

Université de Montréal

Étude du rôle du noyau oligosaccharidique des
lipopolysaccharides dans la pathogénie d'*Actinobacillus*
pleuropneumoniae à l'aide de mutants isogéniques

par

Catherine Galarneau

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

Avril, 1999

©Catherine Galarneau, 1999



E. F. H. H. H.

SF
607
U54
1999
V.O. B

Université de Montréal

Étude du rôle du système olfactif dans la perception des
propriétés olfactives dans la perception des
propriétés olfactives à l'aide de stimuli olfactifs

par
Christophe Gagnon

Département de psychologie et neurobiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître en science (M.Sc.)
en psychologie
Étude des propriétés



1999

Christophe Gagnon, 1999

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Étude du rôle du noyau oligosaccharidique des
lipopolysaccharides dans la pathogénie d'*Actinobacillus*
pleuropneumoniae à l'aide de mutants isogéniques

présenté par:

Catherine Galarneau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

-Dr Khyali R. Mittal, professeur titulaire, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal (président rapporteur);

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

-Dr Léo G. Mathieu, professeur titulaire, Département de microbiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal (membre du jury).

Mémoire accepté le:99.05.27.....

SOMMAIRE

Actinobacillus pleuropneumoniae est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine, une maladie fortement répandue dans le monde et causant de graves pertes économiques aux producteurs. Notre laboratoire a préalablement démontré que le lipopolysaccharide (LPS) est l'adhésine majeure de cette bactérie. De récents travaux suggèrent que le noyau oligosaccharidique serait la partie de cette molécule complexe impliquée dans l'adhérence.

L'objectif de ce travail consistait à obtenir des mutants au niveau du noyau oligosaccharidique pour ensuite évaluer leur niveau d'adhérence aux cellules du tractus respiratoire porcin et ainsi confirmer le rôle possible du noyau oligosaccharidique lors de l'adhérence. Suite à la mutagenèse à l'aide du transposon mini-Tn10, nous avons obtenu cinq souches semblant présenter une modification au niveau du noyau oligosaccharidique lorsque visualisées sur gel tricine. Ces souches ont été caractérisées par immunobuvardage et par cytométrie en flux pour la production de l'antigène-O et de la capsule. Trois mutants (CG1, CG3 et CG5) démontrant une augmentation de la mobilité électrophorétique du noyau oligosaccharidique sur gel tricine, possédaient toujours l'antigène-O et la capsule polysaccharidique. Par contre, deux souches (CG2 et CG4) n'ayant qu'une faible différence au niveau du noyau en comparaison avec la souche mère quant à leur mobilité sur gel tricine, ont démontré la perte de l'antigène-O quoiqu'étant toujours encapsulées. En somme, les tests de caractérisation phénotypique ont suggéré que nous avons obtenu trois mutants au niveau du noyau oligosaccharidique (CG1, CG3 et CG5) et deux mutants rugueux (CG2 et CG4).

Les mutants CG1, CG3 et CG5 ont été caractérisés au niveau de leur ADN pour identifier le gène dans lequel s'était inséré le mini-Tn10. Pour les souches CG3 et CG5, le mini-Tn10 se situait à l'intérieur d'un gène homologue au gène *lbgB* d'*Haemophilus ducreyi* responsable de l'addition d'un heptose au noyau oligosaccharidique; l'analyse génétique du mutant CG1, quant à elle, a permis d'identifier un gène ayant une homologie avec les gènes *wlaC* et *wlaE* de *Campylobacter jejuni* et avec le gène *waaB* de *Salmonella typhimurium*, tous les trois étant des galactosyltransférases au niveau du noyau externe. De plus, l'adhérence aux cellules de trachée de porcelet a été évaluée pour ces trois mutants, cependant seuls CG3 et CG5 ont démontré une baisse significative en comparaison avec la souche mère.

En parallèle, des études d'adhérence et de génétique ont été effectuées sur les deux mutants rugueux. Le mutant CG2 présentait une adhérence semblable à celle de la souche mère et la mutation se situait à l'intérieur d'un cadre de lecture codant pour une protéine de plus de 300 acides aminés, mais n'ayant aucune homologie avec les gènes connus impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O ou du noyau oligosaccharidique. Par contre, le mutant CG4 démontrait une baisse significative de son adhérence, en plus d'être muté dans un gène homologue au gène *rfbP* de *Salmonella* et *H. influenzae*, gène impliqué dans la synthèse de l'antigène-O. Bien que ce dernier résultat contredise certains autres obtenus précédemment, l'ensemble de notre étude confirme que le noyau oligosaccharidique semble impliqué dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules de l'hôte. De plus, la perte d'un heptose au niveau du noyau oligosaccharidique diminue significativement l'adhérence, sans toutefois l'abolir complètement.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
DÉDICACE	xiii
REMERCIEMENTS	xiv
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	4
1. Généralités	5
1.1. Famille des <i>Pasteurellaceae</i>	5
1.2. Identification d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	5
2. La pleuropneumonie porcine	6
2.1. Pathogénie et signes cliniques.....	7
2.2. Lésions.....	8
2.3. Diagnostic.....	9
2.4. Traitement.....	9
2.5. Prévention.....	9
3. Facteurs de virulence.....	11
3.1. Polysaccharides capsulaires.....	11
3.2. Exotoxines.....	12
3.3. Lipopolysaccharides.....	13
3.3.1. Structure des lipopolysaccharides.....	14

3.3.2. Fonctions des lipopolysaccharides	17
3.3.3. Génétique des lipopolysaccharides	19
3.3.3.1. Le lipide A	19
3.3.3.2. Le noyau oligosaccharidique.....	21
3.3.3.3. L'antigène-O	28
3.4. Protéines de la membrane externe	29
3.5. Autres facteurs de virulence.....	29
4. Mutants d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	30
4.1. Mutants au niveau des toxines RTX.....	30
4.2. Mutants sensibles à la température	31
4.3. Mutants au niveau de l'uréase et mutants auxotrophes	31
4.4. Mutants au niveau de la capsule	32
4.5. Mutants au niveau des lipopolysaccharides	32
 III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS.....	 34
 Article 1:	
Galarneau, C., S. Rioux et M. Jacques. 1999. Core oligosaccharide mutants of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 1 obtained by mini-Tn10 mutagenesis. (Soumis pour publication)	
 IV. DISCUSSION.....	 67
 V. CONCLUSION.....	 77
 VI. BIBLIOGRAPHIE.....	 79
 VII. ANNEXES	 xv

LISTE DES TABLEAUX

Revue de la littérature

Tableau I. Gènes de l'opéron *waa* impliqués dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique d'*Escherichia coli* (K-12, R1-R4) et *Salmonella typhimurium* (ST); ancienne et nouvelle nomenclature (Selon Heinrichs et coll.⁴⁵)..... 24

Tableau II. Gènes impliqués dans la biosynthèse du LOS d'*H. influenzae* et homologie de fonctions avec différentes espèces bactérienne. Selon les travaux de Hood et coll.⁵⁰..... 27

Article 1

Table 1. Predicted *A. pleuropneumoniae* gene products presented in this study and similar proteins in the non-redundant sequence databases 53

Annexe 1

Tableau I. Adhérence aux cellules de trachée de porcelet et résistance au sérum normal de porc d'*A. pleuropneumoniae* 4074 Nal^r et des mutants CG2 et CG4..... xxii

LISTE DES FIGURES

Revue de la littérature

Figure 1. Schéma de la structure moléculaire du lipopolysaccharide chez *Escherichia coli* K-12. Les groupements R indiquent des substitutions partielles proposées: R1, phosphate; R2, KDO, rhamnose ou phospho-éthanolamine; R3, phosphate ou éthanolamine pyrophosphate; R4, phosphate; R5, heptose; R6, heptose ou GlcNAC. Modifiée selon Raetz¹⁰⁵..... 15

Figure 2. Organisation et fonction des gènes formant l'opéron *waa* d'*E. coli* K-12. Les flèches indiquent le sens de la transcription des gènes. Le dessin n'est pas à l'échelle. Modifiée selon Heinrichs et coll.⁴⁵ 23

Figure 3. Schéma de la structure du lipo-oligosaccharide d'*H. influenzae*. Selon Hood et coll.⁵⁰ 26

Article 1

Figure 1. Silver-stained Tricine SDS-PAGE profiles of whole-cell proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain and isogenic core OS mutants. Lane 1, parent strain 4074 Na1F; lane 2, mutant CG1; lane 3, mutant CG3; lane 4, mutant CG5. For comparison, LPS from *S. typhimurium* SL1181 (Re mutant) and *S. typhimurium* TV119 (Ra mutant) are shown. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.... 54

Figure 2. Immunoblot of whole-cell proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain and isogenic core OS mutants.

The immunoblot was probed with monoclonal antibody 5.1 G8 F10 against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. Lane 1, parent strain 4074 NaI^r; lane 2, mutant CG1; lane 3, mutant CG3; lane 4, mutant CG5. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left..... 55

Figure 3. Immunoblot of whole-cell proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain and isogenic core OS mutants. The immunoblot was probed with a serum from a pig experimentally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1. Lane 1, parent strain 4074 NaI^r; lane 2, mutant CG1; lane 3, mutant CG3; lane 4, mutant CG5. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Only the region of interest is shown..... 56

Figure 4. Immunoblot of whole-cell proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain and isogenic core OS mutants. The immunoblot was probed with a monoclonal antibody 1.5 C5 F4 against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 capsule. Lane 1, parent strain 4074 NaI^r; lane 2, mutant CG1; lane 3, mutant CG3; lane 4, mutant CG5. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left..... 57

Figure 5. Random insertion of the mini-Tn10 element in *A. pleuropneumoniae* core OS mutants as determined by Southern blot analysis. Lane 1, plasmid pLOF/Km; lane 2, parent strain 4074 NaI^r; lane 3, mutant CG1; lane 4, mutant CG3; lane 5, mutant CG5. Molecular size standards (in kilobases) are indicated on the left..... 58

Figure 6. Comparison of the deduced amino acid sequences of the LbgB proteins from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (this study) and *H. ducreyi*¹²²

by using the Clustal alignment program in GeneWorks. Identical residues are boxed. The mini-Tn10 insertions are indicated with arrowheads for mutant CG3 and mutant CG5 59

Discussion

Figure 1. Organisation des gènes identifiés dans le segment de restriction *EcoRI* et position de l'insertion du mini-Tn10 pour les mutants CG1, CG3 et CG5..... 74

Figure 2. Organisation du deuxième fragment *EcoRI*, indiquant les gènes identifiés et la position du mini-Tn10 pour le mutant CG4..... 75

Annexe 1

Figure 1. Gel tricine-SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent de préparations de bactéries entières traitées à la protéinase K d'*A. pleuropneumoniae* et des mutants isogéniques. Puits 1, souche mère 4074 Nal^r; puits 2, mutant CG1; puits 3, mutant CG2*; puits 4, mutants CG3; puits 5, mutants CG4*; puits 6, mutant CG5. Les mutants Ra et Re de *Salmonella typhimurium* servent de comparaison. Les standards de poids moléculaires (kilodaltons) sont indiqués sur la gauche..... xvii

Figure 2. Immunobuvardage de préparations de bactéries entières traitées à la protéinase K d'*A. pleuropneumoniae* et des mutants isogéniques. La membrane a été révélée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène-O d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Puits 1, souche mère 4074 Nal^r; puits 2, mutant CG1; puits 3, mutant CG2*; puits 4, mutants CG3; puits 5,

mutants CG4*; puits 6, mutant CG5. Les standards de poids moléculaires (kilodaltons) sont indiqués sur la gauche..... xviii

Figure 3. Immunobuvardage de préparations de bactéries entières traitées à la protéinase K d'*A. pleuropneumoniae* et des mutants isogéniques. La membrane a été révélée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope de la capsule d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Puits 1, souche mère 4074 Nal^r; puits 2, mutant CG1; puits 3, mutant CG2*; puits 4, mutants CG3; puits 5, mutants CG4*; puits 6, mutant CG5. Les standards de poids moléculaires (kilodaltons) sont indiqués sur la gauche.....xix

Figure 4. Insertion du mini-Tn10 déterminée par Southern blot révélé à l'aide d'une sonde spécifique pour le mini-Tn10. Puits 1, pLOF/Km; puits 2, souche mère 4074 Nal^r; puits 3, mutant CG1; puits 4, mutant CG2*; puits 5, mutants CG3; puits 6, mutants CG4*; puits 7, mutant CG5. Les marqueurs de taille moléculaire (kilobases) sont indiqués sur la gauche.....xx

Figure 5. Analyse de cytométrie en flux d'*A. pleuropneumoniae* serotype 1 4074 Nal^r (A-B) et du mutant CG2 (C-D). Les cellules ont été marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène-O (A, C) ou contre la capsule (B, D) et avec un anticorps anti-IgG de souris conjugué au FITC. La courbe en ligne pleine représente les cellules incubés avec le conjugué seulement. Les résultats sont identiques pour le mutant CG4.....xxi

LISTES DES ABRÉVIATIONS

Ac:	acétate
ACP:	transporteur protéique acylé (acyl carrier protein)
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADP:	adénosine diphosphate
Ap_x:	toxines RTX d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
ATP:	adénosine triphosphate
CMP:	cytidine monophosphate
dTDP:	désoxythymidine diphosphate
Gal:	galactose
Galf:	galactofuranose
GalNAc:	N-acétylgalactosamine
Glc:	glucose
GlcN:	D-glucosamine
GlcNAc:	N-acétyl-D-glucosamine
Hep:	heptose
IL:	interleukine
kb:	kilobase
kDa:	kilodalton
KDO:	acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique
LOS:	lipo-oligosaccharide
LPS:	lipopolysaccharide
NAD:	nicotinamide adénine dinucléotide
OMP:	protéines de la membrane externe (outer membrane proteins)
ORF:	cadre de lecture ouvert (open reading frame)
pb:	paires de bases (acides nucléiques)
Rha:	rhamnose

- RTX:** toxines ayant des répétitions dans le domaine structural (repeats in the structural toxin)
- TNF:** facteur nécrosant tumoral (tumor necrosis factor)
- UDP:** uridine diphosphate
- UMP:** uridine monophosphate
- Und-P:** undécaprénil-phosphate

À Mme Régnier, professeure de troisième secondaire,
pour m'avoir fait découvrir la biologie

À mon filleul, Georges

REMERCIEMENTS

Je tiens sincèrement à remercier tous ceux et celles qui m'ont aidée dans l'avancement de mon projet, que ce soit par des conseils théoriques ou techniques, ou simplement par leurs encouragements qui furent très appréciés. Ma reconnaissance est plus grande encore pour les personnes suivantes:

- 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 qu'il m'a faite, ainsi que pour ses précieux conseils 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 et pour avoir participé à mon comité conseil;
- Dr Jean Sirois, professeur agrégé, Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal pour avoir participé à mon comité conseil;
- le Fond pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) 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 énormes à l'industrie porcine. L'initiation de la pathogénie par cette bactérie, comme toutes celles infectant les voies respiratoires, nécessite son adhérence aux cellules du tractus respiratoire²². Les lipopolysaccharides (LPS) ont été identifiés par notre laboratoire comme étant l'adhésine majeur d'*A. pleuropneumoniae*⁵⁷. Paradis et coll.⁹⁵ ont déterminé que la partie polysaccharidique du LPS est directement responsable de l'adhérence aux cellules du tractus respiratoire, contrairement au lipide A. De plus, les LPS pourraient jouer un rôle important dans l'acquisition du fer chez *A. pleuropneumoniae*, puisqu'ils peuvent lier l'hémoglobine porcine^{4, 6}.

La génétique d'*A. pleuropneumoniae* est encore très peu connue. Quelques gènes ont été identifiés, comme ceux codant pour les toxines Apx^{30, 31, 60, 61}, la biosynthèse et l'exportation de la capsule^{133, 134} ou encore les gènes pour la production d'uréase¹⁵; beaucoup d'autres gènes dont ceux requis pour la biosynthèse des LPS ne sont toujours pas connus. Par contre, pour se guider dans le dédale que représente la génétique des LPS, des travaux fort avancés ont été réalisés chez *E. coli* et *Salmonella*^{73, 105}, et plus récemment chez *Haemophilus influenzae*⁵⁰. Notre équipe est la première à avoir produit des mutants au niveau de la biosynthèse du LPS chez *A. pleuropneumoniae*. Ces premiers mutants rugueux nous ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'action des LPS dans la pathogénie d'*A. pleuropneumoniae*, tout en nous orientant vers la portion oligosaccharidique qui serait directement impliquée dans l'adhérence. L'obtention d'un plus grand nombre de mutants LPS, particulièrement au niveau du noyau oligosaccharidique du LPS, permettra de clarifier ce mécanisme.

Le présent projet a pour buts: 1) d'obtenir des mutants d'*A. pleuropneumoniae* au niveau de la biosynthèse du noyau oligosaccharidique des LPS; 2) de déterminer leur adhérence aux cellules du tractus respiratoire porcin et 3) d'identifier certains gènes impliqués dans la biosynthèse de la partie oligosaccharidique des LPS.

II. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Généralités

1.1. Famille des *Pasteurellaceae*

Actinobacillus pleuropneumoniae est classé dans la famille des *Pasteurellaceae*. Cette famille est constituée de trois genres, soit *Actinobacillus*, *Haemophilus* et *Pasteurella*. Tous sont pathogènes pour une grande variété d'animaux, y compris l'homme, et causent diverses maladies caractéristiques, par exemple *A. pleuropneumoniae* cause la pleuropneumonie chez le porc. La pathogénie de ces micro-organismes est reliée à divers facteurs de virulence. Parmi ceux-ci, certains sont impliqués dans la colonisation des muqueuses, l'invasion des tissus, la survie et la multiplication dans l'hôte, l'interférence avec les défenses de l'hôte et l'apparition de lésions. Pour coloniser les muqueuses et y créer des lésions, les bactéries de la famille *Pasteurellaceae* possèdent des facteurs d'adhérence, des polysaccharides capsulaires, des protéines de surface [outer membrane proteins (OMP)], des lipopolysaccharides (LPS) et des exotoxines⁸⁶.

1.2. Identification d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

A. pleuropneumoniae est un coccobacille pléiomorphe encapsulé, non-motile, anaérobie facultatif et non-sporulant. Certaines souches peuvent aussi exprimer des fimbriae⁴⁸. Cette bactérie Gram-négatif fermente le mannitol, le ribose, le xylose et à différents degrés, le lactose. De plus, elle produit une uréase et une hémolysine causant une hémolyse β sur gélose sang⁸⁵. *A. pleuropneumoniae* se divise en deux biotypes selon la dépendance au NAD comme facteur de croissance. Le biotype 1 nécessite obligatoirement la présence du NAD dans le milieu de culture, tandis que le biotype 2 est NAD-indépendant, mais nécessite certains précurseurs du NAD⁹³.

La capsule polysaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* est composée d'antigènes spécifiques⁵² qui permettent de distinguer 12 sérotypes à l'intérieur du biotype 1. Les sérotypes 1 à 5 ont été identifiés par Kilian et coll.⁶⁹ ; deux de ces sérotypes ont été subdivisés, le sérotype 5 a été subdivisé en 5a et 5b par Nielsen⁹¹, tandis que le sérotype 1 a été subdivisé en 1a et 1b par Jolie et coll.⁶⁴. Par la suite, les sérotypes 6 et 7¹¹⁶, 8⁹², 9⁸⁸, 10⁸⁹, 11⁶⁷ et 12⁹⁰ ont été proposés. Quelques sérotypes montrent une similarité au niveau de l'antigène-O de leurs 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^{87, 99}.

A. pleuropneumoniae a longtemps été classifié parmi le genre *Haemophilus* de la famille des *Pasteurellaceae*. Cependant, des tests d'hybridation ADN-*H. influenzae* - ADN-*H. pleuropneumoniae* n'ont pas démontré une homologie significative pour classer *H. pleuropneumoniae* dans le genre *Haemophilus*. Par contre, les tests d'hybridation entre l'ADN d'*Actinobacillus lignieresii* et *H. pleuropneumoniae* ont démontré une grande homologie^{14, 101}. Le changement de genre a donc été proposé par Pohl et coll. en 1983¹⁰¹.

2. La pleuropneumonie porcine

A. pleuropneumoniae est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine⁸⁷. Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1954 par Pattison et coll.⁹⁷ aux États-Unis. Depuis, plusieurs rapports ont été publiés sur cette maladie aux États-Unis⁸⁷, en Angleterre⁷⁵ et en Argentine¹²¹. Actuellement, cette maladie affecte les porcs de tous les pays du monde et cause de grandes pertes économiques pour les producteurs. Cette espèce bactérienne existe de façon épidémique dans les pays dont l'industrialisation

de la production porcine est fortement développée. Aucun cas de pleuropneumonie n'a été rapporté chez d'autres animaux que le porc⁸⁵. Les 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* se retrouvent distribués dans les différentes régions du monde avec chacun sa prédominance; par exemple le sérotype 2 est prévalent en Europe⁸⁷, tandis que les sérotypes 1, 5 et 7 sont les plus souvent retrouvés aux États-Unis et au Canada⁸⁰.

2.1. Pathogénie et signes cliniques

La pleuropneumonie se présente sous trois phases: suraiguë, aiguë et chronique. La phase suraiguë est caractérisée par une forte augmentation de la température, un manque d'énergie, de l'anorexie et par une courte période de diarrhée et de vomissement. L'augmentation du pouls est notable, accompagnée de problèmes cardiaques et circulatoires, la respiration se fait plus difficilement (dyspnée) et très faiblement, après un certain temps la peau devient bleue par manque d'oxygène. Peu avant la mort, il peut y avoir des écoulements de sang par le nez et la bouche. La mort survient entre 24 et 36 heures après l'apparition des symptômes. Dans certains cas, la mort peut arriver sans symptôme prémonitoire⁸⁷. La phase aiguë est aussi caractérisée par une température élevée. Les animaux montrent des signes de dépression et d'anorexie. Des problèmes respiratoires (toux, dyspnée, respiration par la bouche), cardiaques et circulatoires font ensuite leur apparition¹³⁸. La suite des événements dépend des lésions affectant les poumons et de la rapidité du début de la thérapie. Ces deux premières phases peuvent ressembler au choc septique chez l'homme. Lors de la phase chronique, il y a disparition des signes aigus, baisse de la fièvre et toux intermittente. Par contre, la baisse de l'appétit persiste et le taux de gain de poids diminue. En phase chronique, des maladies subcliniques et d'autres infections respiratoires (à mycoplasmes, bactériennes ou virales) peuvent augmenter les signes déjà présents de la

pleuropneumonie⁸⁷. Certaines complications aggravent parfois l'état de santé des animaux. Parmi celles-ci on retrouve l'arthrite, l'endocardite et les abcès, ces complications seraient principalement dues au sérotype 3 d'*A. pleuropneumoniae*⁸⁷. Les signes cliniques sont modulés selon la gravité de l'infection, le degré d'exposition à la bactérie et l'état immunitaire de l'animal. L'infection par *A. pleuropneumoniae* provoque une réponse immunitaire importante: production d'anticorps, infiltration de neutrophiles et de macrophages⁸⁷.

2.2. Lésions

A. pleuropneumoniae cause principalement des lésions au niveau pulmonaire. Au début de la maladie, les changements histopathologiques sont caractéristiques: nécrose, hémorragie, infiltration de neutrophiles et de macrophages, activation de plaquettes sanguines, thrombose vasculaire et œdème^{11-13, 72}. La pneumonie s'étend aux deux poumons et implique généralement les lobes cardiaques et apicaux, ainsi qu'une partie des lobes diaphragmatiques. Les zones infectées présentent des parties foncées et solides. La plèvre est atteinte d'une pleurésie fibreuse et dans quelques régions, d'une pleurésie adhésive. Du liquide contenant du sang s'accumule dans la cage thoracique, tandis que les bronches et la trachée se remplissent de mucus sanguin dans les cas fatals. Lors de la phase chronique, des nodules de différentes tailles, recouverts d'une capsule de tissus conjonctif, se forment sur les lobes, principalement sur les lobes diaphragmatiques. Dans plusieurs cas de guérison, les lésions pulmonaires se résorbent, mais un site de pleurésie adhésive persiste⁸⁷.

2.3. Diagnostic

La pleuropneumonie peut être suspectée par les signes cliniques mentionnées précédemment. Dans les cas de mortalité, l'autopsie permet de confirmer le diagnostic. De plus, un porc infecté peut être diagnostiqué avec des tests sérologiques tels le test de fixation du complément et l'ELISA^{26, 104}. L'agent étiologique est facilement isolé sur gélose sang (avec une strie de *Staphylococcus epidermidis* ou *S. aureus* pour fournir le NAD nécessaire à la croissance) à partir d'exsudats bronchiques ou nasaux et des lésions pulmonaires. La détection des antigènes spécifiques à un sérotype se fait avec un test de coagglutination^{81, 82} ou par des anticorps fluorescents⁸⁷. Une nouvelle technique d'isolation d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 à partir des amygdales d'animaux porteurs vient d'être mise au point par Gagné et coll.³⁷. Cette technique utilise des billes de polystyrène recouvertes d'IgG de lapin spécifiques pour *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et possède une sensibilité 1000 fois supérieure à la culture directe³⁷.

2.4. Traitement

L'infection peut être combattue à l'aide d'antibiotiques, tels les pénicillines, les tétracyclines et les sulfamides²⁶. Cependant, depuis quelques années il a été démontré qu'*A. pleuropneumoniae* peut développer une résistance à divers antibiotiques dont la tétracycline et l'érythromycine¹³⁵. De plus, suite à une guérison, un animal peut rester porteur de l'agent infectieux et contaminer les autres animaux.

2.5. Prévention

Dans un troupeau infecté, l'éradication de l'agent infectieux est très difficile, malgré l'apparente santé des animaux (porteurs sains). Par mesure de prévention, il est recommandé d'acheter des animaux en santé venant de

troupeaux contrôlés et d'avoir un système de production avec des petites unités séparées pour réduire les risques d'infection. De plus, un séjour en quarantaine et des tests sérologiques sont suggérés pour les nouveaux animaux provenant d'autres fermes⁸⁷.

La prévention par vaccination peut être utilisée, mais les vaccins ne protègent pas à 100% l'animal immunisé, puisque ces derniers sont généralement fabriqués à partir d'un sérotype spécifique d'*A. pleuropneumoniae* et qu'il n'y a pas d'immunité croisée contre tous les sérotypes⁴⁷. Plusieurs chercheurs ont tenté de produire des vaccins qui induiraient une immunité efficace contre tous les sérotypes. Parmi ceux-ci, citons Inzana et coll.⁵⁵ qui ont testé une souche vivante d'un mutant acapsulé. Ce vaccin a démontré une protection contre les sérotypes homologues et hétérologues, par contre le taux de révertants était trop important pour permettre sa commercialisation. Haga et coll.⁴² ont testé les exotoxines ApxI et ApxII comme vaccin. L'immunisation a montré une augmentation du niveau d'anticorps et une bonne protection, par contre celle-ci n'est efficace que pour les souches homologues. Rioux et coll.¹¹³ ont évalué l'efficacité des lipopolysaccharides d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 conjugué à l'albumine bovine sérique. Suite à une infection par voie intranasale avec *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ou sérotype 5, ils ont pu constater une diminution de la mortalité chez les souris infectées avec le sérotype 1, mais la protection induite par le conjugué était spécifique au sérotype 1 et les souris infectées avec le sérotype 5 n'ont pas été protégées. De plus, suite à des tests chez le porc, ils ont pu observer une protection égale à une bactérine commerciale en utilisant uniquement le LPS détoxiqué lors de l'immunisation¹¹⁴. La mise au point d'un vaccin efficace est donc encore un domaine important de recherche.

3. Facteurs de virulence

3.1. Polysaccharides capsulaires

La spécificité des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* est déterminée par les polysaccharides capsulaires⁵² à l'aide de diverses techniques telles l'agglutination et la coagglutination⁸³. Ces derniers sont formés d'unités répétées d'oligosaccharides chargés négativement dû aux acides carboxyliques ou aux phosphates⁹⁹. La composition exacte en sucres de la capsule de tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* a été déterminée par l'équipe de Perry en 1990⁹⁹. L'épaisseur de la capsule se situe entre 80 et 230 nm selon le sérotype et varie selon l'isolat et l'âge de la culture⁵⁸. Jacques et coll.⁵⁸ ont suggéré que la différence dans la quantité de polysaccharides capsulaires jouerait un rôle dans la variation de la virulence entre les sérotypes. Les bactéries provenant d'isolats de pleuropneumonie présentent une capsule ne différant pas de la capsule retrouvée chez les bactéries ayant poussées *in vitro*^{58, 63}. De même, la croissance en conditions restreintes de fer, représentant le milieu de croissance *in vivo*, n'affecte pas la production de la capsule⁹⁴.

