze, F. A. and S. Kadis.** 1992. Inhibition of bacterial activity of anticapsular antibody by nonspecific antibodies reactive with surface-exposed antigenic determinants on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **60**: 357-358.
150. **Utera, V. and C. Pijoan.** 1991. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet. Rec.* **128**: 357-358.
151. **Vezina, G., M. Sirois, N. Clairoux and M. Boissinot.** 1997. Cloning and characterization of the groE locus from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**: 11-16.
152. **Wallgren, P., T. Segall, M. A. Pedersen and A. Gunnarsson.** 1999. Experimental infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs-I. Comparaison of five different parenteral treatments. *J. Vet. Med. Ser. B* **46**: 249-260.

153. **Wallgren, P., T. Segall, M. A. Pedersen and A. Gunnarsson.** 1999. Experimental infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs-II. Comparison of antibiotics for oral strategic treatment. *J. Vet. Med. Ser. B* **46**: 261-269.
154. **Wang, L. and P. R. Reeves.** 1998. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infect. Immun.* **66**: 3545-3551.
155. **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.
156. **Ward, C. K. and 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.
157. **Ward, C. K., M. L. Lawrence, H. P. Veit and T. J. Inzana.** 1998. Cloning and mutagenesis of serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* **66**: 3326-3336.
158. **Wasteson, Y., D. E. Roe, K. Falk and M. C. Roberts.** 1996. Characterization of tetracycline and erythromycin resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **48**: 41-50.
159. **Welch, R. A.** 1991. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**: 521-528.
160. **White, D. C., G. Leidy, J. D. Jamieson and R. E. Shope.** 1964. Porcine contagious pleuropneumonia III. Interrelationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* to other species of *Haemophilus* : Nutritional, metabolic, transformation and electron microscopy studies. *J. Exp. Med.* **120**: 1-12.
161. **Whitfield, C.** 1995. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* **3**: 178-185.
162. **Yamasaki, S., S. Garg, G. B. Nair and Y. Takeda.** 1999. Distribution of *Vibrio cholerae* O1 antigen biosynthesis genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 115-121.
163. **Yoshida, Y., Y. Nakano, Y. Yamashita and T. Koga.** 1998. Identification of a genetic locus essential for serotype b-specific antigen in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **66**: 107-114.
164. **Young, K., L. L. Silver, D. Bramhill, C. A. Caceres, S. A. Stachula, S. E. Shelly, C. R. H. Raetz and M. S. Anderson.** 1993. The second step of lipid A

biosynthesis, UDP-3-*O*-acyl-GlcNAc deacetylase is encoded by the pleiotropic permeability/cell division gen *envA* of *Escherichia coli*. FASEB J. 7: A1268.

165. **Zhang, Y., J. M. Tennent, A. Ingham, G. Beddome, C. Prodeaux and W. P. Michakski.** 2000. Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. **189**: 15-18.

VII. ANNEXES

ANNEXE 1

Séquence en acides nucléiques et acides aminés correspondants
de l'ORF 12 (11237-14002)
numéro d'accèsion : AF329453

GCTCGTTTAGGATTTGCAATAGCAACTGTAACAAAACCAGATATTCTAATTGTTGATGAAGTTTTAGCCGT
 AGGTGATATCGGTTTCCAAATGAAATGTAAAGCTAGAATGGAAGAACTTTTGAATGGGGGAACAACACTTT
 TATTTGTTTCTCATTCAATTGAGCAAGTAAGGGAGCTCTGTCAAAGGCAATTTGGCTAGATAAGGGGGAAA
 TTAAAGCCAAAGGCAATATCCAAGAGGTTTCTGAAAATTACCTTACTAATATTTAATTATTTACTATTACT

11237

ATG AAT TAT ATG AAA AAA GAA TAT GAA GAA CTT ATC GAA AAG AAT AAG TTA TTA
M N Y M K K E Y E E L I E K N K L L

AAT TAT GAA TTA TTT AAT TTA TCA AAG GAG TTT AAA GAA ACT CAA GAT AGT TTA
 N Y E L F N L S K E F K E T Q D S L

AGT AAA GAG ATT ATA GAA TTA AAA GAA ATC AAG TTA CAT TCT GAG AAT AGG GTT
 S K E I I E L K E I K L H S E N R V

CAA GAG TTA GAG CGT ATA ATT TTC TTA ATG GAA AAT AGT CGT TCT TGG AAA ATG
 Q E L E R I I F L M E N S R S W K M

ACA AAA TAC GCA CGT ATT ACG GGT ATT CTC TTA AGA AGG GTA CAT AAT TTA CTA
 T K Y A R I T G I L L R R V H N L L

ACG CTT CTT CCT ATT GCA ATT AAG AAA AAA GGT GGC TTA GTT AAT TTT GCT AAA
 T L L P I A I K K K G G L V N F A K

TTA TTT TAT TCA AAA TTA CGT CAA GGA GGG TTA AAA AAC CTT CAA TAT GCA ATT
 L F Y S K L R Q G G L K N L Q Y A I

CGG ACA TTT ACA GCA CAT CAA CAG TCA GAA AAT GCT TTT CAT TCA TCT CAG AAT
 R T F T A H Q Q S E N A F H S S Q N

GTT CAA CCT GAA GAC ATT GAT TTT TTA TTT CAT ATC ACT AAG AAT CCA AAT GAA
 V Q P E D I D F L F H I T K N P N E

CTT TTT GAG AAA AGA ATA CTT ATC ATT GCG GAG ATG AGT ATT CCG CAG TGC ACA
 L F E K R I L I I A E M S I P Q C T

AAA TAT CGA GTG AAG CAA AAG CAA GAA TTG TTT GAG TCA TTA GGT ATT AAG AGT
 K Y R V K Q K Q E L F E S L G I K S

GAG ATT GTC TCT TGG ACC GAT TAT ATA CGT TCT AAA CAC CTT ATT TCG TTA AGC
 E I V S W T D Y I R S K H L I S L S

AGT TTA GTC ATT TTC TAT CGT GTG CCT GCG TAT GAT TCA GTT TTA TCA TTA ATT
 S L V I F Y R V P A Y D S V L S L I

GGT GAG TGT AAA CGC CTG AAT ATT AGA ACT TTT TGG GAA GTT GAT GAT TTA ATT
 G E C K R L N I R T F W E V D D L I

TTT GAT GAA AAG GTT TTA AAA GAA AGC CGG ACA ATT AAT TCT CTT GAT ACT GCC
 F D E K V L K E S R T I N S L D T A

ACG GTT AAT TCA CTT TTA GAA GGA GCA AGA TTG TAT CGA GAA GCA ATG TTA GCT
 T V N S L L E G A R L Y R E A M L A

TGT GGG GAA GGT GTT GCT TCA ACT CCG GGT TTA GCC AAA GAA ATG CTT AAA GCT
 C G E G V A S T P G L A K E M L K A

GGA CTA AAA AAT GCT TAT ATT GTA GAG AAT GCA TTA GAT TTA CAA ACA TTA GAA
 G L K N A Y I V E N A L D L Q T L E

ACT GCA AAA GAA ATT TTA TCT AAA CCA TCA AAA ACT AAT GAT AAT AAA ATT AGA
 T A K E I L S K P S K T N D N K I R