Le matériel capsulaire purifié n'a aucune activité biologique^{27, 28}, par contre il a été démontré que la capsule est essentielle pour la virulence d'*A. pleuropneumoniae in vivo*. La capsule possède des propriétés anti-phagocytaires et est considérée comme étant la barrière de défense principale de la bactérie contre les mécanismes de défenses humoraux de l'hôte^{51, 118}. Les souches mutantes d'*A. pleuropneumoniae* n'ayant plus de capsule sont sensibles au sérum de porc, tandis que les souches capsulées résistent à l'attaque du complément retrouvé dans le sérum^{51, 132, 134}. Le mécanisme de résistance a partiellement été élucidé; il a été démontré que la capsule n'empêche pas la cascade du complément de s'activer^{129, 132} ou l'attachement

de l'élément C3 de se fixer à la bactérie, mais limite la quantité d'anticorps et de C9 qui se dépose à la surface bactérienne¹³². Depuis peu, cette affirmation a été remise question. Rioux et coll. (communication personnelle) ont obtenu un mutant capsule d'*A. pleuropneumoniae* serotype 1 n'étant pas sensible au sérum normal de porc.

Ward et Inzana¹³³ ont déterminé avec le sérotype 5a d'*A. pleuropneumoniae* que les gènes codant l'exportation de la capsule sont regroupés en un opéron nommé *cpx* et sont au nombre de 4 soit *A*, *B*, *C* et *D*. L'étude de l'ADN en amont de cet opéron a démontré la présence de quatre gènes spécifiques pour la biosynthèse de la capsule: *cps5A*, *5B*, *5C* et *5D*¹³⁴. L'étude approfondie des gènes impliqués dans l'exportation et la biosynthèse de la capsule a permis de confirmer le rôle de la capsule dans la résistance au sérum déterminé par cette même équipe¹³⁴.

3.2. Exotoxines

A. pleuropneumoniae sécrète des toxines thermolabiles du groupe des toxines RTX ("repeats in the structural toxin"¹³⁶) de la famille des "pore forming toxins"³¹. Ces toxines sont retrouvées chez les bactéries Gram-négatif et partagent toutes des propriétés structurales et fonctionnelles communes. Les toxines RTX possèdent des unités répétées riches en glycine, un mode particulier de sécrétion avec une séquence signal en C-terminal, une activation post-transcriptionnelle et une toxicité envers les cellules via la formation de pores dans les membranes lipidiques¹²⁶. Cependant, les toxines diffèrent selon leur spécificité cellulaire et leur activité toxique en fonction de la bactérie productrice¹⁹. Les toxines RTX sont codées par un opéron de quatre gènes: *C*, *A*, *B* et *D*. Le premier gène (*C*) code pour un produit qui dirige la conversion (acylation) dans le cytoplasme de la forme inactive de la toxine (produit du

gène *A*) en sa forme active⁵⁶. Cette dernière est par la suite sécrétée à l'aide du produit des gènes *B* et *D*, gènes transporteurs¹³⁶.

Les toxines RTX d'*A. pleuropneumoniae*, nommées APX (*Actinobacillus pleuropneumoniae* toxine), comprennent des hémolysines et des cytolytines³¹. Trois types d'ApX ont été clairement identifiés et bien analysés²⁹; une quatrième toxine vient d'être découverte récemment³², mais sa fonctionnalité n'a pas encore été élucidée. Les 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (à l'exception des sérotypes 7, 10 et 12) produisent deux ApX et portent une partie de l'opéron *apxI* ou *apxII* n'ayant que deux gènes³⁰, les gènes *B* et *D* ou les gènes *A* et *C* respectivement. ApX I a une forte activité hémolytique³⁴ et est fortement cytotoxique pour les macrophages alvéolaires et les neutrophiles⁶⁶. On retrouve cette toxine chez les sérotypes 1, 5, 9, 10 et 11. Les sérotypes exprimant l'ApX I sont généralement associés aux pleuropneumonies ayant un haut taux de mortalité^{31, 70}. ApX II, présente chez tous les sérotypes à l'exception du sérotype 10, est faiblement hémolytique et peu cytotoxique⁶⁶. Finalement, ApX III est fortement cytotoxique et non hémolytique. Elle se retrouve chez les sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8.

3.3. Lipopolysaccharides

Les LPS sont des molécules complexes faisant partie de la membrane externe des bactéries Gram-négatif. Les LPS participent à la pathogénie de ces bactéries, en provoquant une réponse inflammatoire chez l'hôte et en activant la cascade du complément. Il est possible de retrouver des LPS dans le milieu extracellulaire suite à la lyse cellulaire, mais généralement les LPS sont ancrés dans la membrane.

3.3.1. Structure des LPS

Les LPS sont constitués de 3 parties distinctes: l'antigène-O, le noyau oligosaccharidique et le lipide A (Figure 1, p. 15). Les deux premières forment la partie polysaccharidique à laquelle est rattachée la propriété antigénique, tandis que le lipide A constitue la partie lipidique, toxique et immuno-modulatrice⁵⁷. La structure du LPS d'*A. pleuropneumoniae* n'est connue que pour l'antigène-O⁹⁹, celle du noyau oligosaccharidique est sur le point d'être identifiée par l'équipe du Dr Perry à Ottawa. Pour l'instant les données sur le noyau oligosaccharidique d'*E. coli*, de *Salmonella* et de quelques autres bactéries peuvent nous orienter en supposant qu'il y ait une similarité entre les espèces.

Le lipide A est la région hydrophobe d'ancrage à la membrane lipidique. Il est constitué d'un dimère phosphorylé de glucosamine (GlcN) avec 6 (en majorité) ou 7 acides gras saturés et des groupes phosphates¹¹¹. Le lipide A présente une grande stabilité entre les espèces. À la position 6 d'un GlcN du lipide A se trouve attaché le premier sucre constituant le noyau oligosaccharidique. Ce dernier est constitué d'une courte chaîne de sucres, dont deux sucres inhabituels, présents dans le noyau interne, soit un heptose et un octose [l'acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique (KDO)]. Le KDO est un sucre unique toujours présent dans les LPS. Le noyau externe, pour sa part, est constitué d'hexoses. La structure du noyau oligosaccharide d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 n'est pas définie, mais Altman et coll.² en ont déterminé sa composition en sucres: D-galactose, D-glucose, L-glycero-D-manno-heptose, D-glycero-D-manno-heptose et 2-amino-2-désoxy-D-glucose. La même année, Maudsley et coll.⁷⁶ ont déterminé que la composition du LPS pour le sérotype 2 est sensiblement identique.

Le noyau oligosaccharidique présente une grande stabilité structurale entre les membres d'une même espèce bactérienne, mais diffère entre les genres bactériens. La plus grande diversité du noyau oligosaccharidique se situe dans la partie du noyau externe⁵⁷. La perte de la partie du noyau oligosaccharidique interne chez les mutants rugueux "profonds" tel *S. typhimurium* Re (voir Figure 1, p. 15) mène à une augmentation de la sensibilité envers certains produits hydrophobes dont les antibiotiques, les détergents et les agents mutagènes. Cette partie jouerait un rôle important dans la perméabilité de la membrane.

Jacques et coll.⁵⁹ ont démontré que le noyau oligosaccharidique des LPS d'*A. pleuropneumoniae* se divise en deux types de profils électrophorétiques et immunogéniques. Le premier type (type I) se caractérise par une migration en gel de polyacrylamide, en présence de Tricine et de SDS, plus lente que celle du noyau oligosaccharidique du LPS de *Salmonella typhimurium* Ra. De plus, le type I se compose de trois bandes distinctes sur gel. Les sérotypes 1, 6, 9 et 11 présentent ce phénotype. Le type II, pour sa part, migre en parallèle avec le noyau oligosaccharidique de *S. typhimurium* Ra et n'a qu'une seule bande bien définie. Les autres sérotypes composent ce second type. En plus de leur migration différente, il a été démontré que les deux types de noyau oligosaccharidique possèdent des différences au niveau antigénique. La région du noyau oligosaccharidique de type I ne démontre aucune réactivité lors d'analyses par immunobuvardage avec un antisérum provenant d'un porc infecté expérimentalement par un sérotype de type II. Par contre, en présence d'un antisérum provenant d'un porc infecté expérimentalement par un sérotype de type I, le noyau oligosaccharidique type I réagissait fortement, et vice versa⁵⁹.

L'antigène-O consiste en des unités répétées d'oligosaccharides formées de 1 à 8 résidus de sucres⁵⁷. Présentement, 20 sucres différents ont été identifiés par Perry et coll.⁹⁹ pour *A. pleuropneumoniae*, la majorité étant des didésoxyhexoses. L'antigène-O est la partie la plus longue du LPS et aussi la plus variable. Cette variabilité réside dans le type et le nombre de monosaccharides composant les unités répétées. 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 *A. pleuropneumoniae* sérotypes 1 et 5 sont semi-rugueux et *A. pleuropneumoniae* sérotype 2 est lisse)^{7, 17, 28, 99}. La dénomination lisse-rugueuse est liée à la morphologie de la colonie sur milieu solide. Il a été démontré que les souches rugueuses sont moins virulentes que les souches lisses, ce qui suggère que l'antigène-O est important lors de l'interaction avec l'hôte. De plus, les souches rugueuses sont plus susceptibles à la phagocytose et à l'activité bactéricide du sérum¹³². Certains LPS ne présentant pas d'antigène-O sont appelés lipooligosaccharides (LOS) (comme par exemple chez *Haemophilus influenzae*)⁷⁴.

3.3.2. Fonctions des LPS

La colonisation des muqueuses de l'hôte est 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 récepteurs²². L'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules épithéliales de la trachée et au mucus du tractus respiratoire porcin a été attribuée aux LPS^{7, 9}. 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 faiblement⁷. Paradis et coll.⁹⁵ ont

démontré que les LPS de haut poids moléculaire sont principalement impliqués dans l'adhérence de la bactérie et que le lipide A ne serait pas impliqué. De plus, des tests ont démontré que les LPS purifiés se lient aux cellules épithéliales et par le fait même inhibent l'adhérence des bactéries à ces mêmes cellules⁹⁵. Ces résultats démontrent que la partie polysaccharidique est l'adhésine majeure d'*A. pleuropneumoniae*, mais ne donne aucune indication sur la partie exacte véritablement impliquée: antigène-O ou noyau oligosaccharidique? De récents travaux ont démontré que des mutants d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 rugueux adhéraient aux cellules épithéliales de la trachée d'une façon similaire à la souche sauvage. Par contre, un mutant au niveau du noyau oligosaccharidique adhérait moins que la souche sauvage, suggérant que le noyau oligosaccharidique, et non l'antigène-O, aurait un rôle à jouer dans l'adhérence de la bactérie (voir section 4.4 et Annexe 2)¹¹².

Il a été démontré que les LPS d'*A. pleuropneumoniae* pouvaient lier des protéines de 10 et 11 kDa se retrouvant dans les sécrétions des voies respiratoires du porc⁸. Suite à des expérimentations plus approfondies, Bélanger et coll.⁶ ont déterminé que ces protéines avaient une forte homologie avec les chaînes α et β de l'hémoglobine porcine. Ces mêmes recherches ont mené à l'identification du lipide A comme site de liaison de l'hémoglobine. Cette liaison a été démontrée pour toutes les souches d'*A. pleuropneumoniae*, par contre son utilisation comme source de fer peut varier entre les souches selon la présence de diverses protéines membranaires (OMP, voir ci-bas)⁶. Archambault et coll.⁴ ont démontré que la liaison de l'hémoglobine aux LPS d'*A. pleuropneumoniae* peut modifier certaines de leurs propriétés biologiques et physiques.

Les LPS sont impliqués dans la protection contre le système du complément et dans l'initiation de la réponse inflammatoire. Les anticorps dirigés contre les LPS diminueraient l'effet bactéricide du complément en réduisant l'adhérence du facteur C9 à la surface bactérienne¹³². Le lipide A du LPS libre stimule les cellules immunitaires, dont les macrophages alvéolaires, à produire des médiateurs chimiques impliqués dans la réponse inflammatoire tels le TNF, IL-1, IL-6, IL-8, des radicaux libres oxygénés et des lipides (prostaglandine E₂). Ces substances chimiques libérées en faibles quantités sont bénéfiques pour l'organisme en provoquant une faible fièvre. Par contre, produit en grande quantité ces médiateurs provoquent une forte fièvre, l'hypotension et possiblement un choc létal¹¹¹.

3.3.3. La génétique des LPS

Les gènes codant pour la biosynthèse des LPS d'*E. coli* et de *Salmonella* sont les mieux connus et nous serviront de guide pour comprendre la génétique des LPS d'*A. pleuropneumoniae*. De plus, un parallèle sera fait avec la génétique d'*Haemophilus influenzae*, une bactérie apparentée à *A. pleuropneumoniae* (famille des *Pasteurellaceae*). Notons que la nomenclature de ces gènes est un vrai casse-tête; dans le but de tout simplifier, Reeves et coll.¹⁰⁹ ont proposé une nouvelle nomenclature basée sur la similarité de fonction des gènes et leur implication dans la synthèse des diverses structures du LPS. Cette nomenclature sera utilisée et l'ancienne sera identifiée entre parenthèse pour certaines clarifications.

3.3.3.1. Le lipide A

La biosynthèse du lipide A est sous le contrôle de quatre gènes connus: *lpxA*, *B*, *C* et *D*. La première étape consiste en l'acylation de l'UDP-GlcNAc par le produit du gène *lpxA*, l'UDP-GlcNAc acyltransférase¹⁸. L'UDP-GlcNAc

est préalablement formé par une enzyme bifonctionnelle codée par le gène *glmU*⁷⁹ et est important non seulement pour la synthèse du lipide A³⁸, mais aussi pour celle des peptidoglycanes⁹⁶, de l'antigène-O¹²³ et des antigènes entérobactériens communs⁷⁷. L'UDP-GlcNAc est lié par LpxA à l'ACP-R-3-hydroxymyristoyl pour former le UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-GlcNAc. À ce stade, le produit du gène *lpxC*, une acétylase¹⁴⁰, intervient pour sur le produit de la première étape. Après quoi, ce dernier produit est incorporé à l'ACP-R-3-hydroxy-méristoyl par le produit du gène *lpxD* (N-acyltransférase)⁶⁸ pour former un liponucléotide nommé UDP-2,3-diacylglucosamine. Le lipide A étant composé de deux sucres de base, il faut combiner deux liponucléotides. Cette étape nécessite une enzyme pyrophosphatase spécifique pour l'UDP-2,3-diacylglucosamine qui clive un lien phosphate, résultant en 2,3-diacylglucosamine aussi connu sous lipide X¹⁰⁸. Alors, la disaccharide synthase codée par le gène *lpxB*²¹ peut jumeler une molécule de lipide X à une molécule d'UDP-2,3-diacylglucosamine formant ainsi le disaccharide-1-phosphate. À cette nouvelle molécule, une kinase membranaire ajoute un phosphate en 4' qui sera important par la suite en tant qu'accepteur de KDO; c'est le lipide IV_A¹⁰⁷. Le précurseur du lipide A est maintenant prêt pour se lier à deux molécules de KDO préalablement formées à partir de phosphoénolpyruvate et d'arabinose-5-P. Les deux liaisons de CMP-KDO se font à l'aide de l'enzyme bifonctionnelle WaaA (transférase) codée par le gène *waaA* (*kdtA*)¹⁰ produisant le KDO₂-lipide IV_A. Cette molécule est ensuite acylé par l'ajout de lauroyl et de myristoyl par les enzymes WaaM et WaaN [respectivement des gènes *waaM* (*htrB*) et *waaN* (*msbB*)]. Le produit final est le KDO-lipide A qui servira par la suite à la liaison avec les autres sucres du noyau oligosaccharidique.

Notons ici que l'enzyme WaaA d'*H. influenzae*, contrairement à l'enzyme WaaA d'*E. coli*, est une enzyme monofonctionnelle, ce qui serait en concordance avec la composition en sucre du noyau oligosaccharidique d'*H. influenzae*^{46, 78, 137}. Phillips et coll.¹⁰⁰ ont démontré que le noyau oligosaccharidique d'*H. influenzae* ne contient qu'un seul KDO. Il serait tentant de généraliser la structure du noyau oligosaccharidique d'*H. influenzae* à *A. pleuropneumoniae*, par contre *H. influenzae* ne produit pas de LPS complet, mais plutôt des LOS (Figure 3, p. 26), ce qui pourrait causer de grandes différences dans les structures. La présence de KDO dans le noyau oligosaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* a bien entendu été démontrée², mais la quantité exacte n'est pas connue.

La caractéristique commune entre les gènes impliqués dans la biosynthèse du lipide A est que l'un ne peut pas travailler sans l'autre, leur fonction est linéaire. La viabilité du micro-organisme dépend de la bonne marche de tous les gènes mentionnés ci-haut, puisque le LPS minimal requis pour la viabilité bactérienne est constitué du lipide A glycosylé et de deux résidus KDO, ce qui correspond au chémotype Re (Figure 1, p. 15)¹⁰⁵.

3.3.3.2. Le noyau oligosaccharidique

La composition complexe du noyau oligosaccharidique ne permet pas de synthétiser les substrats impliqués dans sa formation; son étude *in vitro* s'en trouve donc ralentie. Chez *E. coli*, cinq types de noyaux oligosaccharidiques ont été identifiés (K-12, R1, R2, R3 et R4) et pour *Salmonella* le type de noyau correspond au sérovar étudié. La structure des gènes impliqués dans la synthèse de ces types de noyaux oligosaccharidiques est découverte depuis quelque temps. Les gènes sont regroupés en 3 opérons sur le chromosome bactérien dont l'ensemble est désigné *waa (rfa)* (Figure 2, p. 23)^{5, 115}. Le

premier opéron, débutant par le gène *waaQ* (*rfaQ*), comporte 10 gènes impliqués essentiellement dans la biosynthèse et la modifications et/ou ramification du noyau externe⁴⁵. Cet opéron est sous la régulation du gène *waaH* situé à l'extérieur de l'opéron *waa*¹⁰³. Une mutation dans le gène *waaH* produit une molécule de LPS tronquée¹²⁰. Le deuxième opéron, composé de quatre gènes (*gmhD-waaFCL*) et convergeant vers le premier, est requis pour la synthèse du noyau interne⁴⁵. Cet opéron est sous un contrôle de type thermique (heat shock)¹⁰⁶. Le dernier opéron comporte deux gènes, soit *waaA* et *orf18*; le premier gène étant impliqué dans l'attachement du KDO au lipide A et le deuxième codant pour une protéine dont la fonction n'est pas encore déterminée⁴⁵. Les gènes de l'opéron *waa* codent pour des protéines hydrophiles fonctionnant dans le cytoplasme ou dans l'espace périplasmique, à l'exception des gènes *waaA* et *waaL* dont les protéines respectives possèdent un ou des domaines transmembranaires hydrophobes¹²⁰. La fonction de chacun des gènes *waa* de *E. coli* et de *Salmonella typhimurium* est mentionnée dans le Tableau 1. En résumé, les gènes *waaCFGJOQRT* sont essentiels pour le transfert de sucres, les gènes *waaBDKUVWX* agissent sur les substitutions, le gène *waaA* agit sur la liaison du KDO sur le lipide A et les gènes *waaPY* agissent comme kinase. Quelques gènes, se situant à l'extérieur de l'opéron *waa*, sont essentiels pour la biosynthèse du noyau oligosaccharidique. Parmi ceux-ci, mentionnons le gène *waaH*, important pour régulation de l'opéron *waaQ*; le gène *waaE*, impliqué dans la synthèse de l'ADP-heptose et le gène *galU*, impliqué dans la synthèse d'UDP-glucose important pour la formation du noyau externe chez *Haemophilus influenzae*⁵⁰. Les gènes sont divisés en trois groupes: le premier consiste en des gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse de précurseurs tel l'UDP-glucose; le deuxième groupe comprend les gènes nécessaires pour la formation de protéines impliquées dans le transfert des sucres sur leur

accepteur respectif (par exemple: glycosyltransférase); enfin le troisième groupe comprend les gènes codant pour les protéines régulatrices, tel WaaH chez *Salmonella*⁷³.

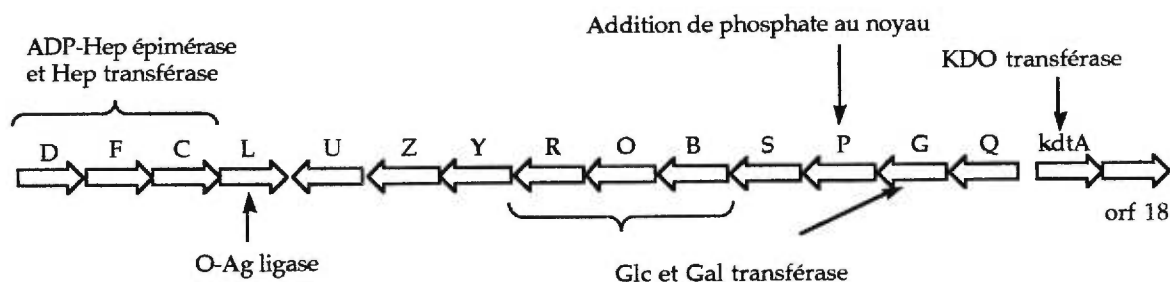


Figure 2. Organisation et fonction des gènes formant l'opéron *waa* d'*E. coli* K-12. Les flèches indiquent le sens de la transcription des gènes. Le dessin n'est pas à l'échelle. Modifiée selon Heinrichs et coll.⁴⁵

Les étapes exactes de la biosynthèse du noyau oligosaccharidique ne sont pas connues comme celles du lipide A. Il est par contre certain que les enzymes impliquées peuvent fonctionner en parallèle. L'incorporation des sucres pouvant se faire indifféremment sur le KDO-Lipide IV_A ou sur le KDO-lipide A et ensuite suivre un ordre établi. De plus les enzymes produisant les ramifications sur les sucres peuvent agir sans que ceux-ci soient attachés à la chaîne principale. Le fonctionnement en parallèle des enzymes impliquées dans la biosynthèse reflète un mécanisme important dans la diversité structurale bactérienne et pourrait ainsi aider à la survie de la bactérie lors de conditions défavorables¹²⁰.

L'étude de la génétique du noyau oligosaccharidique est grandement simplifiée grâce à la production de certains mutants disponibles commer-

cialement pour *E. coli* et *Salmonella*. Ces mutants LPS sont nommés Re (muté dans *waaC*, *waaE* ou *waaD*), Rd₂ (muté dans *waaF*), Rd₁ (muté dans *waaG*), Rc (muté dans *waaP*), Rb (muté dans *waaJ*) et Ra (muté dans *waaL*) (voir Figure 1, p. 15)^{45, 105}. Les mutants au niveau du noyau oligosaccharide de *Salmonella* sont, à quelques exceptions près [*waaK-U (rfaK) et waaB*], toujours rugueux⁷³. Ces LPS montrent une augmentation de leur mobilité électrophorétique relative lorsque visualisé sur un gel tricine-SDS.

Tableau I. Gènes de l'opéron *waa* impliqués dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique d'*Escherichia coli* (K-12, R1-R4) et *Salmonella typhimurium* (ST); ancienne et nouvelle nomenclature (Selon Heinrichs et coll.⁴⁵)

Anciens noms	Nouveaux noms	Fonctions connues ou proposées	Types de noyau ^a						
			K-12	R1	R2	R3	R4	ST	
<i>kdtA</i>	<i>waaA</i>	KDO transférase	+	+	+	+	+	+	
<i>rfaD</i>	<i>gmhD</i>	ADP-L-glycero-D-manno-heptose épimérase	+	ND	ND	ND	ND	+	
<i>rfaL</i>	<i>waaL</i>	Antigène-O ligase	+	+	+	+	+	+	
<i>rfaC</i>	<i>waaC</i>	Heptose I transférase	+	+	+	+	+	+	
<i>rfaF</i>	<i>waaF</i>	Heptose II transférase	+	ND	ND	ND	ND	+	
<i>rfaQ</i>	<i>waaQ</i>	Heptose III transférase	+	+	+	+	+	+	
<i>rfaG</i>	<i>waaG</i>	HexI transfert: glucosyltransférase I	+	+	+	+	+	+	
<i>rfaI</i>	<i>waaO</i>	HexII transfert: glucosyltransférase	+	+	+	-	+	-	
<i>rfaI</i>	<i>waaI</i>	HexII transfert: galactosyltransférase	-	-	-	+	-	+	

Tableau I (suite)

<i>rfaJ</i>	<i>waaT</i>	HexIII transfert: galactosyltransférase	-	+	-	-	+	-
<i>rfaJ</i>	<i>waaR</i>	HexIII transfert: glucosyltransférase	+	-	+	-	-	-
<i>rfaJ</i>	<i>waaJ</i>	HexIII transfert: glucosyltransférase	-	-	-	+	-	+
<i>rfaB</i>	<i>waaB</i>	HexI substitution: galactosyltransférase	+	-	+	-	-	+
	<i>waaV</i>	HexII substitution: glucosyltransférase	-	+	-	-	-	-
	<i>waaX</i>	HexII substitution: galactosyltransférase	-	-	-	-	+	-
<i>rfaK</i>	<i>waaK</i>	HexIII substitution: GlcNAc transférase	-	-	+	-	-	+
<i>rfaK</i>	<i>waaU</i>	HexIII substitution: hepIV transférase	+	-	-	-	-	-
	<i>waaW</i>	HexIII substitution: galactosyltransférase	-	+	-	-	+	-
	<i>waaD</i>	HexIII substitution: glucosyltransférase ou HexII substitution: GlcNAc-transférase	-	-	-	+	-	-
<i>rfaP</i>	<i>waaP</i>	HepI kinase	+	+	+	+	+	+
<i>rfaY</i>	<i>waaY</i>	HepII kinase	+	+	+	+	+	+
<i>rfaS</i>	<i>waaS</i>	?	+	-	-	-	-	-
<i>rfaZ</i>	<i>waaZ</i>	?	+	-	+	-	-	+

^aND, séquence non disponible, mais présence prédite; -, pas de gène; +, présence du gène.

Dans le cas d'*H. influenzae*, les gènes impliqués dans la synthèse du noyau oligosaccharidique (Figure 3, p. 26) ne se retrouvent pas sous forme d'opéron, ils sont dispersés sur le chromosome bactérien ⁵⁰. Le seul groupe de gènes dans le génome d'*H. influenzae* est le petit opéron constitué des gènes *kdtA* et *orf18*. Hood et coll. ⁵⁰ ont étudié les gènes impliqués dans la biosynthèse des LOS d'*H. influenzae* (Tableau II, p. 27) à l'aide de mutants spécifiques. Ils ont démontré qu'une mutation dans les gènes *opsX*, *rfaF*, *orfH* et *pgmB* individuellement entraînait un changement dans la mobilité électrophorétique du noyau oligosaccharidique lorsque visualisé sur un gel tricine. Ces phénotypes représentent des molécules de LOS n'ayant pas incorporé un ou des résidus de glucose ou de galactose.

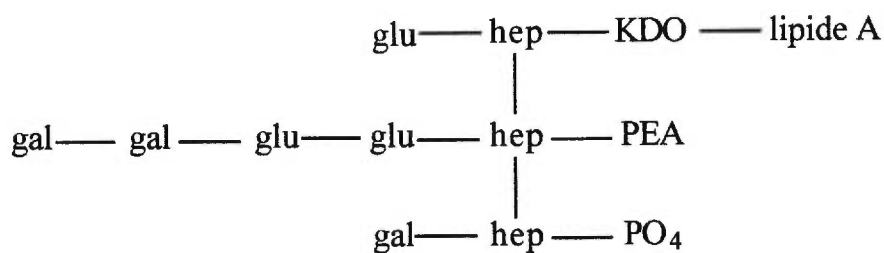


Figure 3. Schéma de la structure du lipo-oligosaccharide d'*H. influenzae*. Selon Hood et coll.⁵⁰.

Tableau II. Gènes impliqués dans la biosynthèse du LOS d'*H. influenzae* et homologie de fonctions avec différentes espèces bactériennes. Selon les travaux de Hood et coll.⁵⁰.

Gènes	Fonctions homologues	Espèces
<i>lgtC</i>	Glycosyl transférase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>opsX</i>	Biosynthèse de saccharides	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>rfaF</i>	Heptosyl transférase	<i>S. typhimurium</i>
<i>kfiC</i>	Galactosyl transférase	<i>E. coli</i>
<i>orfE</i>	Glycosyl transférase	<i>Erwinia</i>
<i>orf18</i>	?	<i>E. coli</i>
<i>kdtA</i>	KDO transférase	<i>E. coli</i>
<i>pgmA</i>	Phosphoglucosamine mutase	<i>E. coli</i>
<i>pgmB</i>	Phosphoglucomutase	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>pgmC</i>	Phosphoglucosamine mutase	<i>E. coli</i>
<i>lpsA</i>	Glycosyl transférase	<i>Pasteurella haemolytica</i>
<i>rfe</i>	GlcNAc transférase	<i>E. coli</i>
<i>lgtA</i>	Glucosyl transférase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>galU</i>	UDP-glucose synthetase	<i>E. coli</i>
<i>nusG (rfaH)</i>	Termineur transcriptionnel	<i>E. coli</i>
<i>rfaD</i>	Heptose biosynthèse	<i>E. coli</i>
<i>rfaE</i>	Heptose biosynthèse	<i>E. coli</i>
<i>orfH</i>	Heptosyl transférase	

3.3.3.3. L'antigène-O

Les gènes de l'opéron *wb** (*rfb*) contrôlent la biosynthèse de l'antigène-O¹⁰⁵. La grande variabilité de l'antigène-O parmi les bactéries Gram-négatif fait en sorte que l'ADN codant pour sa biosynthèse est aussi très variable. Les deux principaux substrats utilisés dans la synthèse de l'antigène-O sont le dTDP-rhamnose, codé par les premiers gènes de l'opéron, soit *rmlABCD* (anciennement *rfbABCD*) et le 3,6-didésoxyhexose codé par les gènes *ddhDABC* et *abe* (*rfbIFGHJ*) chez *Salmonella*¹²⁰. L'antigène-O est synthétisé indépendamment du lipide A et du noyau oligosaccharidique sur un transporteur lipidique, l'undécaprénol-phosphate (Und-P)¹³⁹. Chez *Samonella typhimurium*, la synthèse débute par le transfert d'une molécule de galactose-1-phosphate au Und-P par l'entremise de l'enzyme undécaprénylphosphate galactosephosphotransférase codée par le gène *wbaP* (*rfbP*). Les gènes *wbaVUN* (*rfbVUN*) codent pour des transférases qui catalysent ensuite trois glycosylations séquentielles¹⁰⁵. Chez *E. coli*, cette première étape consiste au transfert d'un GlcNAc sur l'Und-P par l'enzyme Rfe. La polymérisation de la chaîne de l'antigène-O peut débiter par la suite. L'incorporation d'unités répétées nouvellement synthétisées se fait du côté réducteur de la chaîne en croissance par l'enzyme WbbH (Rfc), liée à la membrane cytoplasmique du côté périplasmique¹⁰⁵. Le nombre d'unités oligosaccharidiques insérées dans la chaîne est sous le contrôle du gène *wzz* (*cld*, *rol*) dont la fonction exacte n'est pas connue, mais doit en quelque sorte influencer l'efficacité catalytique de la protéine WbbH à chaque étape de l'élongation¹⁰⁵.

Une fois l'antigène-O formé, il est transféré et lié au complexe lipide A-noyau oligosaccharidique par l'entremise du gène *waaL* du côté périplasmique de la membrane cytoplasmique¹³⁹. Le LPS complet peut finalement être exporté à la surface bactérienne par un mécanisme encore méconnu¹³⁹. Une étude

dirigée par Paulsen et coll.⁹⁸ démontre qu'un deuxième type de ligation entre l'antigène-O et le complexe noyau oligosaccharidique-lipide A existerait; selon eux la ligation pourrait avoir lieu du côté cytoplasmique de la membrane et le LPS complet traverserait par la suite les deux membranes pour arriver à la surface bactérienne.

3.4. Protéines de la membrane externe

A. pleuropneumoniae possède dans sa membrane externe des protéines (OMP) qui participent à sa virulence. Seulement cinq OMP ont été bien caractérisées jusqu'à présent; une protéine de 42 kDa inductible par le maltose²⁵, une lipoprotéine extra-membranaire de 50 kDa nommée OmlA³⁹, une lipoprotéine de 14 kDa de la famille des protéines PAL³³ et deux protéines liant la transferrine nommées TfbA et TfbB⁴¹. La croissance sur milieu pauvre en fer amène *A. pleuropneumoniae* à exprimer la protéine TfbA, pour laquelle des anticorps sont retrouvés dans le sérum de porcs convalescents indiquant qu'elle est aussi produite *in vivo*²⁴. Cette protéine a été identifiée comme étant un récepteur spécifique à la transferrine porcine¹¹⁰ et permet à *A. pleuropneumoniae* de croître avec la transferrine comme seule source de fer⁴¹.

3.5. Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de moindre importance pourraient participer à la virulence d'*A. pleuropneumoniae*. Parmi ceux-ci, il y a la présence de fimbriae que l'on retrouve chez certaines des souches fraîchement isolées¹³⁰, des protéases capables de dégrader les IgA et l'hémoglobine⁸⁴, l'enzyme superoxide dismutase⁷¹ et l'uréase^{15, 126} quoique son rôle dans la pathogénie soit controversé¹²⁸.

4. Mutants d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

L'étude des facteurs de virulence d'un micro-organisme est grandement facilitée par l'utilisation de mutants. Par contre, les études moléculaires sont relativement récentes chez *A. pleuropneumoniae*; seulement six types de mutants ont été produits jusqu'à maintenant en utilisant diverses techniques telles la mutagenèse spontanée, chimique, dirigée et la mutagenèse à l'aide d'un transposon. Tascón et coll.¹²⁵ ont proposé une technique simple de mutagenèse impliquant le transposon mini-Tn10. Cette technique permet de générer des mutants stables et isogéniques avec une fréquence élevée (10^{-5}). De plus, leur sélection se fait facilement grâce à la résistance à la kanamycine portée par le transposon.

4.1. Mutants au niveau des toxines RTX

En 1991, Anderson et coll.³ ont obtenu des mutants spontanés d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 7 ayant une mutation au niveau du gène *apxIIA* codant pour une cytolysine. La mutation spontanée avait causé l'excision d'environ 8.5 kb de l'ADN chromosomique, incluant une partie de la région répétée de la toxine. La même année, Rycroft et coll.¹¹⁹ et Inzana et coll.⁵³ ont produit des mutants Apx du sérotype 2 et du sérotype 5, respectivement, à l'aide de la mutagenèse chimique utilisant le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Tascón et coll.¹²⁷ ont obtenu des mutants Apx du sérotype 1 à l'aide de la méthode de mutagenèse qu'ils ont mise au point¹²⁵. Plus récemment, Jansen et coll.⁶² ont produit des mutants grâce à une recombinaison homologe entre le chromosome bactérien d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 et le plasmide pVE6063 portant une copie altérée des gènes *apxICA*, *apxIBD* ou *apxIICA*. Tous ces mutants Apx ont permis de préciser le rôle des toxines dans la pathogénie d'*A. pleuropneumoniae*. Il a été démontré que les souches ayant une mutation dans le gène *apxIB* ne

présentent plus de virulence, suggérant ainsi que ce gène serait essentiel pour la sécrétion des deux toxines ApxI et ApxII. Par contre, les mutations affectant les gènes *apxA* ou *apxC* des toxines I ou II, ne produisent qu'une diminution de la virulence¹²⁷.

4.2. Mutants sensibles à la température

Ce type de mutant a premièrement été obtenu par Inzana et coll.⁵⁴ pour le sérotype 1 par mutagenèse à l'acide éthyleméthanesulfonique, puis, plus récemment, par Byrd et Hooke¹⁶. Ces derniers ont utilisé la mutagenèse chimique avec le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, suivi d'enrichissement avec la pénicilline et la D-cyclosérine, qui produit des mutations à plusieurs sites et ainsi provoque une atténuation génétique, sans toutefois nuire aux propriétés biologiques. Cette souche mutante d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 induit la production d'anticorps contre les antigènes de surface et les hémolysines d'*A. pleuropneumoniae* chez la souris.

4.3. Mutants au niveau de l'uréase et mutants auxotrophes

En utilisant la technique de mutagenèse qu'ils ont développée¹²⁵, Tascón et coll.¹²⁸ ont obtenu des mutants d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 uréase-négatif. Les tests de virulence effectués chez le porc ont démontré que les souches mutantes étaient toutes aussi virulentes que la souche parentale, ce qui suggère que l'activité uréase d'*A. pleuropneumoniae* n'aurait pas d'impact sur la virulence.

L'obtention de mutants auxotrophes d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 s'est effectuée à l'aide de la mutagenèse dirigée. Fuller et coll.³⁶ ont éliminé du chromosome l'opéron codant pour la biosynthèse de la riboflavine et ont remplacé cette portion par une cassette codant pour la résistance à la

kanamycine. Ces mutants, incapables de croître en absence de riboflavine exogène, ont démontré une atténuation de la virulence lorsque inoculés chez le porc.

4.4. Mutants au niveau de la capsule

Rosendal et coll.¹¹⁷ ont obtenu des mutants acapsulés du sérotype 1 en utilisant la technique d'atténuation (70 passages successifs sur un milieu "trypticase soy agar" enrichi de 5% de sang de veau chauffé et 0,01% de NAD). À la suite d'infections chez la souris, ils ont remarqué une baisse de la virulence du mutant acapsulé. Suite à une mutagenèse chimique avec l'éthyle méthanesulfonate, Inzana et coll.⁵⁵ ont obtenu des mutants des sérotypes 1 et 5 déficients au niveau de la synthèse de la capsule. Ces mutants d'*A. pleuropneumoniae* ont été testés comme vaccin vivant chez les souris et ont montré l'induction d'une certaine protection envers des souches virulentes. Rioux et coll. (Annexe 2) ont obtenu un mutant acapsulé suivant la mutagenèse de Tascón et coll.¹²⁵. Le transposon s'est inséré dans le gène *cpxC* de l'opéron régulant l'exportation de la capsule produisant ainsi un mutant exempt de capsule. Ce mutant démontre une augmentation d'adhérence (20x) aux cellules de la trachée de porcelet comparativement à la souche mère. De plus, la virulence de ce mutant est quasiment nulle puisque la capsule joue ordinairement un rôle important contre la phagocytose¹²⁹. Des mutants acapsulés du sérotype 5a obtenus par échanges alléliques au niveau des gènes de la biosynthèse de la capsule ont démontré une diminution de la virulence et une augmentation de la sensibilité au sérum normal de porcs¹³⁴.

4.5. Mutants au niveau des LPS

Les premiers mutants au niveau des LPS, ayant été isolés et caractérisés, ont été obtenus de façon spontanée à partir de la souche de référence d'*A.*

pleuropneumoniae sérotype 1¹¹². Ils présentent des mutations au niveau de l'antigène-O ou du noyau oligosaccharidique. Une diminution de l'adhérence aux cellules de la trachée de porcelet et de la virulence chez la souris a été observée chez la souche mutée au niveau du noyau oligosaccharidique. Plus récemment, de nouveaux mutants LPS d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ont été obtenus (Rioux et coll. 1999, Annexe 1) suite à la mutagenèse à l'aide du transposon mini-Tn10 décrite par Tascón et coll. en 1993. Les mutants n'ayant plus l'antigène-O présentaient une adhérence similaire à la souche mère. Par contre, les résultats des tests d'adhérence avec un mutant isogénique (gène *galU*) ayant une modification au niveau du noyau oligosaccharidique se rapprochent des résultats obtenus par Tang et coll.¹²⁴ avec des mutants de *Pseudomonas aeruginosa*²⁰ puisque le taux d'adhérence aux cellules diminue significativement. Les mutations au niveau du noyau oligosaccharidique semblent affecter le niveau d'adhérence de certaines bactéries aux cellules des voies respiratoires.

À la lumière de ces informations, il est clair qu'une augmentation des connaissances au sujet de l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae*, au niveau moléculaire, peut être d'une grande utilité pour mieux comprendre sa pathogénie et ainsi aider à contrôler la pleuropneumonie.

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Core oligosaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 obtained by mini-Tn10 mutagenesis

Catherine Galarneau¹, Stéphane Rioux^{1,2}, and Mario Jacques^{1*}

¹Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, and Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6.

²Present address: Unité de Recherche en Vaccinologie, CHUQ, Ste-Foy, Québec, Canada G1V 4G2.

Running title: Core oligosaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1

*Corresponding author. Mailing address: 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. E-mail address:



ABSTRACT

Actinobacillus pleuropneumoniae is the causative agent of porcine pleuropneumonia, and its lipopolysaccharide (LPS) has been identified as the major adhesin involved in adherence to host cells. The purpose of this study was to isolate and characterize LPS core oligosaccharide (core OS) mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 by using mini-Tn10 mutagenesis. Three mutants (named CG1, CG3, and CG5) showed a faster migrating core OS compared to wild-type parent strain when visualized by Tricine SDS-PAGE. All mutants expressed the O-antigen and the capsule, and remained serum resistant. Mutants CG3 and CG5 showed a significant ($P < 0.05$) decrease of adherence to piglet tracheal frozen sections while mutant CG1 adhered similarly when compared to the parent strain. The gene interrupted by the mini-Tn10 insertion in both CG3 and CG5 is homologous to the *lbgB* gene of *Haemophilus ducreyi* involved in lipooligosaccharide biosynthesis. LbgB protein transfers a heptose residue to the HexIII of the outer core. In mutant CG1, the mini-Tn10 was inserted in a gene encoding for a protein with homology with the WaaB protein of *Salmonella typhimurium* and the WlaC and WlaE proteins of *Campylobacter jejuni*. The WaaB, WlaC and WlaE proteins are galactose or *N*-acetylgalactosamine transferases either on the HexI side-branch or on the growing chain. Our data suggest that the presence of a heptose residue on the outer core might be important for complete adherence without being essential since adherence of mutants CG3 and CG5 was reduced but not abolished.

Keywords: *A. pleuropneumoniae*; adherence; core OS mutants; *lbgB* gene;
waaB genes

INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a worldwide disease causing tremendous economic losses (Nicolet, 1992). The lipopolysaccharide (LPS) of *A. pleuropneumoniae* is an important factor involved in pathogenesis and virulence of this microorganism (Haesebrouck *et al.*, 1997; Inzana, 1991; Tascón *et al.*, 1996). This molecule has been identified by our group as the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in binding to porcine respiratory tract cells and mucus (Bélanger *et al.*, 1990; Bélanger *et al.*, 1992; Jacques, 1996). The polysaccharidic portion of LPS is responsible for binding to host cells since purified hydrolyzed LPS, containing the core oligosaccharide (core OS) and O-antigen but no lipid A, inhibited the adherence of *A. pleuropneumoniae* (Paradis *et al.*, 1994). *A. pleuropneumoniae* LPS biosynthesis mutants, either spontaneous mutants or isogenic mutants obtained by transposon mutagenesis, have been generated in our laboratory (Rioux *et al.*, 1997 and S. Rioux personal communication). These studies indicated that mutations in the O-antigen region have apparently no effects on adherence to porcine respiratory tract cells, while a mutation in the core OS region decreased the degree of adherence when compared to the wild-type parent strain.

LPS is composed of a lipid A region which anchors the molecule into the bacterial outer membrane; the O-antigen, a polysaccharide consisting of repeating units; and a core OS, which contains 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid (KDO), and makes the link between the two other parts (Hitchcock *et al.*, 1986). Different types of core have been identified in *Escherichia coli* (R1 to R4 and K-12) (Heinrichs *et al.*, 1998) and *Salmonella* (Mäkelä and Stocker, 1984). Study of *A. pleuropneumoniae* core OS region showed two different

core types among the 12 serotypes, based on gel mobility and antigenicity (Jacques *et al.*, 1996). Mutations in distinct genes involved in core OS biosynthesis result in loss of different sugar residues either in the main sugar frame or in the side branches, resulting in a shift in mobility of the core OS region when visualized on Tricine SDS-PAGE gels. These mutations helped understanding the genetics of LPS in enteric bacteria. The genes involved in the core OS biosynthesis have been described for *E. coli* and *Salmonella* as being grouped in the *waa* cluster (formerly *rfa*) (Heinrichs *et al.*, 1998; Raetz, 1996; Reeves *et al.*, 1996; Schnaitman and Klena, 1993). On the other hand, the genes involved in the core OS biosynthesis of *Haemophilus influenzae*, a member of the *Pasteurellaceae* as *A. pleuropneumoniae*, have been shown to be spread all around the chromosome (Hood *et al.*, 1996). Nothing is known about the genes involved in *A. pleuropneumoniae* LPS biosynthesis and their organization on the chromosome.

The purpose of this study was to define the role of the core OS of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 in adherence to porcine respiratory tract cells using mutants obtained by the insertion of the transposon mini-Tn10.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmid. A nalidixic acid-resistant *A. pleuropneumoniae* strain representing serotype 1 (4074 Nal^r) was used as recipient strain for mutagenesis while *Escherichia coli* S17.1 λ pir (pLOF/Km) was used as donor strain (Tascón *et al.*, 1993). Plasmid pBR325 was used for the cloning of the genes with a mini-Tn10 insertion and was transformed into *E. coli* XL1-Blue.

Growth conditions and media. *A. pleuropneumoniae* 4074 Nal^r was grown on BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI) agar plate supplemented with 15 μ g/ml of NAD and 30 μ g/ml of nalidixic acid (Nal). *E. coli* S17.1 λ pir (pLOF/Km) was grown on LB agar plates supplemented with 50 μ g/ml of kanamycin (Km). BHI agar plates supplemented with 15 μ g/ml of NAD, 30 μ g/ml of Nal, and 75 μ g/ml of Km were used for the growth of the transpositional mutants. For the selection of transformed plasmid pBR325 in *E. coli* XL1-Blue, Km (50 μ g/ml) and ampicillin (Amp; 50 μ g/ml) were added to LB agar. Plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 18-24h.

Transpositional mutagenesis. Mutagenesis in *A. pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative (de Lorenzo and Timmis, 1994) was done as described by Tascón *et al.* (Tascón *et al.*, 1993) with some modifications. Briefly, overnight cultures of recipient and donor strains were diluted in 0.85% NaCl to obtain an $A_{650\text{nm}}$ of 0.8. The two bacterial suspensions were mixed together (100 μ l each) in 5 ml of sterile 10 mM MgSO₄ and then filtered through a Millipore type HA 0.45 μ m membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA). The filter containing the donor and the recipient was placed onto BHI-NAD agar plates

(cells side up) and incubated at 37°C for 4 h. The membrane was then transferred to BHI-NAD agar plate containing 100 µM of IPTG to induce expression of the transposase. Following an incubation at 37°C for 15-18h, the bacteria were resuspended in sterile NaCl 0.85%, and appropriate dilutions were plated on the counterselecting medium (BHI-NAD-Nal-Km).

Selection of mutants. Different colonies from a master plate were inoculated onto BHI-NAD-Nal-Km agar plates containing 2 µg/ml of novobiocin. After incubation, the colonies that did not grow in the presence of this hydrophobic antibiotic were selected from the master plate. These novobiocin-sensitive mutants were analyzed by Tricine SDS-PAGE and immunoblotting.

SDS-PAGE, Tricine SDS-PAGE, and immunoblotting. Electrophoretic separation methods and analysis including SDS-PAGE, Tricine SDS-PAGE, and immunoblotting were performed as described previously by Rioux *et al* (1997).

DNA techniques. Restriction and modification enzymes were purchased from Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Québec, Canada) and were used according to the supplier's specifications. Plasmid DNA was prepared with the Plasmid QIAprep spin miniprep kit (Qiagen Inc, Mississauga, Ontario, Canada). Chromosomal DNA was purified following the method from Pitcher *et al.* (1989), using guanidium thiocyanate. In brief, cells lysis was induced by GES-buffer (5M guanidine thiocyanate, 100 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% sodium-lauryl-sarcosinate) and proteins precipitation by 7.5 M ammonium acetate. Phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1; Sigma, Oakville, Ontario,

Canada) was used to removed remaining exonucleases and lipoproteins from the DNA. The DNA was then precipitated using isopropanol.

PCR amplification of the transposon mini-Tn10 was made using the oligonucleotides primers KMTN903-L (5' AAGGGGTGTTATGAGCCATATT 3') and KMTN903-R (5' CCAATTCTGATTAGAAAAAGTC 3') at annealing temperature of 53°C using standard conditions (Ausubel *et al.*, 1990). Digoxigenin (DIG) labelling of a specific probe for the transposon was made in a standard PCR which was supplemented with 50 µM DIG-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada) using plasmid pLOF/Km as template and the same primers. *Hind*III-, *Xho*I- or *Eco*RI-digested genomic DNA was analyzed by Southern blot using a standard protocol (Ausubel *et al.*, 1990) with the following washing conditions: two washes for 5 min at room temperature with 2 X SSC containing 0.1% SDS, and twice for 15 min at 68°C with 0.2 X SSC containing 0.1% SDS. The DIG-labelled probe was detected using phosphatase-labelled anti-DIG antibodies with CDP-Star as substrate (Boehringer Mannheim) according to the manufacturer's instructions.

Identification of mutated genes was performed by cloning in pBR325. Chromosomal DNA was digested with restriction enzyme *Eco*RI which does not cut in the transposon 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 (Pharmacia Biotech). The Km-resistance cassette of the mini-Tn10 was used to detect recombinants containing the transposon

and the flanking chromosomal DNA from *A. pleuropneumoniae* on LB agar plates supplemented with 50µg/ml of Km and 50µg/ml of Amp.

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

Flow cytometry. Cells of *A. pleuropneumoniae* were incubated with either monoclonal antibodies against serotype 1 O-antigen (5.1 G8 F10; (Lairini *et al.*, 1995)) or serotype 1 K-antigen (1.5 C5 F4) and analyzed by flow cytometry as previously described (Paradis *et al.*, 1994). The flow analysis was performed with a FACStar flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA) equipped with a water-cooled 2 W argon ion laser operating at 488 nm and a 200 mW light output.

Adherence assay. The adherence assay to frozen tracheal sections was performed as described by Paradis *et al.* (1994). In brief, bacteria were diluted in PBS containing 1% (wt/vol) bovine serum albumin and 0.01% (vol/vol) Tween 20 to give an A_{540nm} of 0.2. One hundred µl of this bacterial suspension was placed onto piglet tracheal frozen sections on glass slides and incubated in a moist chamber at 37°C for 2 h. After intensive washing in distilled water, sections were stained with the Diff-Quik stain (Baxter

Healthcare Corporation, McGraw Park, IL.) according to the manufacturer's instruction. The number of bacteria attached to the tracheal epithelium was counted by microscopic examination at a magnification of X 1,000. Results were compared for statistical significance by Student's t test.

Serum bactericidal assay. A modification of the serum bactericidal assay procedure described by Ward and Inzana (1994) was used. Briefly, a 6-h old culture of *A. pleuropneumoniae* was harvested and washed at room temperature with PBS supplemented with 0.15 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂ (PBS⁺⁺). Bacteria were diluted at approximately 5 x 10⁴ CFU/ml in PBS⁺⁺. To 450 µl of normal swine serum, 50 µl of the bacteria suspension was added (final concentration of 90% serum) and incubated at 37°C. Control tubes contained heat-inactivated serum. Viable cells counts were estimated before the incubation and after three hours by plating 50 µl of the bacteria-serum suspension on BHI-NAD agar plates. Plates were incubated overnight at 37°C. The percentage viability was determined according to the equation: (number of colonies after incubation/ number of colonies before incubation) x100. Results were compared for statistical significance by Student's t test.

Nucleotide sequence accession number. The sequences reported here have been submitted to GenBank and assigned an accession number: ORF1, AF143904; ORF2 and ORF3, AF143905.

RESULTS

Isolation and characterization of core oligosaccharide mutants. The first screening for core OS mutants was done using susceptibility to a hydrophobic antibiotic (novobiocin) effective against membrane disturbed bacteria (Nikaido, 1976). Six hundred and fifty (650) individual bacterial colonies obtained from one mutagenesis experiment were tested on a selective medium containing novobiocin; 168 mutants were unable to grow in the presence of this hydrophobic antibiotic. The novobiocin-sensitive mutants were analyzed by Tricine SDS-PAGE, a method which allows a better resolution of the core OS region (Jacques *et al.*, 1996; Lesse *et al.*, 1990). Among these 168 novobiocin-sensitive mutants, three (named CG1, CG3, and CG5) showed a core OS region with a faster migration (Figure 1, lanes 2-4) as compared to the parent strain 4074 Nal^r (Figure 1, lane 1). In addition, the core OS region of mutants CG3 and CG5 (Figure 1, lanes 3 and 4) showed a similar migration. All three mutants were Km resistant and Amp sensitive, indicating that they resulted from a transpositional event and not a plasmid co-integration event.

To further analyze these core OS mutants, Western blot using the monoclonal antibody 5.1 G8 F10, which is directed against the O-antigen of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS, was performed to detect the presence of the O-antigen (Figure 2). All three mutants and the parent strain expressed the high-molecular mass O-chains. In addition, the samples separated by Tricine SDS-PAGE were transferred to nitrocellulose membrane and the antigenicity of the core OS region was evaluated by immunoblotting using serum from a pig experimentally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1; the core

OS region of the three mutants showed a loss of reactivity with this pig serum (Figure 3, lanes 2-4).

After migration on SDS-PAGE gel, samples were transferred to a nitrocellulose membrane and tested for the presence of the capsular material with the monoclonal antibody 1.5 C5 F4 directed against an epitope of the capsular polysaccharides of *A. pleuropneumoniae* serotype 1. All three mutants showed the same reactivity as did the parent strain (Figure 4) indicating that the mutation had not affected the capsule production. Flow cytometry was performed using the monoclonal antibodies directed against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen or K-antigen. The results confirmed those obtained by Western blot using the same monoclonal antibodies (data not shown).

PCR amplification and Southern hybridization. The amplification of the mini-Tn10 was done by PCR using the transposon-specific primers. All core OS mutants showed the expected 836 bp product and thus carried the mini-Tn10 (data not shown). Chromosomal DNA from each mutant was digested with the restriction enzyme *Hind*III (which cuts only once in the transposon) and analyzed by Southern blotting with specific DIG-labelled probe to verify the number of insertion of the transposon. All mutants carried a single copy, as the pattern of hybridization showed only two bands, and each insertion appeared to be located at different sites on the chromosome, as shown by different fragments' size (Figure 5). Results obtained by Southern after digestion with *Xho*I (which cuts the transposon at a single site) or *Eco*RI (which does not cut the mini-Tn10) confirmed that all mutants carried a single copy of the transposon (data not shown).

Identification of genes interrupted by mini-Tn10 in core OS mutants.

Genetic analysis of DNA adjacent to the mini-Tn10 insertion site allowed a BLAST search of non-redundant DNA and protein databases. This allowed us to determine that all three mutants were mutated in the same *EcoRI* restriction fragment (of approximately 7000 bp). Mutant CG1 had the mini-Tn10 insertion localized at the 3' end of a gene (ORF1; 1158 pb) encoding for a protein with identity with the WlaC (25%) and WlaE (29%) proteins of *Campylobacter jejuni*, and with the WaaB (27%) protein of *S. typhimurium* (Table 1). All three proteins are sugar transferases; WlaC and WlaE add Gal or GalNAc of the growing chain (Fry *et al.*, 1998), while WaaB acts on substitution of the HexI with Gal (Heinrichs *et al.*, 1998). Mutants CG3 and CG5 had the insertion at different positions (between nucleotides 356-357 and nucleotides 603-604, respectively) in the same gene (ORF2) encoding for a protein with homology to LbgB protein of *Haemophilus ducreyi* involved in LOS biosynthesis (Figure 6). The deduced amino acid sequence of *A. pleuropneumoniae* LbgB homologue exhibited 62% identity with the LbgB protein from *H. ducreyi* which has a D-glycero-D-manno-heptosyl transferase activity. LbgB protein of *H. ducreyi* showed in turn 24% identity to RfaK protein (1,2-N-acetylglucosamine transferase) from *E. coli*, whereas *A. pleuropneumoniae* LbgB had 22% identity with *E. coli* RfaK (Table 1). In *H. ducreyi*, the *lbgB* gene is located downstream of *lbgA* gene. Interestingly, we found in *A. pleuropneumoniae* a third ORF (ORF3) between ORF1 and ORF2, of which the deduced amino acid was 71% identical to the *H. ducreyi* LbgA (Table 1).

Serum resistance. The parent strain 4074 Nal^r and the three core OS mutants were tested for survival in 90% normal pig serum. The parent strain as well as the mutants were serum-resistant and even multiplied in porcine serum during

the 3-h period of incubation. After 3 h of incubation, the percentage of viability was $170\% \pm 20$, $180\% \pm 24$, $164\% \pm 58$, and $185\% \pm 43$ for the parent strain 4074 Nal^r, mutants CG1, CG3, and CG5, respectively. This test was controlled using *E. coli* mutant 2 which is known to be serum sensitive (Daigle *et al.*, 1995). Heat inactivated serum, used as control, gave similar results for the parent strain and all three mutants, but was unable to kill the *E. coli* mutant 2, confirming that the killing of the control strain was mediated by the complement (data not shown).

Adherence assay. The adherence to piglet tracheal frozen section was evaluated for the parent strain 4074 Nal^r and for the three core OS mutants. After 2 h of incubation, the parent strain and the mutant CG1 showed similar level of adherence, while the mutants CG3 and CG5 showed a significant decrease. The results of four experiments were used to determine the percentage of adherence compared to the parent strain. Mutant CG1 showed $94\% \pm 13$ of adherence which is not significantly different ($P = 0.079$) from the parent strain. On the other hand, mutants CG3 and CG5 showed $79\% \pm 27$ and $82\% \pm 21$ of adherence, respectively, which was significantly different ($P < 0.05$) from the parent strain.

DISCUSSION

Transposon mini-Tn10 has proven to be a powerful tool for the generation of mutants in *A. pleuropneumoniae*. Mutants deficient in urease (Tascón *et al.*, 1997), RTX toxins (Tascón *et al.*, 1994) and LPS biosynthetic genes (unpublish data obtained in our laboratory) were previously obtained by using this genetic element. LPS have been identified as the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* (Paradis *et al.*, 1994) as well as an important virulence factor (Tascón *et al.*, 1996). Preliminary results obtained by our group in our laboratory indicated that the core OS seems to be involved in adherence of *A. pleuropneumoniae* spontaneous LPS mutants (Rioux *et al.*, 1997). In this study, we used the mini-Tn10 to generate mutants in the core OS region of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS. These mutants provide new evidences confirming the role of *A. pleuropneumoniae* LPS, and core OS in particular, in adherence to host cells.