ATT GTC TAT GGT TCA GGA ACA TCT ACC CAT AAT ATT GAT TTT GAA GAA GCT GCT
 I V Y G S G T S T H N I D F E E A A

CCT GCG ATT GCC AAA GTT TTA AAA GAA AAT TCA AAT GTC ATT TTC CGC ATT ATT
 P A I A K V L K E N S N V I F R I I

GGT ATG CTT GAT TTG CCG GAT TAT TTT AAT GGA TTA GAA AAA CAA ATT GAA CGT
 G M L D L P D Y F N G L E K Q I E R

ATA GAG TTT TGT AAA TAT CCA GAG TAT TTA CGT TAT TTA TCT GAA TGT GAC ATT
 I E F C K Y P E Y L R Y L S E C D I

AGT ATT GCT CCA TTA GAA GAT TAT ATT TTT AAT GAA TCA AAA AGT AAT ATT AAA
 S I A P L E D Y I F N E S K S N I K

TAT TTA GAG GCA TCA ATT GTT AAA GCT GCA TCT ATT TCT TCG CCA TTA AGT GCA
 Y L E A S I V K A A S I S S P L S A

TTT GTT TCT GTT ATT GAA TCA GGT AAA AAC GGT TTA ATT GCA AAT AAT AGT TCT
 F V S V I E S G K N G L I A N N S S

GAA TGG TAT GAA TTA TTT ACG AAA CTA ATA AAT AAT GTA GAT TAT CGT AAT CAA
 E W Y E L F T K L I N N V D Y R N Q

TTA GCT AAT ACG GCT TAT AAT TTT GTA TTA GAA CGT TAC GCA CCT AAA TTT ATT
 L A N T A Y N F V L E R Y A P K F I

GCG ACT CAA TTA AAT GAG TTT TTA CCT ACT ACA CTA GAA AAA AGA AAG AAA AAA
 A T Q L N E F L P T T L E K R K K K

CGA TTA ATT TCA TTC AAT GTA TTC TAT CGA CCA CGT TCT TTT GGT GGT GCC ACG
 R L I S F N V F Y R P R S F G G A T

ATT GTT GCT GAG CAA ATT AAC GAT TTA ATT GCT GAT TCA AAT GAA TAT GAA GTA
 I V A E Q I N D L I A D S N E Y E V

TAT GAA GTA TTT GTC GTA ACC ACA ATG CCT CCA AGT AGT TTT ATG ACA GCA TAT
 Y E V F V V T T M P P S S F M T A Y

AGC GTT ATG CGA TAT GAG TTG AAT AAT ACA ACT ATT TTT GGT ATT TGT GTG CCA
 S V M R Y E L N N T T I F G I C V P

AAT GAA GAA ATG GAG AAT TAT GAA AAT AAG AAT ATT TAC AAT ATT GTT TCC GAT
 N E E M E N Y E N K N I Y N I V S D

ATC CTT GAG TTA GTA AAT CCT GAT TTA GCC CAT ATT CAT TGT ATT CAA GGC TTA
 I L E L V N P D L A H I H C I Q G L

GGC GTT GGT GTT GTT GAT GCA TGC ACA CAA CGA AAT ATA AAG ACT GCT GTA ACC
 G V G V V D A C T Q R N I K T A V T

TTA CAT GAT GCT TGG TGG ATT TGC CCT CGC CAA TTT ATG ATT AAA GCT GAT GGT
 L H D A W W I C P R Q F M I K A D G

AAG TTC TGT CAT CAA TAT AAA ATT GAT AAA AAT GAA TGT ATA AAA TGT ATT GGT
 K F C H Q Y K I D K N E C I K C I G