Higher relative mobilities of core OS mutants compared to wild type core have been reported for several bacterial species, including *S. typhimurium* (Ra-Re) (Mäkelä, and Stocker, 1984), *H. influenzae* (Hood *et al.*, 1996), *H. ducreyi* (Stevens *et al.*, 1995), and *Neisseria meningitidis* (Kahler *et al.*, 1996). The three core OS mutants (CG1, CG3, and CG5) obtained in the present study, showed a faster electrophoretic mobility when visualized by Tricine SDS-PAGE. LPS from these mutants reacted with the monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. However, the core OS region did not react with the serum from a pig experimentally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain. This result suggests that the faster migrating bands are incomplete core lacking the epitopes recognized by this convalescent pig antiserum.

To further characterize these *A. pleuropneumoniae* core OS mutants, we evaluated their resistance to the bactericidal activity of normal pig serum. All three mutants remained serum-resistant, since no differences were seen between the viability of parent strain and of the core OS mutants after a 3-h incubation period in 90% normal pig serum. These results are not surprising since all three core OS mutants still express their O-chains. It has been reported for other Gram negative bacteria that LPS, O-antigen in particular, may protect the cell from the complement killing by preventing its access to the outer membrane (Dasgupta *et al.*, 1994; Hong and Payne, 1997; Porat *et al.*, 1992).

Our group has previously shown that LPS is the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to porcine respiratory tract cells (Bélanger *et al.*, 1990; Bélanger *et al.*, 1992; Jacques, 1996). Paradis *et al.* (1994) showed that hydrolyzed LPS (without lipid A) is the active component involved in adherence. More recently, we have isolated in our laboratory one core OS mutant (with an insertion in the *galU* gene), with an additional band in the core OS region, which showed a significant reduction in adherence to tracheal cells (unpublished data). Core OS are involved in the adherence of other microorganisms, and mutants in that region showed reduced ability to bind to host cells. This has been reported for *Pseudomonas aeruginosa* *algC* mutant, which does not express LPS O antigen or A-band LPS and synthesizes an incomplete core (Coyne *et al.*, 1994). Binding of this mutant to human nasal polyp cells, 9HTEO cells, and to murine L4 cells was reduced (from 56 to 90%) when compared with the PAO1 control (Tang *et al.*, 1996). *H. ducreyi* LOS are involved in attachment to human foreskin fibroblast (Alfa and DeGagne, 1997) and mutation in LOS biosynthetic genes brings a diminution of adherence to host cells (Gibson *et al.*, 1997). LOS from *N.*

meningitidis were also shown to be important for attachment and colonization of human nasopharynx (Virji *et al.*, 1995). In the present study, the adherence of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI^r and of the three core OS mutants was evaluated. Adherence of mutants CG3 and CG5 was significantly reduced, while the adherence of the mutant CG1 was similar to the parent strain.

Mutants CG3 and CG5 exhibited a similar core OS electrophoretic mobility on Tricine SDS-PAGE and their adherence was reduced to the same extent (approximately 20%). The mini-Tn10 was inserted in the same gene but not at the same position (Figure 6). Moreover, since an *Hind*III site is found between the two insertion sites, this contributed to produce different patterns on Southern blot after *Hind*III digestion. The mini-Tn10 insertion was located in a gene homologous to the *lbgB* gene of *H. ducreyi*. *H. ducreyi* mutants in *lbgB* also showed a higher relative mobility compared to that of wild type core region when visualized on SDS-PAGE (Stevens *et al.*, 1997). *lbgB*, unlike genes involved in LPS biosynthesis of enteric bacteria, is not found in a cluster of multiple genes; it is rather found with another gene, *lbgA*, whose product is also known to be involved in the LOS biosynthesis of *H. ducreyi* (Stevens *et al.*, 1997). We found in *A. pleuropneumoniae* a *lbgA* homologue upstream of the mutated *lbgB* gene of mutants CG3 and CG5, showing 71% identity with *H. ducreyi lbgA* gene.

LbgB of *H. ducreyi* is known to be a D-glycero-D-manno-heptosyl transferase. Eventhough structure of the LPS core from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 have not yet been elucidated, Altman *et al.* (1986) found the major components of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS core to be D-galactose, D-glucose, L-glycero-D-manno-heptose, D-glycero-D-

manno-heptose, 2-amino-2-deoxy-D-glucose and KDO. We do not know at the present time whether the D-*glycero*-D-*manno*-heptose is located on the main branch of the core OS or on a side-branch. Stevens *et al.* (1997) reported in their paper that LbgB of *H. ducreyi* has 24% identity with the RfaK protein of *E. coli*. In *E. coli* and *S. typhimurium*, the *rfaK* gene product is important for substitution of the HexIII of the outer core with GlcNAc (Klena *et al.*, 1992; Raetz, 1996). Mäkelä and Stocker (1984) reported that mutation in this gene does not imply the loss of the O-antigen. In a recent review on *E. coli* LPS core types, Heinrichs *et al.* (1998) divided the *rfaK* gene into two distinct genes: *waaK* with the same function, and *waaU* with a slightly different function which is to add a heptose residue to the HexIII of the outer core. Since mutants CG3 and CG5 still possess their O-antigens as demonstrated by SDS-PAGE, and by Western blot and flow cytometry using a monoclonal antibody against the O-antigen of *A. pleuropneumoniae* serotype 1, we can speculate that in *A. pleuropneumoniae* serotype 1 this heptose would be located in a ramification of the core. The presence of this heptose branch in the core OS of *A. pleuropneumoniae* seems to be important for adherence to host cells, without being essential, since the adherence of mutants CG3 and CG5 was reduced by 20% but not completely abolished. Other sugar moieties, in addition to this heptose, must therefore be involved in adherence to porcine respiratory tract cells.

Mutant CG1 was mutated in a gene whose product is homologous to the WlaC and the WlaE proteins of *C. jejuni*, and with the WaaB protein of *S. typhimurium*. WlaC and WlaE link Gal or GalNAc to the growing polysaccharide chain in *C. jejuni* (Fry *et al.*, 1998), while the WaaB protein substitutes the HexI of the outer core with Gal in *S. typhimurium* (Heinrichs *et al.*, 1998). It has been reported that mutation in the WaaB protein does not

affect the ability to link the O-antigen to the core OS (Mäkelä, and Stocker, 1984). Since mutant CG1 still possesses the high-molecular-mass LPS, we speculate that the activity encoded by ORF1 in *A. pleuropneumoniae* serotype 1 is more likely to be similar to the activity of WaaB than that of WlaC or WlaE. This is also supported by the fact that no GalNAc is found in the core of *A. pleuropneumoniae* (Altman *et al.* 1986). Nevertheless, the mutation in CG1 does not affect its adherence to porcine respiratory tract cells. We can therefore assume that the Gal residue is not involved in adherence.

In summary, our results indicate that two *A. pleuropneumoniae* core OS mutants (CG3 and CG5) showed a significantly reduced adherence to porcine respiratory tract cells when compared to the parent strain, while adherence of the other core OS mutant was unaffected. Mutants CG3 and CG5 present a mutation in a gene highly homologous to the *lbgB* gene of *H. ducreyi*, which encodes for a heptose transferase activity. Our data suggest that a heptose residue in the core OS, possibly present as a side branch, is part of the binding domain involved in adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells.

Table 1. Predicted *A. pleuropneumoniae* gene products presented in this study and similar proteins in the non-redundant sequence databases.

Proteins	Size (a.a.)	Similar proteins	Putative function	Identity (%)	Database accession number
ORF1	384	WaaB- <i>S. typhimurium</i> (359 a.a.) WlaC- <i>C. jejuni</i> (358 a.a.) WlaE- <i>C. jejuni</i> (365 a.a.)	Hexose 1 substitution Outer core elongation with galactose Outer core elongation with GalNAc	27 25 29	AF0263861 Y11648 Y11648
ORF2	344	LbgB (LosB)- <i>H. ducreyi</i> (343 a.a.) WaaK (RfaK)- <i>E. coli</i> (357 a.a.) WaaU- <i>E. coli</i> (357 a.a.)	D-glycero-D-manno-heptosyl transferase 1,2-N-acetylglucosamine transferase heptosyltransferase	62 22 22	U58147 M95398 M95398
ORF3	224	LbgA (LosA)- <i>H. ducreyi</i> (224 a.a.)	Unknown (LOS biosynthesis)	71	U58147

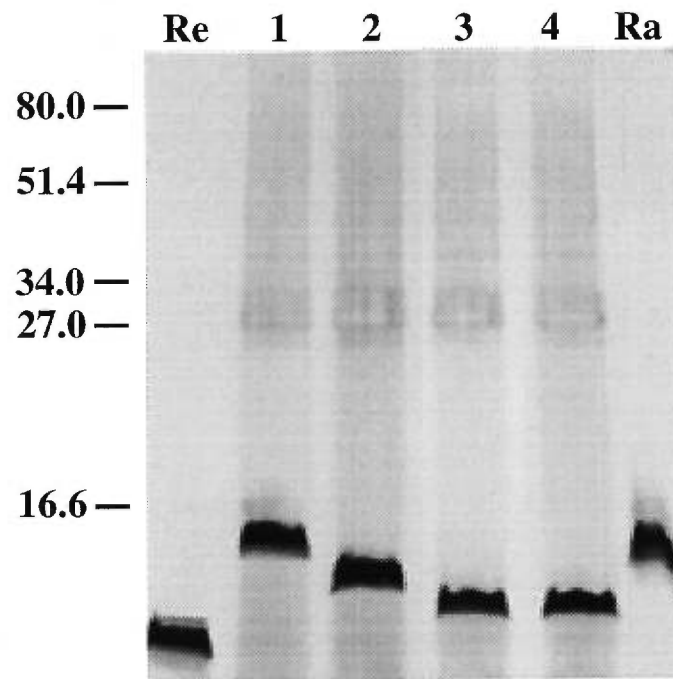


FIGURE 1 Silver-stained Tricine SDS-PAGE profiles of whole-cell proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain and isogenic core OS mutants. Lane 1, parent strain 4074 Nal^r; lane 2, mutant CG1; lane 3, mutant CG3; lane 4, mutant CG5. For comparison, LPS from *S. typhimurium* SL1181 (Re mutant) and *S. typhimurium* TV119 (Ra mutant) are shown. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.

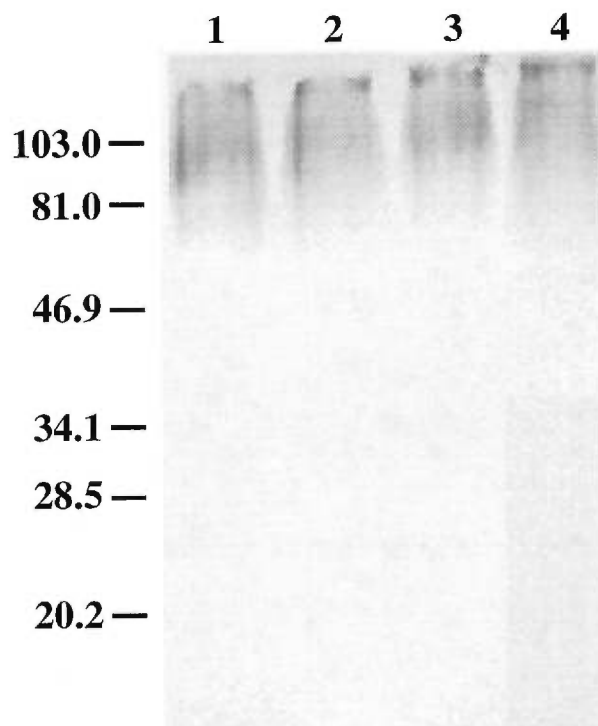


FIGURE 2 Immunoblot of whole-cell proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain and isogenic core OS mutants. The immunoblot was probed with monoclonal antibody 5.1 G8 F10 against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. Lane 1, parent strain 4074 Nal^r; lane 2, mutant CG1; lane 3, mutant CG3; lane 4, mutant CG5. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.

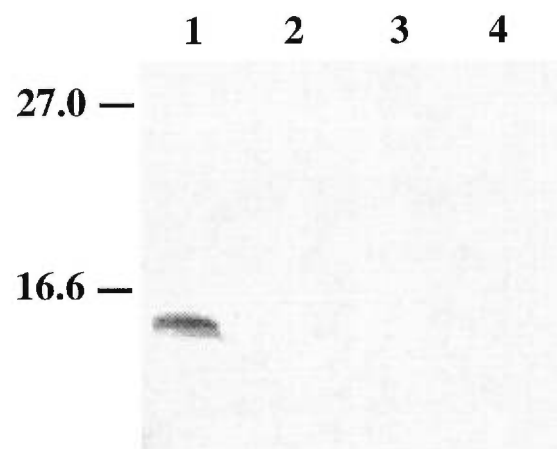


FIGURE 3 Immunoblot of whole-cell proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain and isogenic core OS mutants. The immunoblot was probed with a serum from a pig experimentally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1. Lane 1, parent strain 4074 Nal^r; lane 2, mutant CG1; lane 3, mutant CG3; lane 4, mutant CG5. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Only the region of interest is shown.

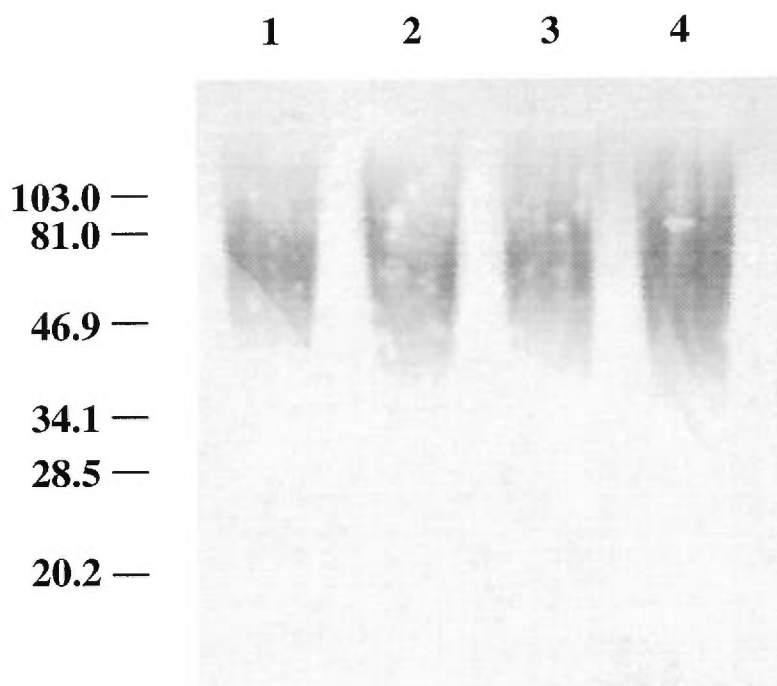


FIGURE 4 Immunoblot of whole-cell proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain and isogenic core OS mutants. The immunoblot was probed with a monoclonal antibody 1.5 C5 F4 against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 capsule. Lane 1, parent strain 4074 Nal^F; lane 2, mutant CG1; lane 3, mutant CG3; lane 4, mutant CG5. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.

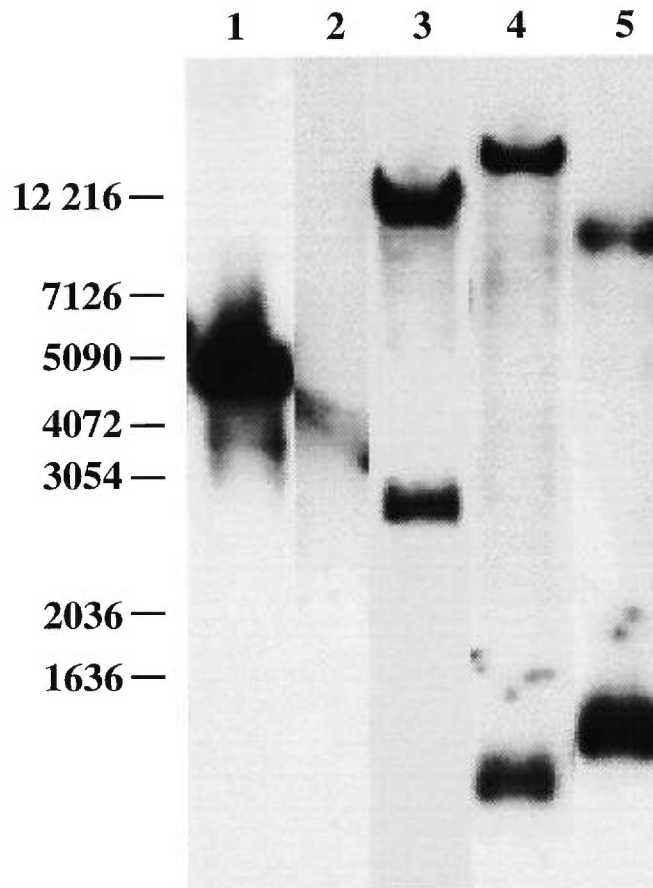


FIGURE 5 Random insertion of the *Tn10* element in *A. pleuropneumoniae* core OS mutants as determined by Southern blot analysis. Lane 1, plasmid pLOF/Km; Lane 2, parent strain 4074 *Nal^r*; lane 3, mutant CG1; lane 4, mutant CG3; lane 5, mutant CG5. Molecular size standards (in kilobases) are indicated on the left.

A. p.		SKLIDKLR	FLIPGKFF	DKKIESAL	GLPKKILFLR	QGGKIGDYIV	50
H. d.	LbgB	SN-LREKLR	LEIAPGKLV	DRKISFTKLR	LFPKKILFLR	QGGKIGDYIV	49
A. p.		SSFPFREIKK	QSPITHIGV	CGRNWAYLE	HSPKIDDL	VRTFNISDYL	100
H. d.	LbgB	SSFPFREIKK	QSNIEIGV	CGRNWAYLE	KNAYLDC	VRTFNISDYL	99
A. p.		ACGKCLAKEQ	YDVIDPTT	LRNRDLFLR	MINAKPIGY	PKLDKIFIA	150
H. d.	LbgB	KCGMKLANQK	YDVIDPTA	LRNRDLFLR	MINAKPIGY	PKLDKIDF	149
A. p.		SVQNERCPFA	QIKKALELA	QPTDIDTQV	MPKDNPARA	IKYLSGRRI	200
H. d.	LbgB	NIKWKKHS	TVKRALSL	QLNHDSV	MLNKDSEH	IKYLSRCL	199
A. p.		RHFIALNLFG	ASGRPFDD	KVTSLLEFLN	KISVFPILL	TFFVTPKLY	250
H. d.	LbgB	DSFIALNLFG	ASGRPFDD	KIVELLEFLK	KVTIKPILL	TFFAIARLK	249
A. p.		QIASRPNVE	MYEIQVFD	TIELRHSV	LISPDTSVH	IAELPKKLE	300
H. d.	LbgB	KIACHPEVF	LYEIKVFD	TIELRFADL	VISPDTSVH	LAELPKKLE	299
A. p.		GYYSDEQNF	IRWPNKKA	THLRPKQSV	QOLDFNRLQ	EWLN	344
H. d.	LbgB	AYYSDEQNF	IRWPNNLV	THLRPEHNI	NEINISECA	EWLN	343

FIGURE 6 Comparison of the deduced amino acid sequences of the LbgB proteins from *A. pleuropneumoniae* (this study) and *H. ducreyi* (Stevens *et al.*, 1997) by using the Clustal alignment program of GeneWorks. Identical residues are boxed. The mini-Tn10 insertions are indicated with arrowheads for mutants CG3 and CG5.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (OGP0003428 to M. J.). C. G. and S. R. are the recipient of a studentship from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche. We are greatly indebted to V. de Lorenzo (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain) for the generous gift of plasmid pLOF/Km and to M. Gottschalk (Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada) for supply of monoclonal antibodies 5.1 G8 F10 and 1.5 C4 F4. We are grateful to Serge Sénéchal for his expertise in flow cytometry.

REFERENCES

- Alfa M.J. and DeGagne P. (1997). Attachment of *Haemophilus ducreyi* to human foreskin fibroblasts involves LOS and fibronectin. *Microbial Pathogen.* **22**: 39-46.
- 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.
- 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* (New York: Wiley interscience).
- 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.
- Coyne M.J.J., Russell K.S., Coyle C.L., and Goldberg J.B. (1994). The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of a complete lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* **176**: 3500-3507.
- Daigle F., Fairbrother J.M., and Harel J. (1995). Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect. Immun.* **63**: 4924-4927.
- Dasgupta T., de Kievit T.R., Masoud H., Altman E., Richards J.C., Sadovskaya I., Speert D.P., and Lam J.S. (1994). Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotype 03, 05, and 06. *Infect. Immun.* **62**: 809-817.

- de Lorenzo V. and Timmis K.N. (1994). Analysis and construction of stable phenotype in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived mini-transposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.
- Devereux J., Haeberli P., and Smithies O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12**: 387-385.
- Fry B.N., Korolik V., ten Brinke J.A., Pennings M.T.T., Zalm R., Teunis B.J.J., Coloe P.J., and van der Zeijst B.A.M. (1998). The lipopolysaccharide biosynthesis locus of *Campylobacter jejuni* 81116. *Microbiol.* **144**: 2049-2061.
- Gibson B.W., Campagnari A.A., Melaugh W., Phillips N.J., Apicella M.A., Grass S., Wang J., Palmer K.L., and Munson J.R.S. (1997). Characterization of a transposon Tn916-generated mutant of *Haemophilus ducreyi* 35000 defective in lipooligosaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179**: 5062-5071.
- Haesebrouck F., Chiers K., Van Overbeke I., and Ducatelle R. (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* **58**: 238-249.
- Heinrichs D.E., Monteiro M.A., Perry M.B., and Whitfiel C. (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.
- Heinrichs D.E., Yethon J.A., and Whitfield C. (1998). Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **30**: 221-232.
- 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.

- Hong M. and Payne S.M. (1997). Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Mol. Microbiol.* **24**: 779-791.
- Hood D.W., 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.
- Inzana T.J. (1991). Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogen.* **11**: 305-316.
- Jacques M. (1996). Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **4**: 408-410.
- Jacques M., Rioux S., Paradis S.-É., Bégin C., and Gottschalk M. (1996). Identification of two core types in lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* representing serotypes 1 to 12. *Can. J. Microbiol.* **42**: 855-858.
- Kahler C.M., Carlson R.W., Rahman M.M., Martin L.E., and Stephens D.S. (1996). Inner core biosynthesis of lipooligosaccharide (LOS) in *Neisseria meningitidis* serogroup B: identification and role in LOS assembly of the α 1,2 N-acetylglucosamine transferase (RfaK). *J. Bacteriol.* **178**: 1265-1273.
- Klena J.D., Pradel E., and Schnaitman C.A. (1992). Comparison of lipopolysaccharide biosynthesis genes *rfaK*, *rfaL*, *rfaY*, and *rfaZ* of *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **174**: 4746-4752.
- Lairini K., Stenbaek E., Lacouture S., and Gottschalk M. (1995). Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.* **46**: 369-381.

- Lesse A.J., Campagnari A.A., Bittner W.E., and Apicella M.A. (1990). Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine - sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol.* **126**: 109-117.
- Mäkelä P.H. and Stocker B.A.D. (1984). Genetics of lipopolysaccharide. In *Handbook of endotoxin*, Rietschel E.T. (Amsterdam: Elsevier Biomedical Press), pp. 59-137.
- Nicolet J. (1992). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In *Diseases of swine*, Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., and Taylor D.J. (Ames: Iowa State University Press), pp. 401-408.
- Nikaido H. (1976). Outer membrane of *Salmonella typhimurium* transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. *Biochem. Biophys. Acta.* **433**: 118-132.
- Paradis S.-É., Dubreuil D., Rioux S., and Jacques M. (1994). High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect. Immun.* **62**: 3311-3319.
- Pitcher D.G., Saunderson N.A., and Owen R.J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**: 151-156.
- Porat R., Mosseri R., Kaplan E., Johns M.A., and Shibolet S. (1992). Distribution of polysaccharide side chains of LPS determines resistance of *Escherichia coli* to the bactericidal activity of serum. *J. Infect. Dis.* **165**: 953-956.
- Raetz C.R.H. (1996). Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M.,

- and Umbarger H.E. (Washington, D. C.: American Society for Microbiology), pp. 1035-1063.
- Reeves P.R., Hobbs M., Valvanò M.A., Skurnik M., Whitfield C., Coplin D., Kido N., Klena J., Maskell D., Raetz R.H., and Rick P.D. (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**: 495-503.
- Rioux S., Bégin C., Dubreuil J.D., and Jacques M. (1997). Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr. Microbiol.* **35**: 139-144.
- Schnaitman C.A. and Klena J.D. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 655-682.
- Stevens M.K., Cope L.D., Radolf J.D., and Hansen E.J. (1995). A system for generalized mutagenesis of *Haemophilus ducreyi*. *Infect.Immun.* **63**: 2976-2982.
- Stevens M.K., Klesney-Tait J., Lumbley S., Walters K.A., Joffe A.M., Radolf J.D., and Hansen E.J. (1997). Identification of tandem genes involved in lipooligosaccharide expression by *Haemophilus ducreyi*. *Infect.Immun.* **65**: 651-660.
- Tang H.B., DiMango E., Bryan R., Gambello M., Iglewski B.H., Goldberg J.B., and Prince A. (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in neonatal mouse model of infection. *Infect.Immun.* **64**: 53-57.
- Tascón R.I., Rodríguez-Ferri E.F., Gutiérrez-Martín C.B., Rodríguez-Barbosa 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., Vásquez-Boland J.A., Gutiérrez-Martín C.B., Rodríguez-Barbosa I., and Rodríguez-Ferri E.F. (1996). Virulence factors in the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiol. SEM* **12**: 171-184.
- Tascón R.I., Vásquez-Boland J.A., Gutiérrez-Martín C.B., Rodríguez-Barbosa J.I., and Rodríguez-Ferri E.F. (1994). The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol. Microbiol.* **14**: 207-216.
- Tascón R.I., Vásquez-Boland J.A., Gutiérrez-Martín C.B., Rodríguez-Barbosa J.I., and Rodríguez-Ferri E.F. (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* does not require urease activity to produce acute swine pleuropneumonia. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**: 53-57.
- Virji M., Makepeace K., Peak I.R.A., Ferguson D.J.P., Jennings M.P., and Moxon E.R. (1995). Opc- and pilus-dependent interaction of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation of surface polysaccharides. *Mol. Microbiol.* **18**: 741-754.
- Ward C.K. and Inzana T.J. (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.

IV. DISCUSSION

La pathogénie des bactéries responsables d'infections pulmonaires ne peut débuter sans l'établissement du micro-organisme au niveau des voies respiratoires. L'adhérence consiste en une interaction spécifique entre le micro-organisme et la cellule de l'hôte, et ce à l'aide d'adhésines et de récepteurs spécifiques. Une fois en contact avec le tissu cible, la bactérie peut alors se multiplier et exercer ses effets pathogènes sur l'hôte par la synthèse de différentes molécules toxiques²². Il a été déterminé depuis longtemps qu'*A. pleuropneumoniae* est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine⁸⁷; par contre, sa pathogénie n'est pas complètement résolue. Notre laboratoire a démontré que les lipopolysaccharides (LPS) de cette bactérie étaient impliqués dans l'adhérence aux cellules du tractus respiratoire porcin^{7, 57, 95}. D'ailleurs, un mutant acapsulé d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 adhère 20 fois plus aux cellules de l'hôte que la souche mère capsulée, ce qui indique que la capsule masque partiellement les adhésines présentes à la surface de la bactérie (Annexe 3). Nous savons également que la partie lipidique du LPS n'est pas impliquée dans l'adhérence⁹⁵. Récemment, nous avons observé à l'aide de mutants isogéniques que la partie du LPS impliquée dans l'adhérence semblait être le noyau oligosaccharidique et non l'antigène-O (Annexe 2).

Mon projet de maîtrise avait pour but d'étudier le rôle du noyau oligosaccharidique du LPS dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcin et d'identifier certains gènes impliqués dans sa biosynthèse. Pour atteindre nos objectifs, nous avons produit des mutants au niveau de la biosynthèse du noyau oligosaccharidique par la technique de mutagenèse à l'aide du transposon mini-Tn10 mise sur pied par Tascón et coll. spécifiquement pour *A. pleuropneumoniae*¹²⁵.

Suite à la mutagenèse, cinq mutants ont été retenus selon le profil électrophorétique du noyau oligosaccharidique sur gel tricine (Annexe 1, Figure 1). Les trois souches figurant dans l'article principal (CG1, CG3 et CG5) ont clairement été identifiées comme étant mutées au niveau du noyau oligosaccharidique et les travaux de séquençage ont permis de le confirmer. Par contre, pour les deux autres mutants (CG2 et CG4) la modification au niveau du noyau était moins évidente, seule une petite bande supplémentaire a attiré notre attention. Par la suite, les résultats obtenus par immunobuvardage et cytofluorométrie à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène-O (Annexe 1, Figures 2 et 5) ont indiqué que ces mutants ne pouvaient être catégorisés avec les mutants CG1, CG3 et CG5, mais plutôt avec les mutants rugueux (sans antigène-O) précédemment obtenus dans notre laboratoire (Annexe 2). L'analyse du séquençage de l'ADN adjacent au site d'insertion du mini-Tn10 des mutants CG2 et CG4 a permis de mieux les caractériser. Pour le mutant CG2, l'ORF dans lequel était inséré le mini-Tn10 n'avait qu'une faible homologie avec une protéine d'*A. actinomycetem-comitans* dont la fonction n'a pas encore été identifiée. Par contre, l'analyse génétique du mutant CG4 a montré une homologie avec la protéine RfbP (undécaprényl-phosphate galactose-phosphate transférase) de *Salmonella* et d'*Haemophilus influenzae*, impliquée dans la biosynthèse de l'antigène-O. Cette protéine est importante dans la formation de l'antigène-O puisqu'elle agit sur la liaison du premier galactose au transporteur lipidique (UndP)¹⁰⁵; la perte de cette fonction inhibe la formation de l'antigène-O et aucun sucre ne peut se lier au complexe noyau-lipide A préformé¹²⁰. Tout porte à croire que les bandes supplémentaires observées au niveau du noyau oligosaccharidique de ces deux mutants après migration sur un gel tricine ne sont probablement que les bandes normalement présentes dans un noyau oligosaccharidique de type I⁵⁹, mais qui étaient plus difficilement distin-

guables sur gel chez la souche mère 4074 Nal^r (Annexe 1, Figure 1). Le point que nous ne pouvons nous expliquer pour le moment est la diminution de l'adhérence du mutant CG4. Lors des travaux précédents (Annexe 2), toutes les souches présentant un phénotype rugueux adhéraient de façon similaire à la souche mère. Alors en quoi ce mutant diffère-t-il des autres? Une étude plus approfondie de la structure du LPS du mutant CG4 et une caractérisation moléculaire des autres mutants rugueux permettront éventuellement de fournir une réponse à cette question.

Plusieurs chercheurs ont établi un lien direct entre la résistance à l'activité bactéricide du sérum et le LPS chez plusieurs bactéries Gram-négatif^{23, 49, 102}. Chez *A. pleuropneumoniae*, Ward et Inzana¹³²⁻¹³⁴ ont déterminé que le LPS ainsi que la capsule polysaccharidique joueraient un rôle important dans la résistance à l'effet bactéricide du complément. Tous nos mutants ont été testés pour cette propriété et quatre d'entre eux ont démontré une résistance égale à celle de la souche mère. Le mutant CG4 (n'ayant plus d'antigène-O) a démontré une baisse drastique de sa résistance, correspondant aux résultats obtenus avec les autres mutants rugueux (Annexe 2). Mais contrairement à ce que nous nous attendions, le deuxième mutant n'ayant plus l'antigène-O (CG2) est demeuré résistant, ce qui soulève de nouvelles questions concernant la nature de sa mutation. Nous serions portés à croire que la résistance au sérum de ce mutant pourrait être attribuée à la présence de la capsule comme l'ont suggérée Inzana et coll.⁵¹ et Ward et coll.^{132, 134}. Par contre, nous avons obtenu un mutant complètement acapsulé (Annexe 3) présentant un LPS complet qui était résistant à l'attaque du complément. Ce résultat contredit ceux obtenus par Inzana et coll., mais peut être attribué à la différence des souches utilisées (sérotipe 1 vs sérotipe 5). De plus, notre mutant acapsulé a été obtenu suite à la mutagenèse à l'aide du mini-Tn10, ce

qui signifie que la mutation n'affecte qu'un seul gène, identifié dans notre étude comme étant *cpxC*. Les mutants exempts de capsule qui ont servi aux études de résistance au sérum de Ward et coll. ont été obtenus par mutagenèse chimique⁵⁵ ou spontanée⁵²; deux méthodes pouvant introduire plus d'une mutation. Ainsi, le mutant CG2, quoiqu'ayant un phénotype rugueux, présente une mutation qui n'affecte pas sa résistance au sérum.

Les noyaux oligosaccharidiques des mutants CG3 et CG5 possédaient une mobilité électrophorétique identique sur gel tricine et ces mutants démontraient une baisse similaire de leur adhérence aux cellules des voies respiratoires. L'analyse génétique de l'ADN adjacent au site d'insertion du mini-Tn10 a permis d'identifier un gène codant pour une protéine homologue à la protéine LbgB d'*H. ducreyi* impliquée dans la formation du noyau oligosaccharidique, soit une D-glycéro-D-manno-heptosyl transférase¹²², un sucre retrouvé dans le noyau oligosaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1². De plus, la protéine LbgB d'*H. ducreyi* présente une similitude avec la protéine RfaK d'*E. coli*, protéine impliquée dans la ramification du troisième hexose du noyau externe avec un N-acétyl-glucosamine (GlcNAc, R6 sur la Figure 1, p. 15)¹⁰⁵; sucre qui ne se retrouve pas dans le noyau oligosaccharidique d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Par contre, dans une récente revue sur la génétique des LPS d'*E. coli* et de *Salmonella*, Heinrichs et coll.⁴⁵ ont subdivisé RfaK en deux protéines distinctes: WaaK ayant la même fonction (GlcNAc transférase) et WaaU, une heptosyl transférase qui aurait une fonction similaire à LbgB d'*H. ducreyi*. Pour ce qui est du gène interrompu par le mini-Tn10 du mutant CG1, nous avons découvert qu'il codait pour une protéine ayant des homologues avec les protéines WlaE (29%) et WlaC (25%) de *Campylobacter jejuni*³⁵ et la protéine WaaB (27%) de *S. typhimurium*⁴³. Dans les trois cas, il s'agit de protéines impliquées dans

le transfert de galactose ou de GalNAc. Par contre, WaaB agit sur la ramification de l'hexose I du noyau externe⁴³, tandis que les protéines WlaC et WlaE agissent sur l'élongation de la chaîne principale. Considérant que le mutant CGI possède toujours l'antigène-O malgré la mutation, nous croyons que l'activité du gène présent chez *A. pleuropneumoniae* doit être davantage semblable à celle retrouvée chez *S. typhimurium*. De plus, Mäkelä et coll.⁷³ ont déterminé qu'une mutant au niveau du gène *rfaB* (*waaB*) n'affecte pas l'activité enzymatique des protéines responsables de la liaison de l'antigène-O chez *Salmonella*.

Les gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS d'*A. pleuropneumoniae* ne sont pas connus. Nous ne savons ni leur organisation, ni leur nombre. Par contre, ces gènes sont bien identifiés chez *E. coli* et *Salmonella*. Raetz et coll.¹⁰⁵ ainsi que Heinrichs et coll.⁴³⁻⁴⁵ ont étudié l'organisation des gènes impliqués dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique chez ces deux organismes. Ces gènes, au nombre de 14, forment deux opérons convergents nommés *waa*. Quelques différences mineures font que les gènes d'*E. coli* et, à plus petite échelle, leur organisation, sont différents de ceux de *Salmonella*. De leur côté, Hood et coll.⁵⁰ ont étudié les gènes impliqués dans la biosynthèse du LOS et leur organisation chez *H. influenzae*. Ils ont déterminé que ces gènes ne sont pas regroupés sous forme d'opéron, mais plutôt distribués sur tout le chromosome. De plus, les gènes chez *H. influenzae* ne portent pas le nom *waa*, mais ont une nomenclature bien à eux. En ce qui concerne les gènes d'*H. ducreyi*, il semble que les gènes forment de petits opérons comprenant aussi des gènes n'étant pas impliqués dans la biosynthèse du LOS¹²². De même chez les meningocoques, l'organisation génétique semble privilégier la dispersion sur le chromosome avec quelques petits regroupements de 2 ou 3 gènes, sans pourtant former de longs

opérons⁶⁵. Pour ce qui est de l'organisation des gènes impliqués dans la synthèse de l'antigène-O, il semble qu'ils soient généralement regroupés sous forme de petits opérons que ce soit chez *E. coli*, *Salmonella* ou encore chez les meningocoques. La question est maintenant de savoir dans quelle catégorie se classe *A. pleuropneumoniae*.

L'analyse génétique d'*A. pleuropneumoniae* a nécessité le séquençage de grands fragments d'ADN de parts et d'autres du site d'insertion du mini-Tn10. La caractérisation génétique des mutants CG1, CG3 et CG5 (dont le mini-Tn10 se situait à l'intérieur du même fragment de restriction *EcoRI*) a permis d'identifier deux gènes associés (*lbgB* et *lbgA*) retrouvés chez *H. ducreyi*. Près de 7000 paires de bases (pb) ont été séquencées et seulement 1710 pb à une extrémité codaient pour ces deux gènes. Par contre, à l'autre extrémité (non-affectée par le mini-Tn10), nous avons identifié un segment (971 pb) d'un cadre de lecture ouvert (ORF) codant pour une protéine homologue à la transcétolase d'*H. influenzae* (87% de similarité). Cette protéine est impliquée dans le cycle des pentoses monophosphates et non directement dans la biosynthèse du LPS. De plus, un segment d'ADN situé entre les deux mentionnés ci-haut, présentait une faible homologie avec les protéines WlaC et WlaE de *C. jejuni* et WaaB de *S. typhimurium*⁴³. Selon ces résultats, nous pouvons déduire que les gènes impliqués dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique se distribuent sur le chromosome en petits groupes de quelques gènes comme c'est le cas chez *H. ducreyi*.

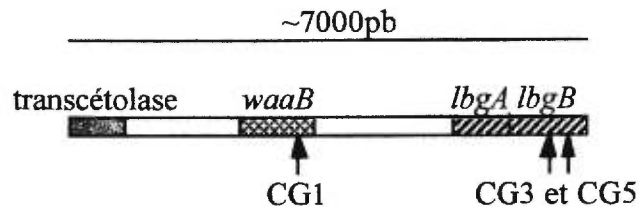


Figure 1. Organisation des gènes identifiés dans le segment de restriction *EcoRI* et position de l'insertion du mini-Tn10 pour les mutants CG1, CG3 et CG5.

L'organisation des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antigène-O a été évaluée grâce au séquençage des mutants CG2 et CG4. Le séquençage du mutant CG2 a permis d'identifier quatre ORF sur 3112 pb analysées n'ayant d'homologie qu'avec des protéines non-identifiées d'*A. actinomycetemcomitans*. Par contre, lors du séquençage du mutant CG4, trois ORF ont été identifiés sur les 3538 pb séquencées. Le premier ORF de 798 pb possède une homologie avec le gène *rfbF* de *Shigella flexneri*; le deuxième ORF (906 pb) code pour une protéine homologue à une rhamnosyl transférase d'*A. actinomycetemcomitans* et de *S. typhimurium* (*rfbN*); quant à l'ORF dans lequel était inséré le mini-Tn10, il code pour une protéine homologue à la protéine RfbP d'*H. influenzae* et de *Salmonella*. L'organisation des gènes impliqués dans la synthèse de l'antigène-O semble donc être sous forme d'opérons. Des études génétiques plus approfondies seront nécessaires afin de préciser l'organisation des gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS chez *A. pleuropneumoniae*.

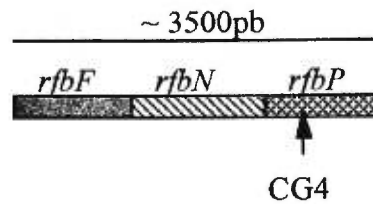


Figure 2. Organisation du deuxième fragment *EcoRI*, indiquant les gènes identifiés et la position du mini-*Tn10* pour le mutant CG4.

Le rôle du noyau oligosaccharidique dans l'adhérence de certaines bactéries à Gram-négatif a déjà été mis en évidence. Tang et coll.¹²⁴ ont démontré qu'une souche de *Pseudomonas aeruginosa algC* produisant un noyau oligosaccharidique incomplet²⁰ adhérerait moins que la souche mère à plusieurs types de lignées cellulaires. Virji et coll.¹³¹ de leur côté ont déterminé que le LOS de *Neisseria meningitidis* était important pour la colonisation du nasopharynx chez l'humain. Chez *Haemophilus ducreyi*, le LOS est responsable de son attachement aux fibroblastes de prépuces humains¹ et une mutation dans un gène impliqué dans la biosynthèse du LOS produit une baisse marquée de l'adhérence de ce micro-organisme aux cellules de l'hôte⁴⁰. Par contre, chez *A. pleuropneumoniae* seul le rôle du LPS a vraiment été établi dans l'adhérence^{7, 57, 95}. Récemment, nous avons observé une baisse de l'adhérence aux cellules du tractus respiratoire porcin avec une souche d'*A. pleuropneumoniae* ayant une mutation au niveau du noyau oligosaccharidique (Annexe 2). La mutation affectait un gène (*galU*) impliqué dans la formation d'UDP-galactose dont le rôle n'est probablement pas exclusif à la biosynthèse du LPS. Nos mutants CG3 et CG5 sont particulièrement intéressants puisque leur mutation semble être localisée dans un gène directement impliqué dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique. La faible baisse d'adhérence que nous observons est probablement due à la perte de l'hexose pour le transfert duquel code le gène

muté. L'intégrité du noyau oligosaccharidique semble essentiel pour que l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* soit complète.

V. CONCLUSION

Ce travail apporte de nouvelles connaissances sur le rôle du noyau oligosaccharidique dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* et sur la génétique de cette bactérie. Ainsi, l'obtention de mutants a permis d'identifier des gènes importants (*lbgB*, *lbgA* et *waaB*) impliqués dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique. De plus, ces mutants ont permis de mieux comprendre le processus d'adhérence de ce micro-organisme aux cellules du tractus respiratoire porcin. Nos résultats confirment que l'adhésine d'*A. pleuropneumoniae* semble être le noyau oligosaccharidique du LPS et indiquent que la perte d'un heptose, possiblement en ramification au niveau du noyau externe, diminue significativement l'adhérence. Des analyses sont présentement en cours afin de déterminer la structure du noyau oligosaccharidique du sérotype 1 d'*A. pleuropneumoniae*.

Des travaux supplémentaires seront nécessaires afin de connaître complètement la génétique des LPS chez *A. pleuropneumoniae* et d'identifier précisément les résidus du noyau oligosaccharidique impliqués dans l'adhérence.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. **Alfa, M.J. and P. DeGagne.** 1997. Attachment of *Haemophilus ducreyi* to human foreskin fibroblasts involves LOS and fibronectin. *Microbial Pathogen.* **22**:39-46.
2. **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.
3. **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**:411-416.
4. **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. Endotox. Res.* **4**:53-65.
5. **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.
6. **Bélanger, M., C. Bégin, and M. Jacques.** 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobine. *Infect. Immun.* **65**:656-662.
7. **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.
8. **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.

9. **Bélangier, 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.
10. **Belunis, C.J. and C.R.H. Raetz.** 1992. Biosynthesis of endotoxin: purification and catalytic properties of 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **267**:9988-9997.
11. **Bertram, T.A.** 1985. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. Vet. Pathol. **22**:598-609.
12. **Bertram, T.A.** 1986. Intravascular macrophages in lungs of pigs infected with *Haemophilus pleuropneumoniae*. Vet. Pathol. **23**:681-691.
13. **Bertram, T.A.** 1988. Pathobiology of acute pulmonary lesions in swines infected with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. Can. Vet. J. **29**:574-577.
14. **Borr, J.D., D.A.J. Ryan, and J.I. MacInnes.** 1991. Analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related organisms by DNA-DNA hybridization and restriction endonuclease fingerprinting. Int. J. Syst. Bact. **41**:121-129.
15. **Bossé, J.T. and J.L. MacInnes.** 1997. Genetic and biochemical analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease. Infect. Immun. **65**:4389-4394.
16. **Byrd, W. and A.M. Hooke.** 1997. Temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* induce protection in mice. Infect. Immun. **65**:2206-2210.
17. **Byrd, W. and S. Kadis.** 1989. Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. Infect. Immun. **57**:3901-3906.

18. **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.
19. **Coote, J.G.** 1992. Structural and functional relationship among the RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **88**:137-162.
20. **Coyne, M.J.J., K.S. Russell, C.L. Coyle, and J.B. Goldberg.** 1994. The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of a complete lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* **176**:3500-3507.
21. **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.
22. **Cundell, D.R. and E. Tuomanen.** 1995. Attachment and interaction of bacteria at respiratory mucosal surfaces, p. 3-20. *In* J.A. Roth, C.A. Bolin, K.A. Brogden, F.C. Minion, and M.J. Wannemuehler (ed.), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 2 ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
23. **Dasgupta, T., T.R. de Kievit, H. Masoud, E. Altman, J.C. Richards, I. Sadovskaya, D.P. Speert, and J.S. Lam.** 1994. Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotype 03, 05, and 06. *Infect. Immun.* **62**:809-817.
24. **Deneer, H.G. and A.A. Potter.** 1989. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**:798-804.
25. **Deneer, H.G. and A.A. Potter.** 1989. Identification of maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogen.* **6**:425-432.

26. **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.Educ.Pract.Vet.* **15**:1447-1455.
27. **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.
28. **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.
29. **Frey, J.** 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* **3**:257-261.
30. **Frey, J., M. Beck, U. Stucki, and J. Nicolet.** 1993. Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene.* **123**:51-58.
31. **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.L. 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 haemolysins, cytolysins, pleurotoxins, and their genes. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1723-1728.
32. **Frey, J., R. Kuhn, J. MacInnes, and J. Nicolet.** Characterization of a novel RTX determinant in *Actinobacillus pleuropneumoniae* which is not expressed under culture conditions. Eighth European Workshop Conference on Bacterial Protein Toxin. 1997.

33. **Frey, J., L. Kuhnert, L. Villiger, and J. Nicolet.** 1996. Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins. *Res. Microbiol.* **147**:351-361.
34. **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.
35. **Fry, B.N., V. Korolik, J.A. ten Brinke, M.T.T. Pennings, R. Zalm, B.J.J. Teunis, P.J. Coloe, and B.A.M. van der Zeijst.** 1998. The lipopolysaccharide biosynthesis locus of *Campylobacter jejuni* 81116. *Microbiol.* **144**:2049-2061.
36. **Fuller, T.E., B.J. Thacker, and M.H. Mulks.** 1996. A riboflavine auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is attenuated in swine. *Infect. Immun.* **64**:4659-4664.
37. **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.
38. **Galloway, S.M. and C.R.H. Raetz.** 1990. A mutant of *Escherichia coli* defective in the first step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **265**:6394-6402.
39. **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.
40. **Gibson, B.W., A.A. Campagnari, W. Melaugh, N.J. Phillips, M.A. Apicella, S. Grass, J. Wang, K.L. Palmer, and J.R.S. Munson.** 1997. Characterization of a transposon Tn916-generated mutant of

- Haemophilus ducreyi* 35000 defective in lipooligosaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179**:5062-5071.
41. **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.
 42. **Haga, Y., S. Ogino, S. Ohashi, T. Ajito, K. Hishimoto, and T. Sawada.** 1997. Protective efficacy of an affinity-purified hemolysin vaccine against experimental swine pleuropneumonia. *J. Vet. Med. Sci.* **59**:115-120.
 43. **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.
 44. **Heinrichs, D.E., J.A. Yethon, P.A. Amor, and C. Whitfiel.** 1998. The assembly system for the outer core portion of R1- and R4-type lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. The R1 core-specific β -glucosyltransferase provides a novel attachment site for O-polysaccharides. *J. Biol. Chem.* **273**:29497-29505.
 45. **Heinrichs, D.E., J.A. Yethon, and C. Whitfield.** 1998. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **30**:221-232.
 46. **Helander, I.M., R.B. Lindner, H. Brade, K. Altmann, A.A. Lindberg, E.T. Rietschel, and U. Zähringer.** 1988. Chemical structure of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* strain I-69 Rd/b: description of a novel deep-rough mutant. *Eur. J. Biochem.* **177**:483-492.
 47. **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.
48. **Holts, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staly, and S.T. Williams.** 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 787 p. 9 ed. Williams & Wilkins, Baltimore
49. **Hong, M. and S.M. Payne.** 1997. Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Mol. Microbiol.* **24**:779-791.
50. **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.
51. **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.
52. **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.
53. **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. *Microbial Pathogen.* **10**:281-296.
54. **Inzana, T.J., J.M. Todd, and H.P. Veit.** 1993. Isolation, characterization, and evaluation of virulence and immunoprotective properties of temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Immunol. Infect. Dis.* **3**:17-22.

55. **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 vaccine. *Infect. Immun.* **61**:1682-1686.
56. **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.
57. **Jacques, M.** 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **4**:408-410.
58. **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.
59. **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.
60. **Jansen, R., J. Briaire, E.M. Kamp, A.L.J. Gielkens, and M.A. Smits.** 1993. Cloning and characterization the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-Toxin III (ApxIII) gene. *Infect. Immun.* **61**:947-954.
61. **Jansen, R., J. Briaire, E.M. Kamp, A.L.J. Gielkens, and M.A. Smits.** 1993. Structural analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-Toxin I (ApxI) operon. *Infect. Immun.* **61**:3688-3695.
62. **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.
63. **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.

64. **Jolie, R.A., M.H. Mulks, and B.J. Thacker.** 1994. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.* **38**:329-349.
65. **Kahler, C.M. and D.S. Stephens.** 1998. Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxine). *Crit. Rev. Microbiol.* **24**:281-334.
66. **Kamp, E.M., J.K. Popma, J. Anakotta, and M.A. Smits.** 1991. Identification of hemolytic and cytolytic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **59**:3079-3085.
67. **Kamp, E.M., J.K. Popma, and L.A.M.G. van Leengoed.** 1987. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the Netherland with emphasis on heterogenicity within serotype 2 and (proposal) serotype 9. *Vet. Microbiol.* **13**:249-257.
68. **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.
69. **Kilian, M., J. Nicolet, and E. Biberstein.** 1978. Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Mattews and Patterson 1962) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. *Int. J. Syst. Bact.* **28**:20-26.
70. **Komal, J.P.S. and K.R. Mittal.** 1990. Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet. Microbiol.* **25**:229-240.
71. **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 afterall! *Microbiol.* **141**:2271-2279.

72. **Liggett, A.D. and L.R. Harrison.** 1987. Sequential study of lesion development in experimental haemophilus pleuropneumonia. *Res. Vet. Sci.* **42**:204-221.
73. **Mäkelä, P.H. and B.A.D. Stocker.** 1984. Genetics of lipopolysaccharide, p. 59-137. *In* E.T. Rietschel (ed.), Handbook of endotoxin, vol. 1. Chemistry of endotoxin. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
74. **Mandrell, R.E. and M.A. Apicella.** 1993. Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS immunobiology. *Immunobiol.* **187**:382-402.
75. **Mattew, P.R.J. and I.H. Pattison.** 1961. The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. *J. Comp. Pathol.* **71**:44-52.
76. **Maudsley, J.R., S. Kadis, and W.R. Mayberry.** 1986. Isolation, purification, and partial characterization of a lipopolysaccharide from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **51**:501-506.
77. **Meier-Dieter, U.K. Barr, R. Starman, L. Hatch, and P.D. Rick.** 1992. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli rfe* gene involved in the synthesis of enterobacterial common antigen. Molecular cloning of the *rfe-rff* gene cluster. *J. Biol. Chem.* **267**:746-753.
78. **Melaugh, W., N.J. Phillips, A.A. Campagnari, M.V. Tullius, and B.W. Gibson.** 1994. Structure of the major oligosaccharide from the lipooligosaccharide of *Haemophilus ducreyi* strain 35000 and evidence for additional glycoforms. *Biochem.* **33**:13070-13078.
79. **Mengin-Lecreulx, D. and J. van Heijenoort.** 1994. Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and *N*-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli* : characterization of the *glmU* gene product as a bifunctional enzyme

- catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-*N*-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* **176**:5788-5795.
80. **Mittal, K.R., S. Bourdon, and R. Higgins.** 1998. Évolution de la distribution des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* provenant de porcs malades au Québec. *Méd. Vét. Québec.* **28**:91-92.
81. **Mittal, K.R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1983. Detection of type-specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae*-infected pigs by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **18**:1355-1357.
82. **Mittal, K.R., R. Higgins, and S. Larivière.** 1983. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **18**:1351-1354.
83. **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.
84. **Negrete-Abascal, E., V.R. Tenorio, J.J. Serrano, C. Garcia, and M. de la Garza.** 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.* **58**:83-86.
85. **Nicolet, J.** 1985. *Haemophilus pleuropneumoniae* bacteriology and epidemiology, p. 7-11. In R.A. Schultz (ed.), *Compendium of swine Haemophilus pleuropneumoniae*. Proc. Am. Assoc. Swine Pract.
86. **Nicolet, J.** 1990. Overview of the virulence attributes of the HAP-group of bacteria. *Can. J. Vet. Res.* **54**:S12-S15.
87. **Nicolet, J.** 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, p. 401-408. In A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire, and D.J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*, 7 ed. Iowa State University Press, Ames

88. **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.
89. **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.
90. **Nielsen, R.** 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet. Scand.* **27**:453-455.
91. **Nielsen, R.** 1986. Serology of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtype a and b. *Acta Vet. Scand.* **27**:49-58.
92. **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.
93. **Niven, D.F. and M. Lévesque.** 1988. V-factor dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008/76). *Int. J. Syst. Bact.* **38**:319-320.
94. **Paradis, S.-É., D. Dubreuil, and M. Jacques.** 1996. Examination of surface polysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 grown under iron-restricted conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**:201-206.
95. **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.
96. **Park, J.T.** 1987. Murein synthesis, p. 663-671. *In* F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and E. Umberger (ed.),

Escherichia coli and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, vol. 1. American Society for Microbiology, Washinton, D. C.

97. **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.
98. **Paulsen, I.T., A.M. Beness, and J.M.H. Saier.** 1997. Computer-based analysis of the proteins constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiol.* **143**:2685-2699.
99. **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. *Serodiag. Immunother. Infect. Dis.* **4**:299-308.
100. **Phillips, N.J., M.A. Apicella, J.M. Griffiss, and B.W. Gibson.** 1993. Structural studies of the lipopolysaccharides from *Haemophilus influenzae* type B Strain A2. *Biochem.* **32**:2003-2012.
101. **Pohl, S., H.U. Bertschinger, W. Frederiksen, and W. Mannheim.** 1983. Transfert of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella haemolitica*-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. Bact.* **33**:510-514.
102. **Porat, R., R. Mosseri, E. Kaplan, M.A. Johns, and S. Shibolet.** 1992. Distribution of polysaccharide side chains of LPS determines resistance of *Escherichia coli* to the bactericidal activity of serum. *J. Infect. Dis.* **165**:953-956.

103. **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.
104. **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.
105. **Raetz, C.R.H.** 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles, p. 1035-1063. *In* F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2 ed, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
106. **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. *Nucl. Acids Res.* **19**:3811-3819.
107. **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.
108. **Ray, B.L., G. Painter, and C.R.H. Raetz.** 1984. The biosynthesis of gram-negative endotoxin: formation of lipid A disaccharides from monosaccharide precursors in extracts of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**:4852-4859.
109. **Reeves, P.R., M. Hobbs, M.A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, R.H. Raetz, and P.D. Rick.** 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**:495-503.

110. **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.
111. **Rietschel, E.T. and H. Brade.** 1992. Bacterial endotoxins. *Sci. Am.* **267**:54-61.
112. **Rioux, S., C. Bégin, J.D. Dubreuil, and M. Jacques.** 1997. Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr. Microbiol.* **35**:139-144.
113. **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.* **20**:73-74.
114. **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.
115. **Roncero, C. and M. Casaban.** 1992. Genetic analysis of the genes involved in the synthesis of lipopolysaccharide core in *E. coli* K-12: three operons in the *rfa* locus. *J. Bacteriol.* **174**:3250-3260.
116. **Rosendal, S. and D.A. Boyd.** 1982. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **16**:840-843.
117. **Rosendal, S. and J.I. MacInnes.** 1990. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* **51**:711-717.
118. **Rycroft, A.N. and J.M. Cullen.** 1990. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine. *Am. J. Vet. Res.* **51**:1449-1453.

119. **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.
120. **Schnaitman, C.A. and J.D. Klena.** 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:655-682.
121. **Shope, R.E.** 1964. Porcine contagious pleuropneumonia I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. Exp. Med.* **119**:357-368.
122. **Stevens, M.K., J. Klesney-Tait, S. Lumbley, K.A. Walters, A.M. Joffe, J.D. Radolf, and E.J. Hansen.** 1997. Identification of tandem genes involved in lipooligosaccharide expression by *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **65**:651-660.
123. **Stevenson, G., B. Neal, D. Liu, M. Hobbs, N.H. Packer, M. Batley, J.W. Redmond, L. Lindquist, and P. Reeves.** 1994. Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. *J. Bacteriol.* **176**:4144-4156.
124. **Tang, H.B., E. DiMango, R. Bryan, M. Gambello, B.H. Iglewski, J.B. Goldberg, and A. Prince.** 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun.* **64**:53-57.
125. **Tascón, R.I., E.F. Rodríguez-Ferri, C.B. Gutiérrez-Martín, I. Rodríguez-Barbosa, P. Berche, and J.A. Vázquez-Boland.** 1993. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. *J. Bacteriol.* **175**:5717-5722.
126. **Tascón, R.I., J.A. Vázquez-Boland, C.B. Gutiérrez-Martín, I. Rodríguez-Barbosa, and E.F. Rodríguez-Ferri.** 1996. Virulence factors in the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiol. SEM.* **12**:171-184.