AGT ACA TCA GAA TAT TTA TAT CGT AGT AAT AAA TTA TTA AAT AGT TTA AAT AAA
S T S E Y L Y R S N K L L N S L N K

GCT GAT TTG TTA TTA GCT CCG AGC CAA TAT TTC ACG GAT CTA TAC CAA GTA AAC
A D L L L A P S Q Y F T D L Y Q V N

TTA AAT AAA AAA GTG ATG GTA AAT AAA AAT GGG ATT AAA AAA CCT ATT AGA GTA
L N K K V M V N K N G I K K P I R V

TTA CCA AAA TTT AAG AAT AAA ATC ATT AGA TTT GGC TAT GTT GGA GGA CGA ACA
L P K F K N K I I R F G Y V G G R T

AAT ATC AAA GGA ATT CAT CTT ATT CTT GAA GCA TTT AAA AAA TAT AAA TTT AAG
N I K G I H L I L E A F K K Y K F K

AAT GCG GAG TTA GTG GTA GTA GAT AAC TTA CTT AAT TTA GGT CAG AAA TCT TAT
N A E L V V V D N L L N L G Q K S Y

CCT GAA AGT GAT TTT GAT GGT ATT CTT AAA TAT GAA ATT TTA CCA GCT TAT ACG
P E S D F D G I L K Y E I L P A Y T

CAG GAT AAT ATT GAT GAA TTT TTT AAT AGC ATT GAT GTT CTC TTA TTT CCA ACG
Q D N I D E F F N S I D V L L F P T

CAG TGG AAG GAG AGT TTT GGT TTA ACG GTA AGA GAA GCT ATT ATA CGT AAT GTA
Q W K E S F G L T V R E A I I R N V

TGG GTA ATT ACT ACA GAT GCA GGC GGA CCT GTT GAA GGT ATT ATT GAA GGA GTA
W V I T T D A G G P V E G I I E G V

AAT GGT AAT ATT ATT CCT TTT GAT AGT GAT TAT AAA CAA CTG GCA GTT GCG AAT
N G N I I P F D S D Y K Q L A V A I

ATT ATT GTT ATC AAT ACG TAT GAA GCA AGA GAT CCG AAA GAA GAA ATT TTG CTA
Q N V I N T Y E A R D P K E E I L L

GAA AAA ATG CAT ATT GCA ACT TTT GAA GAA CAA AAG AAT GAA TTG ATT CAA TTA
E K M H I A T F E E Q K N E L I Q L

TTT AAA TTG TAA GAAT
F K L *

ATG TTT AAA AAT CTT AAT CTA GAA AAT AAT AGT TTT AAT
M F K N L N L E N N S F N

CGA CTA TTT ATG TTT GGT TTT GCG ATT ATA GTA TTA GTG GTG TCG ATA CTG ACA
R L F M F G F A I I V L V V S I L T

CCT CCT TTT CAG TCA CCT GAT GAA TTT GCT CAT TTT GAA CGT GCA TAT ACT ATT
P P F Q S P D E F A H F E R A Y T I

TCT AAT GGG CAG TTT TTC TTG GAT GAT AAA GGA AAT GGA AAT ATA GAT AAA AAT
S N G Q F F L D D K G N G N I D K N

TTA ACT AAT TTT GAG CAT TTT TAT AAA GCA TTC CCT TTT AAA
L T N F E H F Y K A F P F K

ANNEXE 2

Séquence complète du fragment *Eco*RI de 3518 pb comprenant
les ORFs 16 (75 à 947), 17 (944 à 1855) et 18 (1859 à 3272)
et acides aminés correspondants
Numéro d'accèsion: AF329452

AATTCATTTATTACTCTCTTTTATATCTTATGATGTAATAATTATCCAACGGAATCAATTAGTAAAAATT

75

TAG **ATG** AAT AAT CCC ATT TGT TCT GTT ATT GTT TGT TAT GAA CCA ACT AAG AAA
M N N P I C S V I V C Y E P T K K

ATA TTT TTT TTA ATC AAC TCT CTA ATT AAG CAG AAT GTA TAT CCT ATT ATT ATC
I F F L I N S L I K Q N V Y P I I I

GAT AAT TCA GAA AGG ATC TTT CTG GAT TTT ACC GGT AGT GGA TAT GTA TAT AAA
Y P I I I D N S E R I F L D F T G S

AAA TTA GGA AAG AAT GTT GGT ATT GCA GAT GCA CAA AAT ATA GGT ATT GAT TTA
G Y V Y K K L G K N V G I A D A Q N

GCC TTA GCT TTA AAT GCC AAG GCT ATT GTG TTT TTC GAT CAA GAT TCA ATT ATT
I G I D L A L A L N A K A I V F F D

CCA GAT AAT CTT ATT CAG TTC CTT TAT CGA CCA ATT GAA TCT GGG TAT ACA AGC
Q D S I I P F L Y R P I E S G Y T S

ATT TCT GTA CCA ATT TAT AAA AAT ATA AGC GGT AAC TTT TTT TAT CAG ATT ATT
I S V P I Y K N I S G N F F Y Q I I

AAA TGT AAT AAG ATA GGA TTT CGA ACA AGA ATT ATA CCT CAT ATG GAG ATG GGT
K C N K I G F R T R I I P H M E M G

AAT TTT ACT ACT AAT ATC GCA ATT TCC TCA GGA AGT ATG GTT AAT AGT AAG GTA
N F T T N I A I S S G S M V N S K V

TTT AAT ATT GTA GGA AAA ATG GAT GGT TCA TTA TTT ATC GAT CAT GTT GAT ACT
F N I V G K M D G S L F I D H V D T

GAG TGG TTT TTA AGA GCT AAT GAT AAA GGA TTT GTA ACA TTA GTT GTT ACG CAG
E W F L R A N D K G F V T L V V T Q

GCA GTA ATG GAG CAT ACA ATT GGA GAT CAA TTT ATT AAC TTG AAA TCA ATA AAA
A V M E H T I G D Q F I N L K S I K

ATA CCA GTA CAT TCT CCT TTA AGA CGC TAT TAT CGA GTA AGA AAT AAT TTT CTT
I P V H S P L R R Y Y R V R N N F L

TTA TTA CGA TAT AAG CAT TTC CCT AAG ATA TTA GCA ATA AGA GAA ATT ATT TTT
L L R Y K H F P K I L A I R E I I F

TCT TTC TTG CAT CAA TTT ATT ATT TTA CTT TAT TGT AAG AAT CGG ATG GAG TAT
S F L H Q F I I L L Y C K N R M E Y

CTC AAA TAT TTT TTC AAA GCT ATA AAA GAT GGT ATA TAT AAT AAA AAG GGA AAA
L K Y F F K A I K D G I Y N K K G K

RBS

ATT TCT ⁹⁴⁴AAA **TG** AAA TAT TCG CTT GTT GTT CCA ACT TAT AAT GCA GGA TTA TCT
I S K *

M K Y S L V V P T Y N A G L S

TGG CAG GAA TGG ATT GAG GCT TAT CAA AAT CAA GCT ATA AAA GCT GAA AAG GTA
W Q E W I E A Y Q N Q A I K A E K V

ATT GTT ATT GAT TCG TCT TCA ACG GAT CAA ACA GCG GCT TTA GCT GAG CAA GCG
I V I D S S S T D Q T A A L A E Q A

GAT TTT TTT GTA TAT AAA ATT GAA AAA TCA AAG TTT GAT CAT GGT GGA ACA CGC
D F F V Y K I E K S K F D H G G T R

AAC TTA ACA GTA GAA TTT ACT TCC GAT GAT ACG GAA ATT TTA GTT TTT TTA ACT
N L T V E F T S D D T E I L V F L T

CAA GAT GCT TTA TTT GCA AGT TCA GAT TCT CTA GAA GAA TTA ATA AAA CCT TTC
Q D A L F A S S D S L E E L I K P F

CAA GAT CCT GAA GTA GGG GCT GTT TAT GGT AAG CAG TTA CCT CAC AAA GAT GCG
Q D P E V G A V Y G K Q L P H K D A

ACT CTA TTA GCT GCC CAT GCC AGG TTA TTT AAT TAT CCT CCT AAA AGT ATA ATT
T L L A A H A R L F N Y P P K S I I

AAG TCG AAA GAG AGT ATT TCG GAG TTA GGA TTA AAA ACA GCA TTT ATC TCT AAT
K S K E S I S E L G L K T A F I S N

TCT TTT GCC GCA TAC CGC TGT TCT ATT TTT GAA GAA CTC GGA GGT TTT CCT GAG
S F A A Y R C S I F E E L G G F P E

AAA ACG ATT TTA GCG GAA GAT ATG TAC TTG GCT GCT AAG ATA ATC TTG AAT GGT
K T I L A E D M Y L A A K I I L N G

TAT AAA ATT GTT TAT AAT GCG GAG GCA AAA GTC TAT CAT TCC CAT AAC TAT TCT