127. **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.
128. **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.
129. **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.
130. **Utera, V. and C. Pijoan.** 1991. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet. Rec.* **128**:357-358.
131. **Virji, M., K. Makepeace, I.R.A. Peak, D.J.P. Ferguson, M.P. Jennings, and E.R. Moxon.** 1995. Opc- and pilus-dependent interaction of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation of surface polysaccharides. *Mol. Microbiol.* **18**:741-754.
132. **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.
133. **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.

134. **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.
135. **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.
136. **Welch, R.A.** 1991. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**:521-528.
137. **White, K.A. and C.R.H. Raetz.** 1995. Characterization of a mono-functional Kdo transferase in extracts of *Haemophilus influenzae*. *FASEB J.* **9**:A1376.
138. **Whiteman, C.E. and R.D. Glock.** 1995. Pleuropneumonia, p. 50-53. In A.A. Bickford, and K.J. Schwartz (ed.), *Swine Disease Manual*. Pioneer Impressions inc., Fort Collins, Colorado
139. **Whitfield, C.** 1995. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* **3**:178-185.
140. **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.

VII. ANNEXES

Annexe 1

Résultats additionnels

Identification de mutants ne correspondant pas à des mutations au niveau du noyau oligosaccharidique.
Les mutants suivis d'un astérisque (*) sont des résultats additionnels qui n'apparaissent pas dans l'article principal.

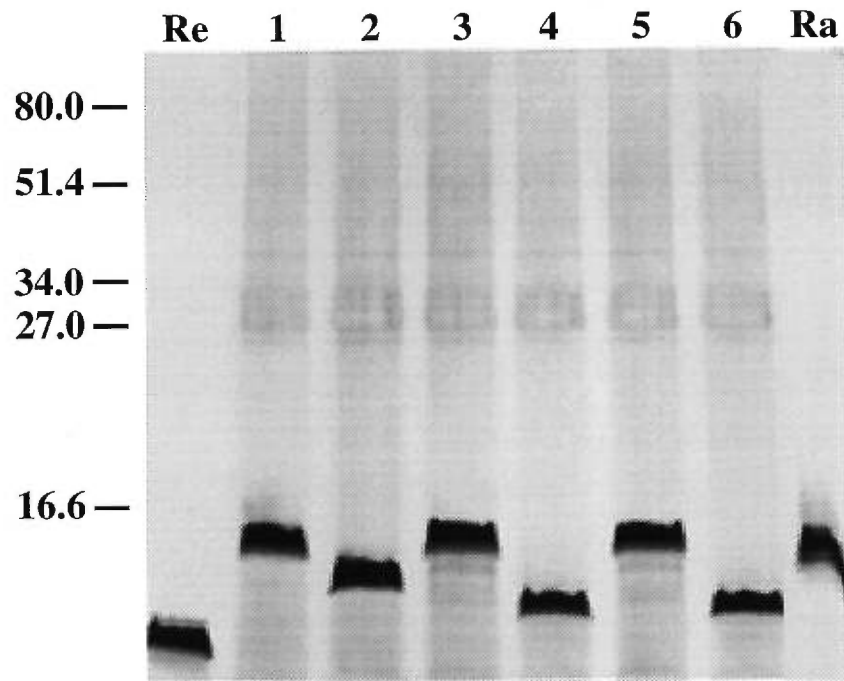


Figure 1. Gel tricine-SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent de préparations de bactéries entières traitées à la protéinase K d'*A. pleuropneumoniae* et des mutants isogéniques. Puits 1, souche mère 4074 Nal^r; puits 2, mutant CG1; puits 3, mutant CG2*; puits 4, mutants CG3; puits 5, mutants CG4*; puits 6, mutant CG5. Les LPS Ra et Re de *Salmonella typhimurium* servent de comparaison. Les standards de poids moléculaires (kilodaltons) sont indiqués sur la gauche.

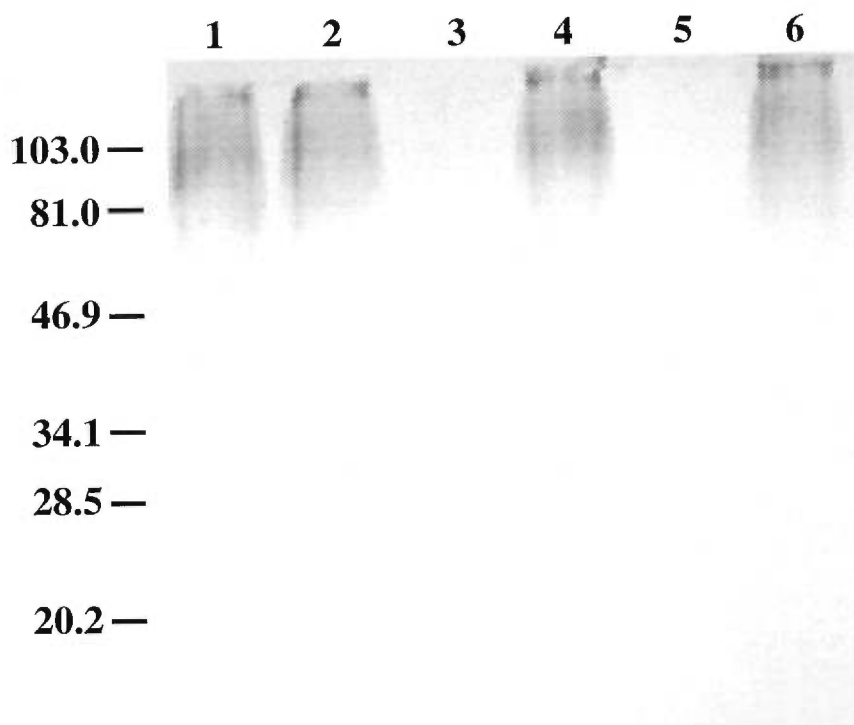


Figure 2. Immunobuvardage de préparations de bactéries entières traitées à la protéinase K d'*A. pleuropneumoniae* et des mutants isogéniques. La membrane a été révélée à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène-O d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Puits 1, souche mère 4074 Nal^r; puits 2, mutant CG1; puits 3, mutant CG2*; puits 4, mutants CG3; puits 5, mutants CG4*; puits 6, mutant CG5. Les standards de poids moléculaires (kilodaltons) sont indiqués sur la gauche.

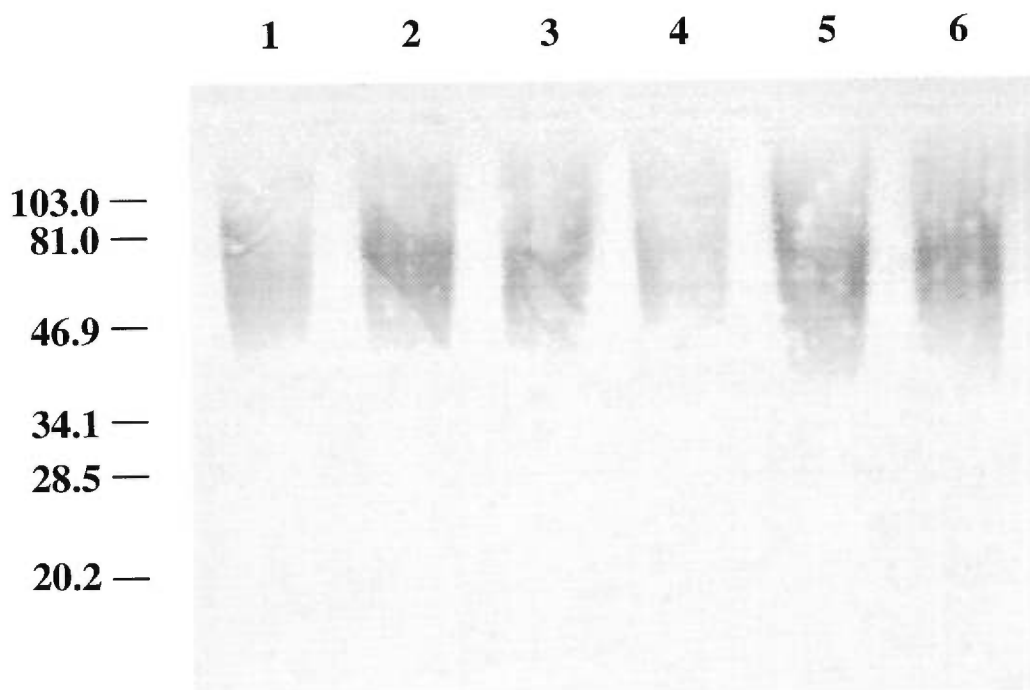


Figure 3. Immunobuvardage de préparations de bactéries entières traitées à la protéinase K d'*A. pleuropneumoniae* et des mutants isogéniques. La membrane a été révélée à l'aide d'un anticorps monoclonaal dirigé contre un épitope de la capsule d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Puits 1, souche mère 4074 Nal^r; puits 2, mutant CG1; puits 3, mutant CG2*; puits 4, mutants CG3; puits 5, mutants CG4*; puits 6, mutant CG5. Les standards de poids moléculaires (kilodaltons) sont indiqués sur la gauche.

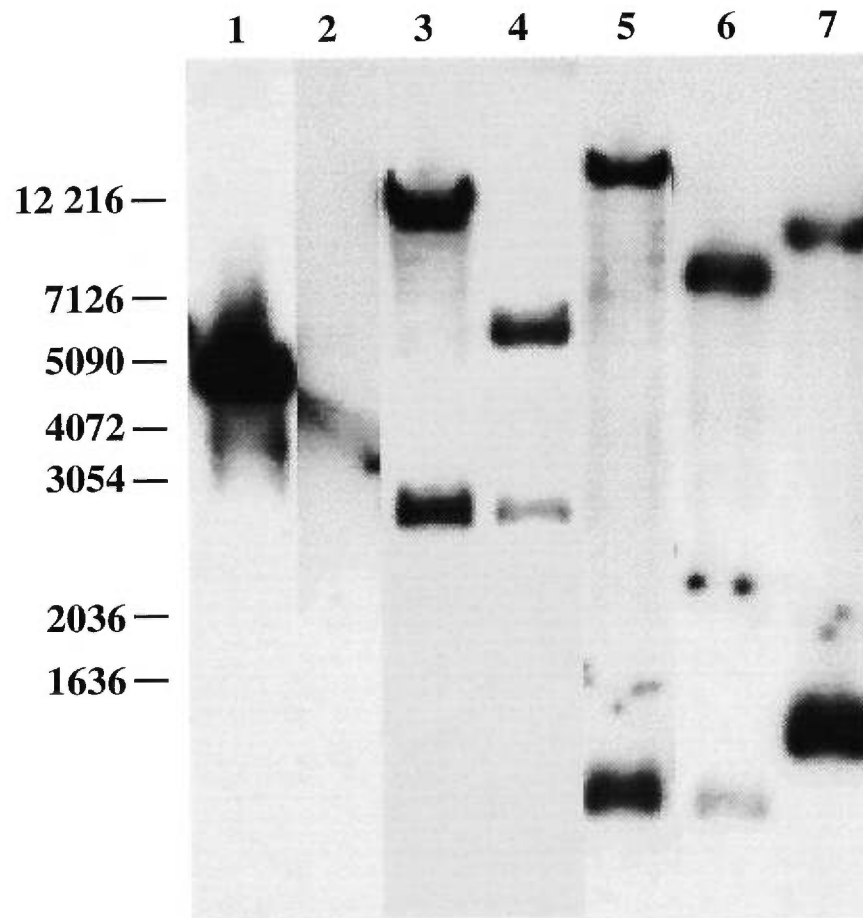


Figure 4. Insertion du mini-Tn10 déterminée par Southern blot révélé à l'aide d'une sonde spécifique pour le mini-Tn10. Puits 1, pLOF/Km; puits 2, souche mère 4074 Nal^r; puits 3, mutant CG1; puits 4, mutant CG2*; puits 5, mutants CG3; puits 6, mutants CG4*; puits 7, mutant CG5. Les marqueurs de taille moléculaire (kilobases) sont indiqués sur la gauche.

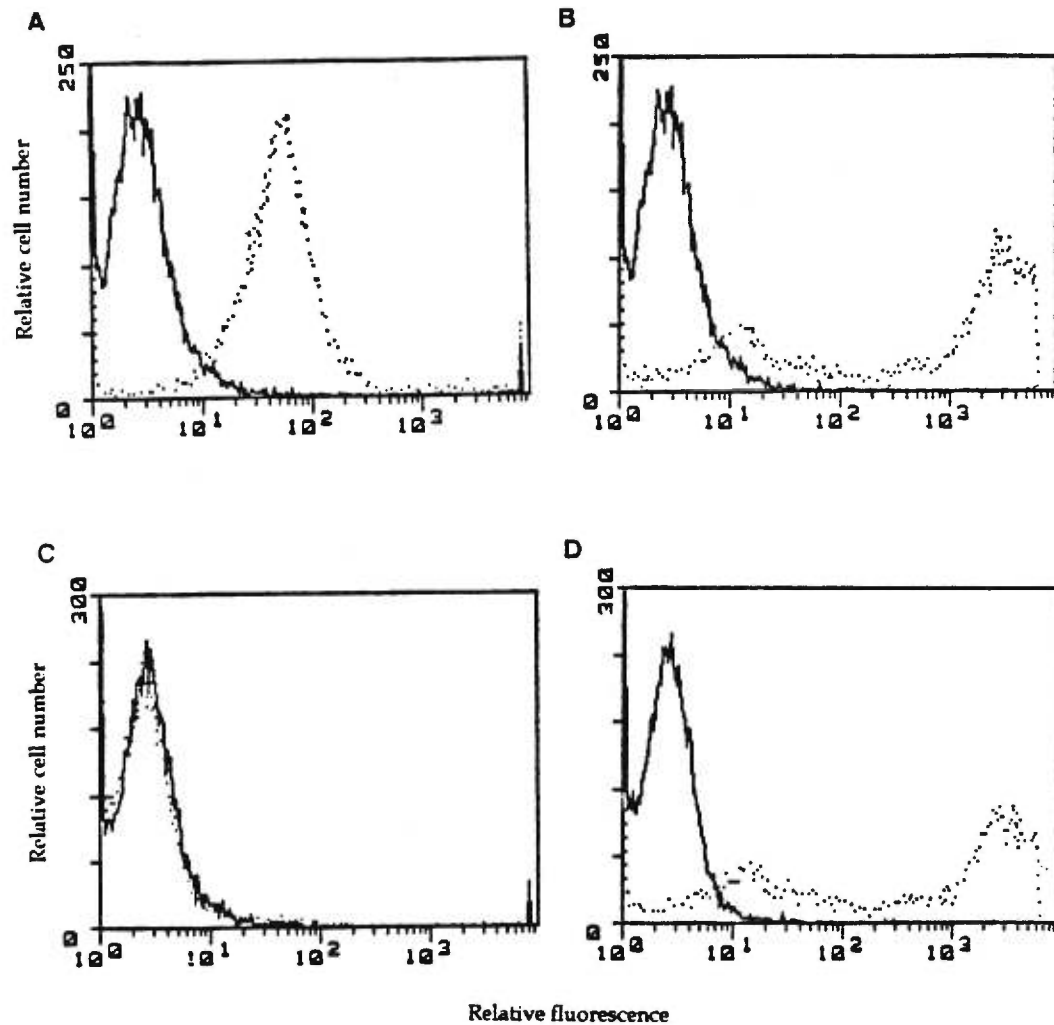


Figure 5. Analyse de cytométrie en flux d'*A. pleuropneumoniae* serotype 1 4074 NaI^r (A-B) et du mutant CG2 (C-D). Les cellules ont été marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène-O (A, B) ou contre la capsule (C, D) et avec un anticorps anti-IgG de souris conjugué au FITC. La ligne pleine représente les cellules incubés avec le conjugué seulement. Les résultats sont identiques pour le mutant CG4.

Tableau I. Adhérence aux cellules de trachée de porcelet et résistance au sérum normal de porc d'*A. pleuropneumoniae* 4074 Nal^r et des mutants CG2 et CG4.

Souche	Adhérence ^a (%)	Résistance au sérum ^b (%)
Souche mère 4074 Nal ^r	100	170±20
Mutant CG2	107± 8	167±42
Mutant CG4	61±12 ^c	32±30

^a Représente le pourcentage d'adhérence des mutants après comparaison avec la souche mère. Les valeurs sont obtenues suite à quatre expériences ± déviation standard.

^b Pourcentage de viabilité après 3 heures d'incubation dans le sérum normal de porc ± déviation standard (moyennes de trois expériences).

^c Différence significative (P< 0,05) observée entre le mutant CG4 et la souche mère.

Analyse génétique de l'ADN adjacent au mini-Tn10 des mutants CG2 et CG4.

L'analyse génétique de l'ADN adjacent au mini-Tn10 nous a permis de faire une recherche par BLAST (NCBI) des bases de données de séquences d'ADN et de protéines. Pour le mutant CG2, 3112 paires de bases ont été séquencées et quatre ORF majeurs ont été identifiés. Par contre, ces ORF n'avaient d'homologie qu'avec des protéines non-identifiées d'*A. actinomycetemcomitens*, y compris l'ORF dans lequel s'était inséré le mini-Tn10. Pour ce qui à trait au mutant CG4, nous avons identifié trois ORF s'étalant sur 3538 pb. Le premier ORF démontrait une homologie (~40%) avec le gène codant pour la protéine RfbF de *Shigella flexneri*; le second ORF présentait une homologie avec la gène codant pour une rhamnosyl transférase d'*A. actinomycetemcomitens* (~60%) et de *S. typhimurium* (*rfbN*; ~55%); et le troisième, dans lequel nous avons retrouvé le mini-Tn10, présentait une homologie avec le gène codant pour la protéine RfbP d'*H. influenzae* (~57%) et de *Salmonella* (~54%). Cette dernière protéine, nommée unécaprényl-phosphate galactose-phosphate transférase, est directement impliquée dans la biosynthèse de l'antigène-O, soit dans la liaison entre le premier galactose et le transporteur lipidique (UndP).

Annexe 2

Article

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

S. Rioux, **C. Galarneau**, J. Harel, J. Frey, J. Nicolet, M. Kobisch,
D. Dubreuil et M. Jacques.

(Soumis pour publication)

Dans cet article, j'ai réalisé la complémentation du mutant
galU et j'ai participé à la rédaction du manuscrit.

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

Stéphane Rioux¹, Catherine Galarneau¹, Josée Harel¹, Joachim Frey², Jacques Nicolet², Marylène Kobisch³, J. Daniel Dubreuil¹, and Mario Jacques^{1*}

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, and Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6¹; Institute for Veterinary Bacteriology, University of Berne, Laenggasstrasse 122, CH-3012 Berne, Switzerland²; Unité de recherche de mycoplasmologie et bactériologie, Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, BP 53, 22440 Ploufragan, France³.

*Author to whom all correspondence should be addressed. Tel: (450) 773-8521 ext. 8348. Fax: (450) 778-8108. e-mail: [REDACTED]

Abstract

Lipopolysaccharide (LPS) has previously been identified as a major adhesin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia. The purpose of the present study was to isolate and characterize mutants in LPS biosynthesis by using a mini-Tn10 transposon mutagenesis system. Seven mutants appeared to possess a rough LPS while one mutant (#5.1) expressed the high-molecular-mass LPS band but, as visualized by Tricine SDS-PAGE, showed an additional band in the core-lipid A region. The LPS mutants showed sensitivity to pig serum at various degrees, while the parent strain was serum-resistant. Use of piglet tracheal frozen sections indicated that the rough LPS mutants, surprisingly, adhered similarly or in greater numbers than the parent strain. However, the LPS mutant #5.1 adhered significantly less than the parent strain and was also less virulent in pigs. The gene affected by mini-Tn10 in LPS mutant #5.1 is *galU*, the structural gene for UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase involved in LPS core biosynthesis. Complementation analysis confirmed that the phenotypic characteristics of LPS mutant #5.1 are the result of the inactivation of the *galU* gene. Our data suggest that although the presence of O-antigen does not seem to be essential, an intact core-lipid A region might be required for adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells. To the best of our knowledge, these mutants represent the first isogenic mutants of *A. pleuropneumoniae* defective in LPS biosynthetic genes.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, lipopolysaccharides, mutant, adherence, virulence.

Résumé

Les lipopolysaccharides (LPS) ont été identifiés comme étant l'adhésine majeure d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine. Le but de cette étude était d'isoler et de caractériser des mutants au niveau de la biosynthèse des LPS en utilisant le transposon mini-Tn10. Sept mutants possédaient des LPS rugueux tandis qu'un mutant (#5.1) exprimait les LPS de haut poids moléculaire et possédait une bande additionnelle dans la région du noyau oligosaccharidique-lipide A, comme observé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de Tricine et de SDS. Les mutants LPS étaient sensibles à différents degrés au sérum normal de porc tandis que la souche mère était résistante au sérum. L'utilisation de coupes congelées de trachée de porcelet indique que les mutants possédant des LPS rugueux ont adhéré similairement ou en plus grand nombre que la souche mère. Cependant, le mutant #5.1 adhérait significativement moins que la souche mère et était aussi moins virulent chez le porc. Le gène affecté par le mini-Tn10 chez le mutant #5.1 est *galU*, gène codant pour l'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransférase impliquée dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique. L'analyse de complémentation confirme que les caractéristiques phénotypiques du mutant #5.1 sont le résultat de l'inactivation du gène *galU*. Nos données suggèrent que la présence de l'antigène-O ne semble pas être nécessaire à l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcin mais qu'un noyau oligosaccharidique complet pourrait être requis. A notre connaissance, ces mutants isogéniques déficients au niveau de la biosynthèse des LPS sont les premiers à être isolés chez *A. pleuropneumoniae*.

Mots clés: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, lipopolysaccharides, mutant, adhérence, virulence.

Introduction

Actinobacillus pleuropneumoniae is the causative agent of porcine pleuropneumonia, an acute or chronic infection characterized by hemorrhagic, fibrinous and necrotic lung lesions. The disease is highly contagious and causes tremendous economic loss to the swine industry (Nicolet 1992). Twelve serotypes of *A. pleuropneumoniae* have been recognized based on capsular and lipopolysaccharide antigens (Nielsen 1986). In Québec, serotypes 1, 5, and 7 are predominant (Mittal et al. 1992). Several bacterial factors have been suggested as important virulence attributes of *A. pleuropneumoniae*. The hemolytic and cytotoxic RTX toxins have been shown to be major virulence factors (Frey 1995). In addition, the polysaccharidic capsule, some outer membrane proteins, and lipopolysaccharides (LPS) seem to be involved in virulence as well (Haesebrouck et al. 1997; Inzana 1991; Tascón et al. 1996).

The adherence of microorganisms to the epithelial cells and/or mucus layer of the mucosal surfaces involves specific interactions between bacterial adhesins and host receptors (Ofek and Doyle 1994). We have shown that LPS plays a major role in the adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells and mucus (Bélanger et al. 1990; 1992; Jacques 1996; Paradis et al. 1994). Lipopolysaccharides have also been shown to play an important role in the adherence of various other Gram negative bacteria to host cells (Jacques 1996; Jacques and Paradis 1998). In addition, we recently observed that *A. pleuropneumoniae* LPS bound pig hemoglobin (Archambault et al. 1997; Bélanger et al. 1995). Lipopolysaccharide is a complex molecule composed of three well-defined regions: the lipid A which

is anchored in the outer membrane; the core, which is an oligosaccharide containing 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid; and the O-antigen which is 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, semirough (e.g., as in *A. pleuropneumoniae* serotype 1), or smooth (e.g., as in *A. pleuropneumoniae* serotype 2) (Bélangier et al. 1990; Byrd and Kadis 1989; Hitchcock et al. 1986).

The biosynthesis of LPS is complex, and the genes involved tend to be clustered into distinct regions of the bacterial chromosome. For enteric bacteria, the *rfa* [*waa*; new nomenclature system proposed for genes involved in expression of bacterial polysaccharides (Reeves et al. 1996)] gene cluster encodes LPS core biosynthesis and O-antigen attachment, while the genes involved in the biosynthesis of the O-antigen region are predominantly found at the *rfb* (*wb**) locus. In addition, other genes involved in the biosynthesis of the LPS core and O-antigen are spread on the chromosome (Raetz 1996; Schnaitman and Klena 1993).

To the best of our knowledge, only spontaneous LPS mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 have been described (Rioux et al. 1997). However, these mutants were genotypically not characterized. The purpose of the present study was to isolate and characterize LPS mutants using a mini-Tn10 transposon mutagenesis system.

Methods

Bacterial strains and plasmids. A nalidixic acid-resistant mutant (4074 Nal^r) that we isolated from *A. pleuropneumoniae* reference strain 4074 representing serotype 1 (provided by A. Gunnarson, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden) was used as recipient strain for transposon mutagenesis while *Escherichia coli* S17.1 λ pir (pLOF/Km) was used as donor strain (Tascón et al. 1993). Plasmid pJFF224-XN (Frey 1992) was used for the complementation experiments.

Growth conditions and media. *A. pleuropneumoniae* 4074 Nal^r was grown on BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI) agar plates supplemented with 15 μ g NAD per mL and 30 μ g nalidixic acid (Nal) per mL. *E. coli* S17.1 λ pir (pLOF/Km) was grown on LB agar plates supplemented with 50 μ g kanamycin (Km) per mL. Transpositional mutants were grown on BHI agar plates supplemented with 15 μ g/mL of NAD, 30 μ g/mL of Nal, and 75 μ g/mL of Km. For the selection of plasmid in *A. pleuropneumoniae* LPS mutants, chloramphenicol (Cm) was added at 0.6 μ g/mL. Plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 18-24 h.

Transpositional mutagenesis. Mutagenesis in *A. pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative (de Lorenzo and Timmis 1994) was done as described by Tascón et al. (1993) with some modifications. Briefly, overnight cultures of donor and recipient strains were diluted to OD_{650nm} 0.8 in 0.85% NaCl. One hundred μ l of each bacterial suspension were mixed in 5 mL of sterile 10 mM MgSO₄ and then filtered through a Millipore type HA 0.45 μ m membrane (Millipore). Mating filters containing donor and recipient bacteria were placed

onto BHI-NAD agar plates (cells side up), and incubated at 37°C for 4 h. The membranes were then transferred to BHI-NAD agar plates containing 100 µM IPTG to induce expression of the transposase. After incubation at 37°C for 15-18 h, the bacterial cells were resuspended in sterile NaCl (0.85%), and appropriate dilutions were plated on the counterselecting medium (BHI-NAD-Nal-Km).

Selection of mutants. Different bacterial colonies from a master plate were inoculated onto BHI-NAD-Nal-Km agar plates supplemented with 2 µg novobiocin per mL. After incubation, the colonies that did not grow in the presence of this hydrophobic antibiotic were selected from the master plate. These novobiocin-sensitive mutants were then analyzed by SDS-PAGE, Tricine SDS-PAGE, and immunoblotting.

SDS-PAGE, Tricine SDS-PAGE, and immunoblotting. Electrophoretic separation methods and analysis including SDS-PAGE [separating gels of 10% (w/v) polyacrylamide], Tricine SDS-PAGE, and immunoblotting analysis were performed as described previously by Rioux et al. (1997).

DNA techniques. Restriction and modification enzymes were purchased from Pharmacia Biotech and were used according to the supplier's specifications. Plasmid DNA was prepared with the Plasmid maxi kit and QIAprep spin miniprep kit (Qiagen). Chromosomal DNA was purified using the guanidium thiocyanate method from Pitcher et al. (1989). Briefly, cells were lysed with GES-buffer (5 M guanidine thiocyanate, 100 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% (w/v) sodium-lauryl-sarcosinate) and proteins were precipitated with 7.5 M ammonium acetate. Phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1; Sigma) was

used to remove the remaining exonucleases and lipoproteins from the DNA. Finally, the DNA was precipitated with isopropanol.

PCR amplification of the transposon mini-Tn10 was done using the oligonucleotide primers KMTN903-L (5' AAGGGGTGTTATGAGCCATATT 3') and KMTN903-R (5' CCAATTCTGATTAGAAAAAGTC 3') at an annealing temperature of 53°C using standard conditions (Ausubel et al. 1990). Labelling of a specific probe for the transposon with digoxigenin (DIG) was done in a standard PCR which was supplemented with 50 µM digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim) using plasmid pLOF/Km as template and the same primers. Southern blot analysis with *Hind*III, *Xho*I or *Eco*RI-digested genomic DNA was done using a standard protocol (Ausubel et al. 1990) with the following washing conditions: two washes for 5 min at room temperature with 2 X SSC containing 0.1% (w/v) SDS, and twice for 15 min at 68°C with 0.2 X SSC containing 0.1% (w/v) SDS. The DIG-labelled probe was detected using phosphatase-labelled anti-DIG antibodies with CDP-Star as substrate (Boehringer Mannheim) according to the manufacturer's instructions.