Y K I V Y N A E A K V Y H S H N Y S

TTG ATT CAA GAG TTT CAG AGA TAT TTT GAT ACT GGA GTA TTC CAA AAA GAG CAA
L I Q E F Q R Y F D T G V F Q K E Q

TCT TGG ATT AGA AAA GAA TTT GGT GAA GCA AAT AAT GAG GGT AAA AAG TTT GTA
S W I R K E F G E A N N E G K K F V

TGT TCT GAG ATT AAG TAT TTA TTG AAG AAT AAT TTT TTA CTA TTG TCG AAA GCT
C S E I K Y L L K N N F L L L S K A

ATA TTT CAC ACT ATG TTT AAG TTT TTA GGG TTT AAA TTA GGT TTG AAT TAT GAG
I F H T M F K F L G F K L G L N Y F

AAA TTA CCT AGA TGG TTA TGT ATA AAA TTT AGT ATG CAT AAG AAC TAT TGG AAA
K L P R W L C I K F S M H K N Y W K

RBS

¹⁸⁵⁹
TAA ATC **ATG** AAA AGG CAG ATA TTA TCT AAA TAT ACG TTA GCT ATA AGT GAT TTT
* **M** K R Q I L S K Y T L A I S D F

ATT AGT TTT TCT CTA TCA TTT ATT CTA TCT TTA GTA TTA TTA AAT TAT TCA ATT
I S F S L S F I L S L V L L N Y S I

GAG AGG TTT GAT GCT TAT CTC CCA CTT GAT CAA GTT AGA GAA AGA ATG ATT ATC
E R F D A Y L P L D Q V R E R M I I

CAC TTA TCG TTA GGT TTT ATA GGT GTT ATA TGG TTT TGG ATT AGG CTT CGC CAC
H L S L G F I G V I W F W I R L R H

TAT ACT TAT CGT AAA CCC TTT TGG TTT GAA CTA AAA GAA GTG ATC AGA ACA CTT
Y T Y R K P F W F E L K E V I R T L

ATT ATT CTT GCT ATT ATT GAG CTA GCT ACT ATA GCC TTT TCA AAG CTT TAT TTT
I I L A I I E L A T I A F S K L Y F

TCT CGC TAT TTA TGG GGT TTA ACT TGG GGT GTT ACA TTC TTC TTT GTT CCT ATT
 S R Y L W G L T W G V T F F F V P I

GTT CGT ATT TTA ACT AAA AAA ATC TTA ATT GAT ACG GGA CTA TAT ATT AAG AAT
 V R I L T K K I L I D T G L Y I K N

ACA GTT ATT ATT GGT GGA GGG AAT AAT GCG ATT GAT GCC TAT AAA GCC TTA ACT
 T V I I G G G N N A I D A Y K A L T

AGT GAG TCT TAT TTA GGG TTA AAA GTA AAA TAT TTT ATT GCA TTA AAT CCT TCA
 S E S Y L G L K V K Y F I A L N P S

GAA AAA TTA AAG GAA TTG AGT ATC CCT ATA ATA AAT GAA GAG CGG AAA GGT ATC
 E K L K E L S I P I I N E E R K G I

TGG CAA TTA GTT ACA AAT AAA TCT GAT CAA TTT ATT ATT GCT TTA GAA GAA GAT
 W Q L V T N K S D Q F I I A L E E D

GAG ATA GAA GAA AGA GAT AAA TGG TTG AGA TTC TTT TCA AAA AAT TAT TAT CGT
 E I E E R D K W L R F F S K N Y Y R

TCA ATA TCC GTT ATT CCT ACA TTA AGA GGC TTA CCA CTA TAT AGT ACG GAT ATG
 S I S V I P T L R G L P L Y S T D M

TCT TTT CTA TTT AGT TAT GAA ATG ATT TTA TTA CGG GTA AAT AAT AAC TTA GCG
 S F L F S Y E M I L L R V N N N L A

AAA AGA TCA TCT CGT ATA TTA AAG AGA ATA ATG GAT ATT TTA GGT TCA TTA TTA
 K R S S R I L K R I M D I L G S L L

TTG ATA ATT TTA TTA TTA CCA TTA TTA ATC TTA ATA TAT TGG TTA GTT AGA AAA
 L I I L L L P L L I L I Y W L V R K

GAT GGA GGG TAT GCA ATT TAT GGA CAC CCT CGG ATT GGA CAA AAT GGT AAA AAG
 D G G Y A I Y G H P R I G Q N G K K

TTT AAC TGT TTA AAA TTT CGT TCA ATG GTG GTT AAT GCT GAT GAA GTA TTA GAA
 F N C L K F R S M V V N A D E V L E

AAG CTT TTA GAA AGT GAT CCG ATA GCA AAA GTA GAA TGG GAA AAG GAT TTT AAG
 K L L E S D P I A K V E W E K D F K

CTG AGA AAT GAT CCT CGA ATT ACC TCT ATG GTA AGT GGT ACG TCG TAC AAG TTG
 L R N D P R I T S M V S G T S Y K L

AAT GAG CTT CCT CAG CTT TTT AAC GTA TTA GCT GGA CAA ATG AGT CTT GTT GGT
 N E L P Q L F N V L A G Q M S L V G

CCT CGT CCA ATT ATT TCC GAT GAA TTG GAA TAT TAT CAG GAA GAT GTT GAT TAT