Identification of the mutated gene was performed using a PCR-based procedure that allows amplification of chromosomal DNA adjacent to the mini-Tn10 site of insertion. The procedure is based on a single specific primer PCR amplification of chromosomal DNA adjacent to one end of the transposon insert (Novák et al. 1997). Chromosomal DNA was digested with restriction enzyme *Hind*III (which cuts the transposon at a single site) and ligated into a pBluescript II KS (+) plasmid that was digested with the same enzyme. To perform the PCR the following primers were used: one specific

primer annealing to the mini-Tn10 [Hind3-FOR (5' GCTTTTGCCATTCTCACCGGATT 3')] and the other annealing to the vector pBluescript II KS (+) [T7-REV (5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3')]. Initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 30 cycles of PCR were used. Each cycle consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 4 min using standard conditions (Ausubel et al. 1990).

DNA sequencing of the PCR product was performed using the primers T7-REV and Hind3-FOR at the DNA sequencing core facility, University of Maine (Orono, MA) by using an ABI model 373A stretch DNA sequencer. Subsequent primers were based on the obtained sequence. DNA sequence information was analyzed with programs from University of Wisconsin Genetics Computer Group software (Devereux et al. 1984) using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases.

To complement the *galU* defect due to transposon insertion, an intact *galU* gene was cloned into a plasmid. The *galU* gene was amplified by PCR using parent strain 4074 NaI^r chromosomal DNA as template with oligonucleotides GalU5' (5' GTCGACTATGCACCTTGTA 3') and GalU3' (5' CTTAAGGGAAGAAAACTATC 3') at an annealing temperature of 53°C using standard conditions (Ausubel et al. 1990). This introduced a *SalI* site at the 5' end and an *EcoRI* site at the 3' end of the amplified product. This PCR product was cloned into the PCR cloning vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and the resulting plasmid was designated pCR2.1-TOPO::*galU*. The plasmid pCR2.1-TOPO::*galU* was digested with *SalI* and *EcoRI* and electrophoresed in a 0.7% (w/v) agarose

gel. The 980-bp fragment was excised from the gel and purified by using Sephaglas BandPrep kit (Pharmacia Biothech). The fragment was ligated into pJFF224-XN previously digested with the same enzymes. The resulting plasmid was designated pJFF224-XN::*galU*. This plasmid was introduced into *E. coli* S17.1 by CaCl₂/MOPS transformation following procedure C of the U.S.E. mutagenesis kit (Pharmacia Biotech).

Complementation. To complement the disrupted gene of LPS mutant #5.1, the mobilizable vector pJFF224-XN::*galU* was introduced into mutant #5.1 by electroporation. Briefly, A 6-h old culture of *A. pleuropneumoniae* mutant #5.1 on BHI-NAD-Nal-Km agar plates was harvested and diluted to OD_{650nm} 0.5 in PBS. Cells were centrifuged for 10 min at 3 000 g at 4°C, washed twice in 15% (v/v) glycerine at 4°C, resuspended in 1/20 volume of 15% (v/v) glycerine and kept to -70°C. Sample of 125 µL of cell suspension was mixed with plasmid pJFF224-XN::*galU*. Electroporation was performed using a Gene Pulser (Bio-Rad) at U = 2.5 kV, C = 25 µF, R = 400 W, and pulse length of 9.0 ms in a 2-mm cuvette. After electroporation, 1 mL of BHI-NAD broth was added and the cells were incubated for 3 h prior to spreading on BHI-NAD-Nal-Km-Cm.

Electron microscopy. Capsular material of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 cells was stabilized using a mouse monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* capsular antigen (1.5 C5 F4; kindly supplied by Marcelo Gottschalk, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada) and stained with ruthenium red before examination by transmission electron microscopy as described previously (Jacques et al. 1988; Jacques and Gottschalk 1997).

Flow cytometry. Cells of *A. pleuropneumoniae* were incubated with either monoclonal antibody against serotype 1 O-antigen (5.1 G8F10; also supplied by M. Gottschalk) or serotype 1 K-antigen (1.5 C5 F4) and analyzed by flow cytometry as described previously (Paradis et al. 1994). The flow analysis was performed with a FACStar flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) equipped with a water-cooled 2-W argon ion laser operating at 488 nm and a 200-mW light output.

Adherence assay. The adherence assay to frozen tracheal sections was performed as described by Paradis et al. (1994). Briefly, bacteria were diluted in PBS containing 1% (w/v) bovine serum albumin and 0.01% (v/v) Tween 20 to give OD_{540nm} 0.2. A volume (100 µL) of bacterial suspension was pipetted onto piglet tracheal frozen sections on glass slides and incubated in a moist chamber at 37°C for 2 h. After intensive washing in distilled water, sections were stained with the Diff-Quik stain (Baxter Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Upon microscopic examination, the number of bacterial cells attached to the tracheal epithelium was determined at a magnification of X 1000. Results were compared for statistical significance by Student's t test.

Serum bactericidal assay. A modification of the serum bactericidal assay procedure described by Ward and Inzana (1994) was used. A 6-h old culture of *A. pleuropneumoniae* was harvested and washed at room temperature with PBS containing 0.15 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂ (PBS⁺⁺). Bacteria were diluted to approximately 5 x 10⁴ CFU/mL in PBS⁺⁺. A volume of 50 µL of the bacterial suspension was added to 450 µL of normal swine serum and

incubated at 37°C. Control tubes contained heat-inactivated serum. Viable-cell counts were estimated at 0 and 3 h by plating 50 µL of this bacterial suspension in serum on BHI-NAD agar. Plates were incubated overnight at 37°C and the percentage of viability was determined according to the equation: (number of colonies after incubation/number of colonies before incubation) X 100.

Growth curves. BHI broth (50 mL vols) without antibiotics was inoculated with 0.5 mL of a bacterial suspension containing 10^8 CFU/mL and incubated at 37°C with agitation (100 rpm). Growth was monitored spectrophotometrically at 540 nm at 0, 4, 8, 24, and 48 h.

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

pleuropneumoniae were inoculated on BHI-NAD-Nal and BHI-NAD-Nal-Km to confirm that the mutant strain or the parent strain was reisolated, respectively.

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

Results

Isolation and characterization of LPS mutants. Initial screening of LPS mutants was performed using susceptibility to novobiocin, a hydrophobic antibiotic effective against rough LPS mutants (Nikaido 1976). Approximately 1 300 individual bacterial colonies obtained from two independent mutagenesis experiments were tested on a selective medium containing novobiocin; 109 mutants which were unable to grow in the presence of this hydrophobic antibiotic were retained. Since one of the mechanisms of novobiocin resistance implies the outer membrane (Nikaido and Vaara 1985), the absence of growth suggest that a mutation was at that level. To identify the mutants with a mutation at the LPS level, they were then analyzed by SDS-PAGE, Tricine SDS-PAGE, and immunoblotting using the monoclonal antibody 5.1 G8F10, which is directed against an epitope located in the O-antigen of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS (Lairini et al. 1995). Seven mutants (#1.1, #15.1, #24.1, #27.1, #36.1, #44.1 and #51.1) appeared to possess a rough LPS as they did not express high-molecular-mass LPS bands in silver-stained SDS-PAGE gels, while one mutant (#5.1) and the parent strain expressed the high-molecular-mass LPS bands (Fig. 1, lanes 1 and 9). These mutants were then characterized by immunoblotting. Rough LPS mutants #1.1, #15.1, #24.1, #27.1, #36.1, #44.1 and #51.1 did not react with the monoclonal antibody 5.1 G8F10 as expected, while the LPS mutant #5.1 reacted with this monoclonal antibody (Fig. 2, lane 9). These results were confirmed by flow cytometry analysis using the same monoclonal antibody (data not shown). Mutant #5.1 showed an additional band in the core-lipid A region when visualized by Tricine SDS-PAGE, a method which allows a better resolution of the core-lipid A region (Fig. 3A) (Lesse et al. 1990). In addition,

the sample separated using Tricine SDS-PAGE was transferred to nitrocellulose membranes and the antigenicity of the core-lipid A region was tested by immunoblot using a serum from a pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae* (Fig. 3B). The upper band of the core-lipid A region of mutant #5.1 reacted with this pig serum as did the band of the parent strain migrating at the same position, while the additional band of the core-lipid A region of mutant #5.1 did not react with the same serum. All the mutants were kanamycin resistant and ampicillin sensitive, indicating that they resulted from a transposition event and not a plasmid co-integration event.

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

PCR amplification and Southern hybridization. The amplification of the transposon was done by PCR using the transposon-specific primers. All mutants showed the expected 836-bp product and thus carried the mini-Tn10 (data not shown). Chromosomal DNA from each LPS mutant was digested with *Hind*III (which cuts the transposon at a single site) and analyzed by Southern blotting with specific DIG-labelled probe to assess the number of copies of the transposon present. All the mutants carried a single insertion of

the mini-Tn10 (Fig. 4) and the insertion was mapped to different sites as shown by different fragment sizes. However, a similar profile was seen for mutants #1.1 and #15.1 (Fig. 4, lanes 1 and 3), and mutants #24.1 and #36.1 (Fig. 4, lanes 4 and 6). The same results were obtained by Southern blotting using the chromosomal DNA from each LPS mutant digested with *Xho*I (which cuts the transposon once) or *Eco*RI (which does not cut the transposon) (data not shown).

Serum resistance. The parent strain 4074 Nal^r and the LPS mutants were examined for survival in 90% normal pig serum. The parent strain was serum-resistant and multiplied in the serum during the period of incubation (Fig. 5). Mutants #1.1, #15.1, #27.1, #44.1, and #51.1 decreased in number, but were not completely eliminated after 3 h of incubation. Normal pig serum was bactericidal for mutants #5.1, #24.1 and #36.1. The killing by serum appeared to be complement-mediated, since inactivation of complement by heating prior to bacterial inoculation permitted bacterial survival (data not shown).

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

Identification of the gene affected by mini-Tn10 in the LPS mutant #5.1. Because our group has demonstrated that LPS was the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* and knowing that LPS mutant #5.1 showed a decreased adherence to porcine tracheal cells, the gene of mutant #5.1 affected by mini-Tn10 was amplified and identified by DNA sequencing. Computer analysis identified two open reading frames: ORF1, spanning bp 53 to 937, and ORF2, in the opposite direction, spanning bp 975 to 1490 (Fig. 6). The deduced amino acid sequence from the nucleotide sequence of ORF1 was analyzed through the National Center for Biotechnology Information (NCBI) with the BLAST program and was found to be similar to UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Haemophilus influenzae* (83% identity in a stretch of 295 amino acids) and *E. coli* (75% identity in a stretch of 165 amino acids) encoded by the *galU* gene. The second ORF showed no similarity to any known gene. Nucleotide sequence analysis demonstrated that the mini-Tn10 insertion was located 16-bp upstream of the Shine-Delgarno sequence of ORF1 (Fig. 6). This suggests that the mini-Tn10 might be located within the *galU* promoter region thus having a direct or a polar effect by blocking the transcription of *galU*. In addition, the nucleotide sequence reveals that *galU* is followed by a cononical termination of the transcription sequence 11-bp downstream the stop codon which could serve as a rho-independent transcriptional terminator (Fig. 6).

Complementation of the gene affected by mini-Tn10 in the LPS mutant #5.1. To prove that the phenotypic characteristics of LPS mutant #5.1 were the result of the partial inactivation of the *galU* gene, a complementation analysis was performed using the shuttle vector pJFF224-XN carrying a wild-type version of the *A. pleuropneumoniae galU* gene. The presence of the wild-

type *A. pleuropneumoniae galU* gene on a low copy vector restored almost completely the LPS phenotype (Fig. 7). Furthermore, complementation with wild-type *galU* restored the adherence phenotype as the parent strain and the complemented mutant #5.1 adhered similarly to piglet tracheal frozen sections (Table 1).

Virulence in pigs. The virulence of LPS mutant #5.1 and the parent strain 4074 Na^r was evaluated in pigs. After challenge with mutant #5.1, no mortality was recorded, while after challenge with the parent strain 4074 Na^r, mortality was 75% (Table 2). A necropsy was done on all the pigs, with particular attention to the lung lesions. Upon macroscopic examination, fibrino-hemorrhagic pleuropneumonia, compatible with *A. pleuropneumoniae* infection (Dumgworth 1993) was observed in all pigs infected with the parent strain and only in 50% of the pigs infected with mutant #5.1 (Table 2). The control pigs infected with the parent strain 4074 Na^r showed more extensive lesions than those infected with mutant #5.1 (Table 2). *A. pleuropneumoniae* was isolated from the lungs of pigs with lesions and from the tonsils of all animals. It is worth noting that the growth curves in liquid culture for both the parent strain and the LPS mutant #5.1 were identical (data not shown) which suggests that the virulence of the parent strain was not a factor of more abundant growth.

Discussion

Several pieces of evidence indicated that LPS is involved in adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells and mucus (Bélanger et al. 1990; 1992; Jacques 1996; Paradis et al. 1994). The aim of the present study was to generate isogenic LPS mutants of *A. pleuropneumoniae*. Following mini-Tn10 mutagenesis, 7 rough mutants that did not express high-molecular-mass LPS bands and did not react with the monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen were identified. One mutant showing an additional band in the core-lipid A region was also identified. This additional band did not react with the serum from pig experimentally infected with the serotype 1 reference strain of *A. pleuropneumoniae*. These results suggest that the additional band might be an incomplete core, which is compatible with a faster migration on Tricine SDS-PAGE gels and absence of the epitopes recognized by the pig antiserum.

In order to get further insight in the role of LPS in virulence of *A. pleuropneumoniae*, we have examined serum resistance properties of the LPS mutants and compared them to the parent strain. Although well encapsulated, all LPS mutants were sensitive or partially sensitive to normal pig serum but not the parent strain which was serum resistant, suggesting that the LPS may protect the cells from serum-mediated killing by sterically preventing access of the complement to the outer membrane, as reported for other gram-negative bacteria (Dasgupta et al. 1994; Hong and Payne 1997; Porat et al. 1992).

We have shown that LPS is an adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to porcine respiratory tract cells (Bélanger et al. 1990;

1992; Jacques 1996). More recently, we demonstrated that the active component of LPS was not lipid A but the polysaccharides and that high molecular-mass polysaccharides composed of the O-chain and the core oligosaccharide inhibited adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine tracheal frozen sections (Paradis et al. 1994). In the present study, the adherence of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 Nal^r and of the LPS mutants was evaluated. For mutant #5.1 deficient in core-lipid A biosynthesis, the average number of adherent bacterial cells was significantly decreased compared to the parent strain. We have recently isolated other *A. pleuropneumoniae* LPS mutants with a modified core-lipid A region showing decreased adherence to host cells (Jacques et al. 1998). The mutants with rough LPS lacking O-antigen adhered similarly or even in greater numbers than the parent strain suggesting that the presence of O-antigen might even mask important core residues. These observations confirm the role of *A. pleuropneumoniae* LPS in adherence. Moreover the results specify that the O-antigen is not essential for adherence, while an intact core-lipid A region seems to be required for adherence to porcine respiratory tract cells. Interestingly, similar results with LPS-core mutant of *Neisseria gonorrhoeae* have been reported (Schwan et al. 1995). It was shown that a strain with a mutation in *rfaF* (*waaF*), which blocked LPS-core biosynthesis, adhered poorly to Chang epithelial cells in contrast to the parent strain which showed strong adhesion. In addition, one LPS-core mutant of *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-pmm) showed a reduced ability to adhere to primary cultures of human respiratory epithelial cells derived from nasal polyps, to transformed tracheal epithelial cells, or to mouse L4 adenoma cells compared with the parent strain (Tang et al. 1996). This mutant, an *algC* mutant, lacked the phosphomannomutase gene, resulting in a defective LPS core, lack of O-

antigen and inability to synthesize alginate. The core-lipid A region of this *algC* mutant showed, on SDS-PAGE, faster migration than the parent strain (Coyne et al. 1994; Tang et al. 1996). Pier et al. (1996), using purified LPS from another *algC* mutant of *P. aeruginosa* (PAC 1R *algC* :: tet), showed that the complete LPS outer core is an important bacterial ligand involved in the ingestion by airway epithelial cells expressing wild-type CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

Because the LPS mutant #5.1 with a modified core-lipid A region showed a decreased adherence to porcine tracheal cells, it was further characterized. Nucleotide sequence analysis of LPS mutant #5.1 indicated that the transposon insertion was located within or downstream the promoter region of the *galU* gene, the structural gene for UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (Weissborn et al. 1994), thus affecting transcription of *galU*. This enzyme is involved in the synthesis of UDP-glucose. Our phenotypic analyses showed that the *A. pleuropneumoniae* LPS-core mutant #5.1 produced a core-lipid A region that migrated with the same mobility as the parent strain and exhibited an additional band with a faster migration. We interpret this faster migration material as truncated core-lipid A, due to the mutation in *galU* as complementation with an intact *galU* restored LPS phenotype. Similar results were found with *galU* mutants in *Shigella flexneri* and *H. influenzae* (Hood et al. 1996; Sandlin et al. 1995). The reason why LPS mutant #5.1 also synthesized to some extent full sized core-lipid A can be explained by either that the Tn10 insertion only partially inhibited transcription of *galU* or by a potential bypass pathway for biosynthesis of UDP-glucose (Lin 1996). Therefore, the additional band may represent truncated core-lipid A molecules, while the upper band may be composed of

the complete core-lipid A region linked to one O-antigen repeating unit although it was not recognized by monoclonal antibody 5.1 G8F10. It has been observed previously with *P. aeruginosa* that monoclonal antibodies specific for O-antigen do not necessarily recognize core with one O-antigen unit attached (Lam et al. 1992). The presence of truncated as well as complete core-lipid A molecules could explain the partial reduction (38%) of adherence of the LPS mutant #5.1. Finally, *A. pleuropneumoniae galU* mutant #5.1 was markedly less virulent in pigs than the parent strain. Interestingly, the *H. influenzae galU* mutants were 100-1000 fold less virulent in mice than their parent strain (Hood et al. 1996). The *S. flexneri galU* mutant also was less virulent than its parent strain (Sandlin et al. 1995).

In summary, eight isogenic LPS mutants were generated in the present study; these mutants represent, to the best of our knowledge, the first isogenic mutants of *A. pleuropneumoniae* defective in LPS biosynthetic genes. Our results indicate that one *A. pleuropneumoniae* LPS mutant, the *galU* mutant #5.1, adhered significantly less than the parent strain while rough mutants adhered similarly or in greater numbers than the parent strain. In addition, the LPS mutants were more sensitive to the bactericidal activity of pig serum than the parent strain. Taken together our observations confirm the idea that LPS is an important virulence factor of *A. pleuropneumoniae* and play a role in adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells. Our data also suggest that although the presence of O-antigens does not appear to be essential, an intact core-lipid A region might be required for adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells. It would be interesting, in future studies, to identify the genes affected by mini-Tn10

in the seven mutants with a rough LPS and learn more about LPS biosynthetic genes organization in this important swine pathogen.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (OGP0003428 to M.J.) and from the Swiss National Science Foundation (3100.39123.93 to J.F.). S. R. and C. G. are the recipient of a studentship from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, and S. R. received additional support from Centre de Coopération Interuniversitaire Franco-Québécoise. We are greatly indebted to V. de Lorenzo (Centro de Investigaciones Biológicas, Velázquez 144, 28006 Madrid, Spain) and Marcelo Gottschalk (Université de Montréal) for the generous gift of plasmid pLOF/Km and monoclonal antibodies against *A. pleuropneumoniae* serotype 1, respectively. We are grateful to Bernadette Foiry for performing the electron microscopy, to Serge Sénéchal for his expertise in flow cytometry, and to Dominique Dugourd, Céline Forget, and Rolf Kuhn for advice.

References

- Archambault, M., Olivier, M., Foiry, B., Diarra, M.S., Paradis, S.-É., and Jacques, M. 1997. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.* **4**: 53-65.
- 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.
- 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.
- Bélanger, M., Bégin, C., and Jacques, M. 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**: 656-662.
- Byrd, W., and Kadis, S. 1989. Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect. Immun.* **57**: 3901-3906.

Coyne, M.J. Jr., Russell, K.S., Coyle, C.L., and Goldberg, J.B. 1994. The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of a complete lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* **176**: 3500-3507.

Dasgupta, T., de Kievit, T.R., Masoud, H., Altman, E., Richards, J.C., Sadovskaya, I., Speert, D.P., and Lam, J.S. 1994. Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes 03, 05, and 06. *Infect. Immun.* **62**: 809-817.

de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.

Devereux, J., Haeblerli, P., and Smithies, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12**: 387-395.

Dungworth, D.L. 1993. The respiratory system. *In Pathology of domestic animals.* 4th ed. *Edited by* K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, and N. Palmer. Academic Press Inc, San Diego. pp. 539-699.

Frey, J. 1992. Construction of a broad host range shuttle vector for gene cloning and expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and other *Pasteurellaceae*. *Res. Microbiol.* **143**: 263-269.

Frey, J. 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* **3**: 257-261.

Haesebrouck, F., Chiers, K., Van Overbeke, I., and Ducatelle, R. 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* **58**: 239-249.

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.

Hong, M., and Payne, S.M. 1997. Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Mol. Microbiol.* **24**: 779-791.

Hood, D.W., 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.

Inzana, T.J. 1991. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Pathogen.* **11**: 305-316.

Jacques, M. 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **4**: 408-410.

Jacques, M., and Gottschalk, M. 1997. Use of monoclonal antibodies to visualize capsular material of bacterial pathogens by conventional electron microscopy. *Microsc. Microanal.* **3**: 234-238.

Jacques, M., and Paradis, S.-É. 1998. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. FEMS Microbiol. Rev. **22**: 45-59.

Jacques, M., Foiry, B., Higgins, R., and Mittal, K.R. 1988. Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Bacteriol. **170**: 3314-3318.

Jacques, M., Galarneau, C., and Rioux, S. 1998. Reduced adherence to porcine respiratory tract cells of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 LPS mutants. In *the fifth conference of the International Endotoxin Society 1998*, abstr. #75, p. 108.

Lairini, K., Stenbaek, E., Lacouture, S., and Gottschalk, M. 1995. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Vet. Microbiol. **46**: 369-381.

Lam, J.S., Handelsman, M.Y.C., Chivers, T.R., and MacDonald, L.A. 1992. Monoclonal antibodies as probes to examine serotype-specific and cross-reactive epitopes of lipopolysaccharides from serotype O2, O5, and O16 of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **174**: 2178-2184.

Lesse, A.J., Campagnari, A.A., Bittner, W.E., and Apicella, M.A. 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine - sodium dodecyl sulfate - polyarylamide gel electrophoresis. J. Immunol. Methods **126**: 109-117.

Lin, E.C.C. 1996. Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxylates. *In Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2nd ed. Edited by F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger. American Society for Microbiology, Washington, D. C. Vol. 1, pp. 307-342.

Mittal, K.R., Higgins, R., Larivière, S., and Nadeau, M. 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* **32**: 135-148.

Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *In Diseases of swine*. 7th ed. Edited by A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire, and D.J. Taylor. Iowa State University Press, Ames. pp. 401-408

Nielsen, R. 1986. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet. Scand.* **27**: 453-455.

Nikaido, H. 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium* transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. *Biochim. Biophys. Acta.* **433**: 118-132.

Nikaido, H., and Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**: 1-32

Novák, J., Novak, L., Shah, G.R., Woodruff, W.A., and Caufield, P.W. 1997. Transposon mutagenesis: cloning of chromosomal DNA from the site of

Tn916 insertion using polymerase chain reaction. *Biotechnol. Techniques.* **11**: 51-54.

Ofek, I., and Doyle, R.J. 1994. *Bacterial adhesion to cells and tissues*. New York, Chapman and Hall. 578 pp.

Paradis, S.-É., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M., and Jacques, M. 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect. Immun.* **62**: 3311-3319.

Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T.S., Olsen, J.C., Johnson, L.G., Yankaskas, J.R., and Goldberg, J.B. 1996. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* **271**: 64-67.

Pitcher, D.G., Saunders, N.A., and Owen, R.J. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**: 151-156.

Porat, R., Mosseri, R., Kaplan, E., Johns, M.A., and Shibolet, S. 1992. Distribution of polysaccharide side chains of LPS determines resistance of *Escherichia coli* to the bactericidal activity of serum. *J. Infect. Dis.* **165**: 953-956.

Raetz, C.R.H. 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. *In Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2nd ed. Edited by F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M.

Schaechter, and H.E. Umbarger. American Society for Microbiology, Washington, D. C. Vol. 1, pp. 1035-1063.

Reeves, P.R., Hobbs, M., Valvano, M.A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., Kido, N., Klena, J., Maskell, D., Raetz, C.R.H., and Rick, P.D. 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**: 495-503.

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

Sandlin, R.C., Lampel, K.A., Keasler, S.P., Goldberg, M.B., Stolzer, A.L., and Maurelli, A.T. 1995. Avirulence of rough mutants of *Shigella flexneri*: requirement of O antigen for correct unipolar localization of IcsA in the bacterial outer membrane. *Infect. Immun.* **63**: 229-237.

Schnaitman, C.A., and Klena, J.D. 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 655-682.

Schwan, E.T., Robertson, B.D., Brade, H., and van Putten, J.P.M. 1995. Gonococcal *rfaF* mutants express Rd₂ chemotype LPS and do not enter epithelial host cells. *Mol. Microbiol.* **15**: 267-275.

Tang, H.B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B.H., Goldberg, J.B., and Prince, A. 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun.* **64**: 37-43.

Tascón, R.I., Rodríguez-Ferri, E.F., Gutiérrez-Martín, C.B., Rodríguez-Barbosa, 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, J.I., and Rodríguez-Ferri, E.F. 1996. Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiología SEM.* **12**: 171-184.

Ward, C.K., and Inzana, T.J. 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.

Weissborn, A.C., Liu, Q., Rumley, M.K., and Kennedy, E.P. 1994. UTP: α -D-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the *galU* gene and purification of the enzyme. *J. Bacteriol.* **176**: 2611-2618.

Table 1. Adherence to piglet tracheal frozen sections and reactivity with mAb against O-antigen of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain 4074 Nal^r and LPS mutants

Strain	Reactivity in WB with mAb against O-antigen*	Adherence§
Parent	+	100
#1.1	-	129
#15.1	-	139¶
#24.1	-	183¶
#27.1	-	227¶
#36.1	-	171
#44.1	-	176
#51.1	-	96
#5.1	+	62¶
#5.1 C ^{II}	+	100

*As shown in figure 2.

§Represents the % of parent strain. Values represent the average of four experiments.

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

^{II}Mutant #5.1 was complemented in trans with wild-type *A. pleuropneumoniae galU* gene as described in M/M.

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

Strain	Number of pigs (n)	Mortality (%)	Pigs with lung lesions (%)*	Lung lesions§	Fever (%)¶	Dyspnea (%)
Parent	4	75	100	36 ± 23	100	75
mutant #5.1	6	0	50	9 ± 13	83	66

*Microscopic examination of the pulmonary lesions revealed changes compatible with porcine pleuropneumonia.

§Represent area of pneumonic lesion. Values represent the mean ± SD.

¶T > 40 °C.