 P R P I I S D E L E Y Y Q E D V D Y

TAT TTA ATG GCA AAA CCA GGA ATG ACG GGG CTT TGG CAG GTT AGT GGA AGA AAT
 Y L M A K P G M T G L W Q V S G R N

AAT GTT GAT TAT AAG ACT CGA GTA TAT TTC GAT GCT TGG TAT GTA AAA AAC TGG
 N V D Y K T R V Y F D A W Y V K N W

TCT CTT TGG AAC GAT ATT GCT ATT TTA TTT AAA ACT ATC AAT GTA TTA AGG AGC
 S L W N D I A I L F K T I N V L R S

CGA GAA GGA GCT TAT ³²⁷²TAA TCCTATAGGGCTAGAGTAACTTACTATGCAATTTGCCCTTTACTTTA
R E G A Y *

TAAGCCGGCTGGGGTAAAATGTACTACCTTTTTTTAGTTCTATGTCGCCAAAATTGTGTGCGACTTTATTTA

AACATATATTTCTGAGGTGATGGCATA ATG CCA GTA ATT AAA GTT CGT GAA AAT GAA
M P V I K V R E N E

TCA TTT GAC GTT GCA TTA CGT CGT TTC AAA CGC TCT TGC GAA AAA GCA GGT TTA
S F D V A L R R F K R S C E K A G L

TTA GCA GAA GTT CGC GCT CGT GAA TT
L A E V R A R E

ANNEXE 3

Résumé de conférence

Caractérisation moléculaire de mutants isogéniques
d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* obtenus à l'aide
du transposon mini-Tn10

J. Labrie, S. Rioux, C. Galarneau et M. Jacques

Présentation orale lors du
68^e Congrès de l'ACFAS,
Université de Montréal, Montréal, 15 au 19 mai 2000.

Actinobacillus pleuropneumoniae est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine. Nous avons préalablement démontré que le lipopolysaccharide (LPS) est l'adhésine majeure de cette bactérie. Le but de la présente étude était d'isoler et de caractériser des mutants LPS de la souche de référence du sérotype 1, en utilisant la technique de mutagenèse par transposition à l'aide du mini-Tn10. Treize mutants LPS ont été identifiés parmi lesquels neuf ont démontré un phénotype rugueux, ne présentant pas de bandes de haut poids moléculaire sur SDS-PAGE et ne réagissant plus avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène-O d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Les quatre autres mutants, exprimant les LPS de haut poids moléculaire, ont démontré une différence au niveau de la région du noyau oligosaccharidique-lipide A lorsque visualisés par Tricine-SDS-PAGE. Le gène inactivé chez chacun des mutants a été identifié par séquençage des régions adjacentes au site d'insertion du mini-Tn10. Dans tous les cas, les gènes identifiés ont démontré une homologie avec des gènes impliqués dans la biosynthèse des LPS d'autres organismes Gram-négatifs. Nos données préliminaires suggèrent que les gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS chez *A. pleuropneumoniae* seraient distribués sur tout le chromosome comme c'est le cas chez *Haemophilus influenzae*, une bactérie apparentée. De plus, nous avons pu déterminer la séquence reconnue de façon préférentielle par le mini-Tn10 chez *A. pleuropneumoniae*.

ANNEXE 4

Résumé de conférence

Caractérisation moléculaire de mutants isogéniques
d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* obtenus à l'aide
du transposon mini-Tn10

J. Labrie, S. Rioux, C. Galarneau et M. Jacques

Affiche présentée lors du
1^{er} Colloque international de langue française en bactériologie vétérinaire,
Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, 17 au 19 mai 2000.

Actinobacillus pleuropneumoniae est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine. Nous avons préalablement démontré que le lipopolysaccharide (LPS) est l'adhésine majeure de cette bactérie. Nous avons généré des mutants LPS de la souche de référence du sérotype 1 en utilisant la technique de mutagenèse par transposition à l'aide du mini-Tn10 et évalué leur adhérence aux cellules des voies respiratoires de l'hôte. Plus de 2000 mutants ont été inoculés sur un milieu sélectif contenant de la novobiocine. Les mutants incapables de croître en présence de cet antibiotique hydrophobe ont ensuite été analysés par SDS-PAGE, Tricine SDS-PAGE et immunobuvardage. Sept différents mutants LPS ont été identifiés parmi lesquels certains ont démontré un phénotype rugueux, ne présentant pas de bandes de haut poids moléculaire sur SDS-PAGE et ne réagissant plus avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène-O d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Les autres mutants exprimaient les LPS de haut poids moléculaire mais ont démontré une différence au niveau de la région du noyau oligosaccharidique-lipide A lorsque visualisés par Tricine-SDS-PAGE. Une diminution de l'adhérence de ces mutants à des coupes congelées de trachées de porcelets a également pu être notée.

Le but de la présente étude était d'identifier le gène interrompu chez chacun de ces mutants par clonage et séquençage des régions adjacentes au site d'insertion du mini-Tn10. L'ADN génomique a d'abord été digéré avec l'enzyme de restriction *EcoRI*, puis une ligation avec le vecteur pBR325 préalablement digéré avec le même enzyme a été effectuée. Le produit de ligation a servi à transformer la souche *E. coli* XL1-Blue. Les cellules transformées ont été sélectionnées pour la résistance à la kanamycine portée par le transposon. Tous les gènes identifiés ont démontré une homologie avec des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O (*rfbF*, *rfbN*, *rfbP*, *rfbU*) ou du noyau oligosaccharidique (*waaB*, *lbgB*, *galU*) des LPS d'autres organismes à Gram négatif. Nos données préliminaires suggèrent que les gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS chez *A. pleuropneumoniae* seraient distribués sur tout le chromosome comme c'est le cas chez *Haemophilus influenzae*, une bactérie apparentée. De plus, nous avons pu déterminer la séquence reconnue de façon préférentielle par le mini-Tn10 chez *A. pleuropneumoniae*. Nous sommes présentement à déterminer la distribution de ces différents gènes de biosynthèse des LPS parmi les 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* par PCR et hybridation.

ANNEXE 5

Résumé de conférence

Molecular characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide mutants

J. Labrie, S. Rioux, C. Galarneau et M. Jacques

Affiche présentée lors de la
50^{ème} Réunion annuelle de la Société Canadienne des Microbiologistes,
University of Manitoba, Winnipeg, 11 au 14 juin 2000

et

6th Conference of the International Endotoxin Society,
Institut Pasteur, Paris, 24 au 27 août 2000.

Actinobacillus pleuropneumoniae (*App*) is an important pathogen of swine. We previously reported that lipopolysaccharide (LPS) is involved in adherence of *App* to host respiratory tract cells. We generated LPS mutants of *App* serotype 1 by using a mini-Tn10 transposon mutagenesis system. The purpose of the present study was to identify the gene affected by mini-Tn10 in each of these mutants by cloning and sequencing. The genes identified in mutants with a rough (O⁻) LPS profile coded for glycosyl transferases and showed homology with genes (*rfbF*, *rfbN*, *rfbP*, *rfbU*) involved in LPS O-antigen biosynthesis of other Gram-negative bacteria. The genes identified in LPS core mutants showing a faster electrophoretic mobility on Tricine-SDS-PAGE gels had homology with genes (*waaB*, *lbgB*, *galU*) involved in LPS core or lipopolysaccharide (LOS) biosynthesis of other Gram-negative bacteria. Interestingly, the *App* *lbgB* and *galU* LPS core mutants adhered significantly less to host cells than the parent strain in an *in vitro* adherence assay. Our data indicate that an intact core-lipid A region is required for adherence of *App* to porcine respiratory tract cells. Use of isogenic LPS mutants combined with structural analysis will allow the identification of the core residues involved in binding to receptors on host cells.