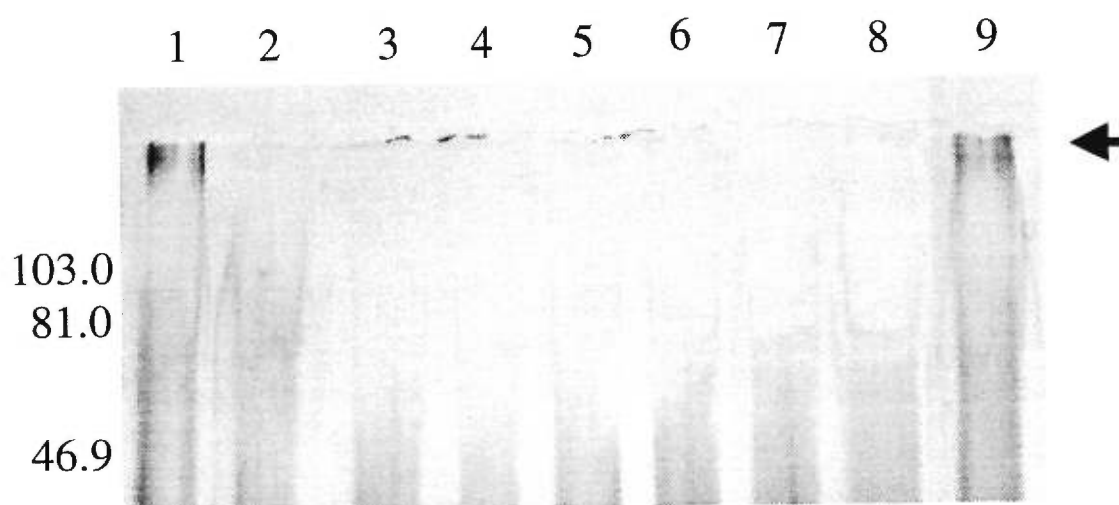


Fig. 1. Silver-stained SDS-PAGE profiles of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI^r and LPS mutants. Lane 1, parent strain; lane 2, mutant #1.1; lane 3, mutant #15.1; lane 4, mutant #24.1; lane 5, mutant #27.1; lane 6, mutant #36.1; lane 7, mutant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

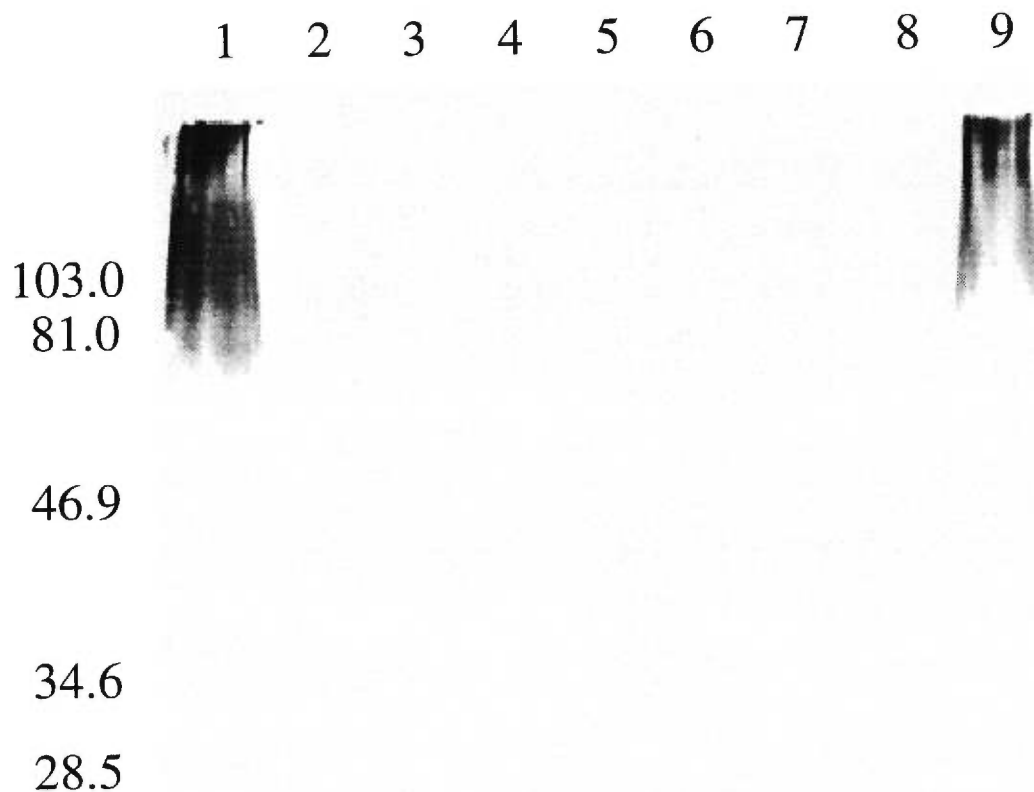


Fig. 2. Immunoblot of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI^r and LPS mutants. The immunoblot was probed with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. Lane 1, parent strain; lane 2, mutant #1.1; lane 3, mutant #15.1;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

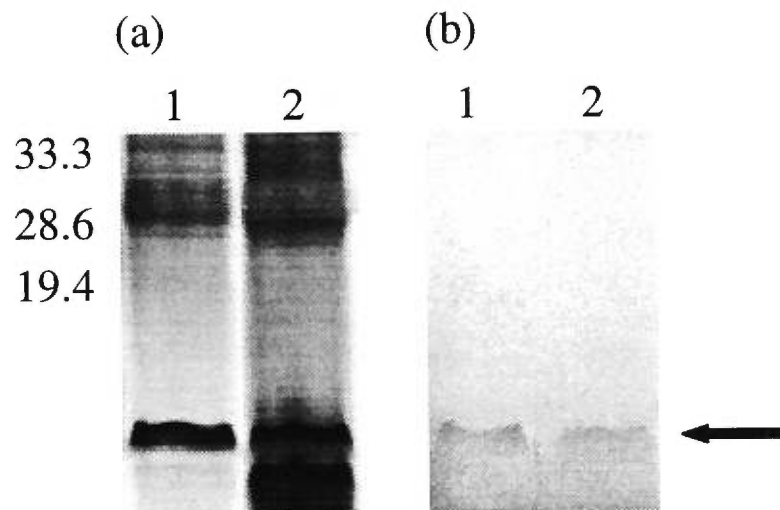


Fig. 3. Silver-stained Tricine-SDS-PAGE profiles (a) and immunoblot (b) of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI^r (lane 1) and LPS mutant #5.1 (lane 2). The immunoblot was probed with an antiserum obtained from a pig experimentally infected with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

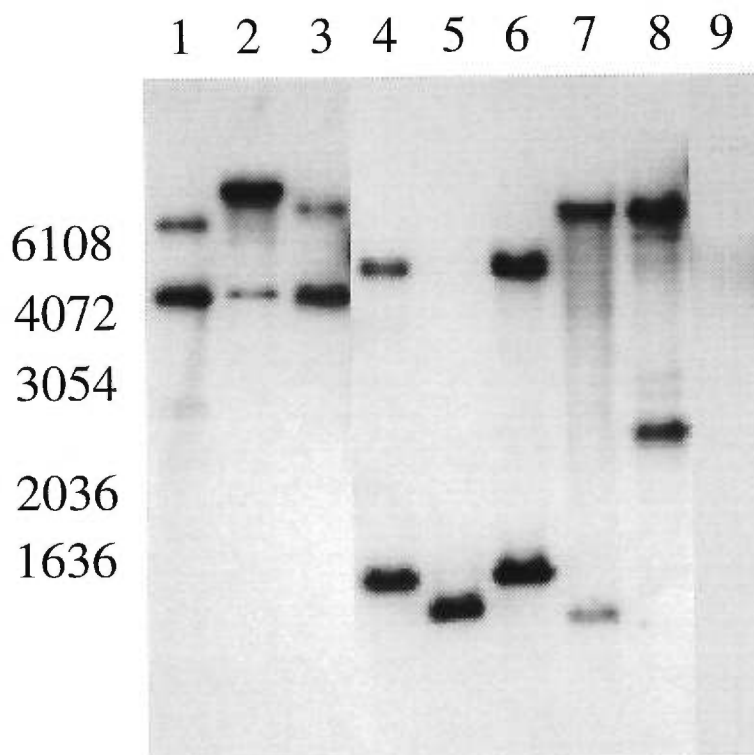


Fig. 4. Random insertion of the *Tn10* element in the *A. pleuropneumoniae* LPS mutants as determined by Southern blot analysis. Lane 1, mutant #1.1; lane 2, mutant #5.1; lane 3, mutant #15.1; lane 4, mutant #24.1; lane 5, mutant #27.1; lane 6, mutant #36.1; lane 7, mutant #44.1; lane 8, mutant #51.1;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

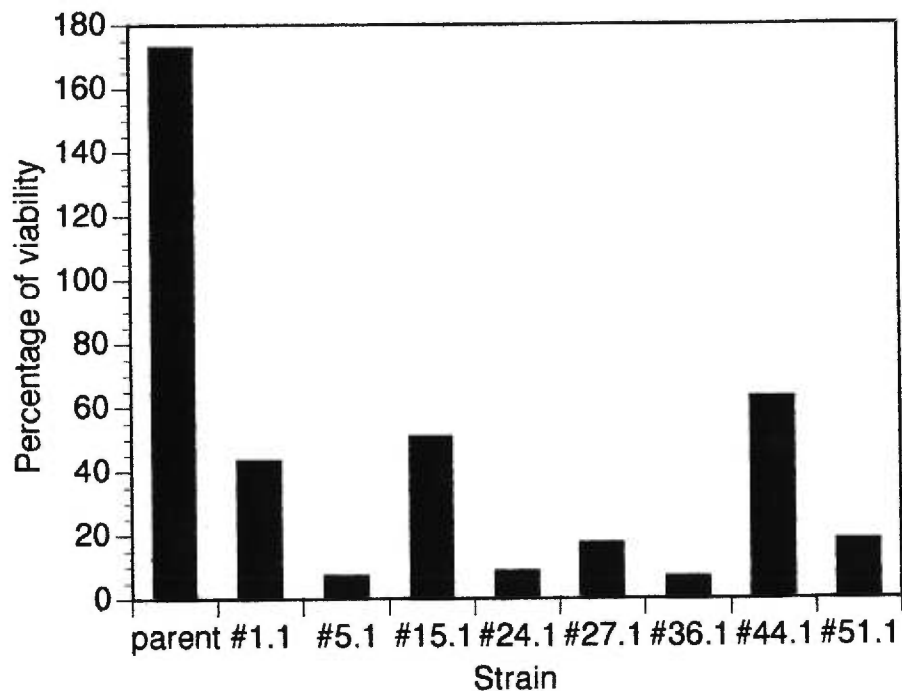


Fig. 5. Serum resistance of *A. pleuropneumoniae* parent strain and LPS mutants. The bacteria were incubated with 90% normal pig serum for 3 h. Percentage of viability is expressed as the mean of two experiments. The parent strain even multiplied in the serum during the period of incubation.

RBS *galU*

1 CAAAATCATTAGGGGATTCATCAGTGCTATGCACCTTGTAAGGGATTATGTAATGAAAGTAATTATTCGGTAGC

76 GGGTTTAGGTACGCGAATGCTTCTCGCAACAAAAGCGATTCCAAAAGAAATGCTGACGATTGCGGATAAACCGCT

151 TATTCAATATATCGTGAACGAATGTGTAGCGGCTGGTATTAAGAGATCGTATTAGTGACTCATTCTTCAAAAA

226 TGCTATCGAAAACCATTTTGATACGCTTTTTGAACTTGAACACTATGTTGAAAAACGTGTTAAACGCCAATTATT

301 AGAAGAAGTGCCTCAATTGTGCCAAAAGACGTTACATTAATGCATGTACGTCAAGGTCAAGCTAAAGGTTTAGG

376 TCATGCGGTATTATGCGGTAGAGCTGTAGTCGGTAACGAACCTTTTGCACTCGTATTACCGGATGTAATTTTAGC

451 CGATTTTACTGCGAATCAAAAAACGGAAAACCTTGCGGCGATGATTAACGTTTCAACGAAACACAACATAGCCA

526 AATTATGGTTGCACCGGTACCGAGAGAAGATGTCAGCAGCTATGGCGTAGCGGATTGTGACGGTGTGAAATTCC

601 GGCAGGTGAAACTGCAAAAATCGTGAAAATGGTTGAAAACCGAGTGTAAGAAGCACCTTCTAATTTAGCGGT

676 TGTCGGTCGTTACGTATTCTCCGAGGATTTGGGATTTATTAGAGAAAACACCGGTTGGTGTAGGCGATGAGAT

751 CCAATTAACCGATGCTATTGATATGTTAATTGAGCAAGAAACGGTAGAAGCATTTTCATATGACAGGTCGTACTTT

826 CGACTGCGGGATAAAATTAGGTTATATGCAGGCATTTACCGAATATAGTTTACGTCATGATAAGTTCGGCAATAA

901 CTTTAAAGAATTTATTA AAAAATTAGCTAAAACGTTAT**TA**ACCAAGAATAACTAAGGACGCAATTAGCGTC**CTTAT**

976 ATTTTAGATAGTTTTTCTTCCAACCTTCAATAGCCTTTTGGCATTTCATCTTACGATATTCGGTTTCTTCAACT

1051 TGCTGTTGCCACATTATTTTTTCGTTCTCATTAGCAGCATAGCTTTTTTCTAATAACCAACTAATTTTTTCATTT

1126 AATGCCCTTAATGCCTTACGATATTCATTTAATCGACGGCAGGGGGAGGGCGTGAATGTTTTTGGGAATGAA

1201 AAAGACGTAGTAAATACTTCTCTAGCAGATAAATCCGCTTTTTCAAGCATAAAAACGGCATGATTTAACGCATCA

1276 AACTGGCGAAGAAGTTTGGTGGCATAGAAATCGGCGTAATCTTCCGTTGTTTGGTTGAGAAAGCAACTGTGCCGTG

1351 TGTATTATCTCTGTATAAAATCACTCACTTTTTTCTGATTTTGCGAAAAGAGATTCCTTTCACGATAAECTTCT

1426 TGCTCTAAAAAGGAGAAAATACCGTTAATTTTTGTTGAATAACTGAAGGAAGTCTGAAAACATAGTTAATTAC

ORF2

1501 ATGTGTTTTTCTATATTATAGAATGGTTCGGAACAATTGTAATGCGTTATTTATGTTAAAAAACAACCTAAAA

1576 ATTTACTTTTTTCCGGAAATGTGATTTCAAGTCAAAAAAATGCTTTATGGGAAAAGTTAATAAATATCAAGAA

1651 TTTAAGATAAAGTCATTATAATTCAATATGTTACGAATTACCTAAAAATGGAGTATATAACCATTTTTTAAACGT

1726 TTATTGTTTTTTAAATCAAAAAACAATGTAACCATTTGTTTTATTATTGTTTTTGGTTTATTTCAAAGAGAGA

1801 GTTTACCTATTGACATAGATAAATGATTTGCCATTATTCACCTCGCAATCAGCATTTACTTAACTTCCATAAGT

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

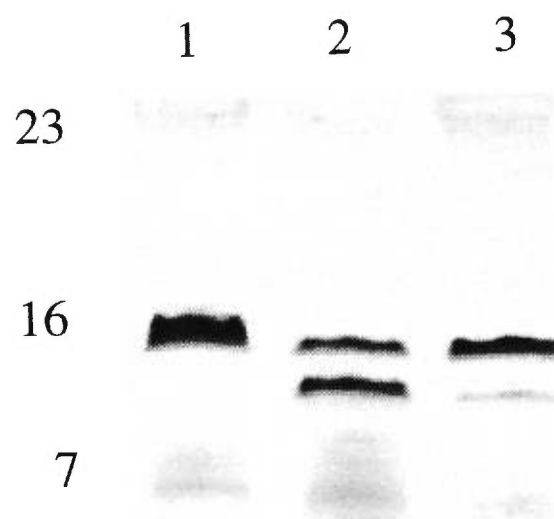


Fig. 7. Silver-stained Tricine-SDS-PAGE profiles of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 Nal^r (lane 1), LPS mutant #5.1 (lane 2), and mutant #5.1 complemented in trans with plasmid pJFF224-XN::*galU* (lane 3). Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.

Annexe 3

Article

Isolation and characterization of an acapsular mutant of
Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1

S. Rioux, C. Galarneau, J. Harel, M. Kobisch, J. Frey,
M. Gottschalk et M. Jacques.

(Soumis pour publication)

Dans ce travail, j'ai effectué le clonage et le séquençage du gène muté
et j'ai participé à la rédaction du manuscrit.

Isolation and characterization of an acapsular mutant
of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1

Stéphane Rioux¹, Catherine Galarneau¹, Josée Harel¹, Marylène Kobisch²,
Joachim Frey³, Marcelo Gottchalk¹, and Mario Jacques^{1*}

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, and Département
de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de
Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6¹; Unité de recherche de
mycoplasmodologie et bactériologie, Centre National d'Etudes Vétérinaires et
Alimentaires, BP 53, 22440 Ploufragan, France²; Institute for Veterinary
Bacteriology, University of Berne, Laenggassstrasse 122, CH-3012 Berne,
Switzerland³.

Short title: Capsule mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

*Corresponding author: Dr M. Jacques, Département de pathologie et
microbiologie, 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: [REDACTED]

ABSTRACT

The capsular polysaccharides (CPS) play a major role in virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia. The purpose of the present study was to isolate a mutant in CPS biosynthesis by using a mini-Tn10 transposon mutagenesis system and evaluate its adherence to host cells. One mutant (#33.2) apparently did not possess CPS as it did not react with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 capsular antigen. Absence of capsule was confirmed by flow cytometry and also by transmission electron microscopy after polycationic ferritin labeling. The gene affected by mini-Tn10 in CPS mutant #33.2 is *cpxC*. CpxC is a protein involved in polysaccharide transport across the cytoplasmic membrane during CPS biosynthesis. Use of piglet tracheal frozen sections indicated that the CPS mutant #33.2 adhered significantly ($p = 0.0001$) more than the parent strain. The CPS mutant was resistant to pig serum. Acapsular mutant #33.2 was less virulent in pigs than the parent strain and after an experimental infection no mortality was recorded. This CPS mutant is the first *A. pleuropneumoniae* mutant in a CPS transport gene. It is also the first time that adherence of a CPS mutant of *A. pleuropneumoniae* is evaluated. In summary, the absence of CPS resulted in a significant increase in adherence of *A. pleuropneumoniae* indicating that CPS are not involved in adherence but rather mask, at least in part, the adhesins.

Key Words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Capsule, Mutant, Adherence, Virulence, Complement resistance

INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae is the causative agent of porcine pleuropneumonia, an acute or chronic infection characterized by hemorrhagic, fibrinous, and necrotic lung lesions. The disease is highly contagious and causes tremendous economic loss to the swine industry (Nicolet). Twelve serotypes of *A. pleuropneumoniae* based on capsular antigens have been recognized (Nielsen). In Québec, serotypes 1, 5, and 7 are the most predominant (Mittal). At the present time, the pathogenesis of porcine pleuropneumonia is not completely understood but the hemolytic and cytotoxic RTX toxins have been shown to be major virulence factors (Frey). In addition, we previously demonstrated that lipopolysaccharides (LPS) play a major role in adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells and mucus (Bélanger 1990, 1992; Jacques 1996; Paradis) and that LPS bind pig hemoglobin (Archambault; Bélanger 1995). The capsular polysaccharides (CPS) of *A. pleuropneumoniae* also appear to contribute to virulence (Inzana 1991; Tascon 1996; Haesebrouck).

The CPS layer of *A. pleuropneumoniae* is 80 to 230 nm thick depending on serotype when visualized by electron microscopy after stabilization with serotype-specific polyclonal or monoclonal antibodies and staining with ruthenium red (Jacques 1988, 1997). The CPS of *A. pleuropneumoniae* has antiphagocytic properties and is assumed to be the main bacterial shield against host humoral defenses (Inzana 1988, Rycroft and Cullen, 1990; Ward 1994, 1998). The CPS composition and structure of all 12 serotypes have been determined by chemical and nuclear magnetic resonance methods (Perry *et al.*, 1990). The genes involved in *A. pleuropneumoniae* serotype 5a CPS

export (*cpx*) were identified by Ward and Inzana (1997). The DNA region involved in CPS export consists of four contiguous genes arranged in the order *D*, *C*, *B*, and *A*. This region had a high degree of homology to the group II capsule export genes of *Haemophilus influenzae* type b (*bexDCBA*) and *Neisseria meningitidis* group B (*ctrABCD*), and to a lesser extent *Escherichia coli* K5 (*kpsE* and *KpsMT*) (Ward and Inzana, 1997). The proteins CpxC, CpxB, and CpxA may be components of a group of ATP-binding cassette transporters involved in polysaccharide export across the cytoplasmic membrane, while the protein CpxD may be an outer membrane lipoprotein involved in CPS transport across the outer membrane. More recently, the genes involved in *A. pleuropneumoniae* serotype 5a CPS biosynthesis (*cps*) were identified by the same group (Ward *et al.* 1998). The DNA region involved in the CPS biosynthesis consists of four contiguous genes *cps5A*, *cps5B*, *cps5C*, and *cps5D*. Cps5A, Cps5B, and Cps5C shared low homology with several bacterial glycosyltransferase involved in the biosynthesis of LPS or CPS. Cps5D however had high homology with KdsA proteins from other gram-negative bacteria (Ward 1998).

Acapsular mutants of *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 or 5 have been obtained following chemical mutagenesis with ethyl methanesulfate (Inzana *et al.*, 1993) or by serial passages *in vitro* (Inzana 1987; Rosendal and MacInnes, 1990). These acapsular mutants were less virulent in pigs. Acapsular mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 5 were also efficiently killed by normal swine serum (Ward and Inzana, 1994). However, these mutants were genotypically not characterized. Recently, a serotype 5a mutant with a deletion in genes *cps5ABC* was reported (Ward *et al.* 1998). This mutant was incapable of synthesizing CPS and was avirulent in pigs. On

going studies on surface components of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 are aimed at determining their role in pathogenesis with a special emphasis on bacterial colonization of the porcine respiratory tract. Thus, the purpose of the present study was to isolate and characterize a CPS mutant of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 using mini-Tn10 transposon mutagenesis and determine some of its biological properties including its ability to adhere to porcine respiratory tract cells.

RESULTS

Isolation of an acapsular mutant. In a previous study aimed at generating LPS mutants, we obtained 109 mutants which were unable to grow in the presence of the hydrophobic antibiotic novobiocin. Among these 109 novobiocin sensitive mutants, 7 were indeed LPS mutants (unpublished data). The remaining 102 mutants were analyzed by immunoblotting using the monoclonal antibody 1.5 C5 F4, which is directed against an epitope located in capsular polysaccharides of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (Lairini 1995). One mutant (#33.2) apparently did not possess CPS as it did not react with the monoclonal antibody 1.5 C5 F4 (Fig. 1). This result was confirmed by flow cytometry analysis using the same monoclonal antibody. Fig. 2 shows representative flow cytometry profiles of whole cells of the parent strain *A. pleuropneumoniae* 4074 NaI^r and acapsular mutant #33.2. The relative fluorescence associated with cells of mutant #33.2 was identical to control cells (left peaks in Fig. 2A and 2B) not incubated with monoclonal antibodies against CPS. In addition, the parent strain and the CPS mutant #33.2 were examined by electron microscopy after polycationic ferritin labelling to confirm the presence or the absence of capsular material. The parent strain was, as expected, covered with a dense layer of ferritin granules of 60-100 nm, whereas the CPS mutant #33.2 was totally devoid of capsular material (Fig. 3). The use of polycationic labelling enabled us to conclude that mutant #33.2 is unable to synthesize CPS and has not only lost the epitope recognized by monoclonal antibody 1.5 C5 F4. The CPS mutant #33.2 was kanamycin resistant and ampicillin sensitive, indicating that it resulted from a transposition event and not a plasmid co-integration event.

PCR amplification and Southern hybridization. The amplification of the transposon was done by PCR using the transposon-specific primers. The CPS mutant showed the expected 836 bp product and thus carried the mini-Tn10 (data not shown). Chromosomal DNA from CPS mutant was digested with *Hind*III (which cuts the transposon at a single site) and analyzed by Southern blotting with specific DIG-labelled probe to assess the number of copies of the transposon present. The presence of two bands indicates that the CPS mutant carried a single insertion of the mini-Tn10 (Fig. 4). The same results were obtained by Southern blotting after digestion with *Xho*I (which cuts the transposon once) or *Eco*RI (which does not cut the transposon) (data not shown).

Identification of the gene affected by mini-Tn10 in the CPS mutant #33.2. To identify the gene affected, we cloned and sequenced the chromosomal region flanking the mini-Tn10 insertion. Chromosomal DNA from mutant #33.2 was digested with *Eco*RI and cloned in pBR325 using the kanamycin-resistance cassette of the mini-Tn10 to detect recombinants containing the transposon and the flanking chromosomal DNA from *A. pleuropneumoniae*. We sequenced (GenBank accession numbers XXXXX) approximately 7.4 kb and identified 3 ORFs. The deduced amino acid sequence from the nucleotide sequence showed a very high homology (97, 100, and 98 % respectively) with *cpxCBA* genes of *A. pleuropneumoniae* serotype 5a. Upstream of these genes, an additional 1026 bp were sequenced. This short stretch of DNA showed high homology with *cpxD* of *A. pleuropneumoniae* serotype 5a (96 % identity in a stretch of 24 amino acids). Thus, *cpxDCBA* genes and genes organization seem to be very conserved between *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (this work) and serotype 5a (Ward 1997). A palindromic sequence,

which may function as a rho-independent transcription termination signal, was identified 13-bp downstream from the stop codon of *cpxA*, as observed previously in *A. pleuropneumoniae* serotype 5a (Ward and Inzana 1997). Sequencing results also indicated that the transposon had inserted 921 bp within the 5'-end of *cpxC*.

LPS profiles. Whole-cell lysates were treated with proteinase K, run on an SDS-PAGE, and silver stained for examination of the LPS profiles. We found that the CPS mutant #33.2 had profiles identical to the profiles of the parent strain (Fig. 5A). These results were confirmed by immunoblotting (Fig. 5B) and by flow cytometry (data not shown).

Serum resistance. The parent strain 4074 Nal^r and CPS mutant #33.2 were examined for survival in 90% normal pig serum. The parent strain as well as the CPS mutant were serum-resistant and multiplied in the serum during the period of incubation (Fig. 6). A serum-susceptible strain of *E. coli* O115 (strain 2) was rapidly eliminated within 1 h after inoculation of serum, indicating adequate complement components (Fig. 6). The heat-inactivated serum also permitted bacterial survival (data not shown).

Adherence assay. The adherence of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 Nal^r and the CPS mutant #33.2 to piglet tracheal frozen sections was evaluated. For the parent strain, the average number of bacterial cells adhering to a tracheal section was 138 ± 57 . Interestingly, the average number of adherent bacterial cells of CPS mutant #33.2 was significantly ($p = 0.0001$) increased to 1943 ± 45 .

Virulence in pigs. The virulence of CPS mutant #33.2 and the parent strain 4074 Nal^r was evaluated in pigs. After challenge with mutant #33.2, no mortality was recorded, while after challenge with the parent strain 4074 Nal^r, 100 % mortality was observed after 72 hours (Table 1). A necropsy was done on all the pigs, with particular attention to the lung lesions. Upon macroscopic examination, fibrino-hemorrhagic pleuropneumonia, compatible with *A. pleuropneumoniae* infection (Dungworth 1993) was observed in all pigs infected with the parent strain 4074 Nal^r and only in 43 % of the pigs infected with mutant #33.2 (Table 1). In addition, the control pigs infected with the parent strain 4074 Nal^r showed more extensive lesions than those infected with mutant #33.2 (Table 1). *A. pleuropneumoniae* was isolated from the lungs of all pigs infected with the parent strain 4074 Nal^r and only in 29 % of the pigs infected with mutant #33.2 (Table 1). It is worth noting that the growth curves in liquid culture for both the parent strain and the CPS mutant #33.2 were identical (data not shown) which suggests that the virulence of the parent strain was not a factor of more abundant growth.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Using an isogenic CPS mutant obtained by transposon mutagenesis, we provide evidence that CPS is an important virulence factor of *A. pleuropneumoniae* serotype 1. This mutant, that did not react with the monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 capsular antigen, was named #33.2. Nucleotide sequence analysis of CPS mutant #33.2 indicated that the mini-Tn10 was inserted into of the *cpxC* gene. The CpxC is a cytoplasmic membrane protein that has a substantial periplasmic domain and is proposed to serve as the second component of a protein complex involved in polysaccharide transport across the cytoplasmic membrane (Ward and Inzana, 1997). It is interesting to note that the CPS transport genes *cpxDCBA* as well as their organization are well conserved between *A. pleuropneumoniae* serotype 1 and serotype 5a (Ward and Inzana 1997). Indeed, Ward and Inzana (1997) have shown that a *cpxCB* probe from *A. pleuropneumoniae* serotype 5a hybridized with DNA of *A. pleuropneumoniae* of serotype 1, 2, 5, 7, and 9. Kroll *et al.* (1990) obtained CPS mutants of *H. influenzae* type b after deletions in *bexC* gene, homologous to *cpxC* of *A. pleuropneumoniae*. Ward *et al.* (1998), for their part, obtained a CPS mutant of *A. pleuropneumoniae* serotype 5a after deletion of *cps5ABC*, genes involved in CPS biosynthesis, but were unable to generate a mutant in *cpx* genes (Ward and Inzana 1997).

In the present study, we were interested in evaluating the adherence of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 Nal^r and of the CPS mutant #33.2 to host cells. For the CPS mutant #33.2, the average number of adherent bacteria cells was significantly increased (about 20X) compared to the parent strain.

These observations confirm our previous results indicating that capsular polysaccharides are not responsible for adherence (Bélanger *et al.* 1990, Jacques 1991) but rather mask some of the adhesive molecules present at the cell surface. Jacques *et al.* (1991), using porcine frozen lung sections, showed that *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 and 5 noncapsulated variants adhered 7 to 10 times better than their capsulated parent strains, while Bélanger *et al.* (1992; 1994) found that *A. pleuropneumoniae* isolates representing serotypes 1, 2, 5, and 7 with a thick capsule layer had low affinity for porcine respiratory mucus whereas isolates with thinner layer of capsular material showed various degrees of affinity for porcine respiratory mucus. The reduction of adherence by capsule has been reported for other members of the *Pasteurellaceae* such as *H. influenzae* (St-Geme *et al.*, 1991; Virji *et al.* 1991) and *Pasteurella multocida* (Jacques *et al.* 1993), and for other gram-negative bacteria such as *Klebsiella pneumoniae* (Favre-Bonte *et al.* 1999), *Neisseria meningitidis* (Stephens 1993, Virji 1992, 1993), and *E. coli* (Runnels 1984).

Ward and Inzana (1994) have shown that CPS is a major virulence factor involved in resistance of *A. pleuropneumoniae* serotype 5a to bactericidal antibodies and complement. Therefore, we have examined serum resistance properties of CPS mutant #33.2 and compared them to the parent strain. The parent strain and CPS mutant were serum resistant and multiplied in 90% normal pig serum. These results are in contrast to Ward and Inzana (1994) and Ward *et al.* (1998) who reported that spontaneous, chemically-induced, or knockout capsule mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 5a were killed by normal serum. Many reasons can explain this discrepancy, the first being the strains used. Inzana's group used an *A. pleuropneumoniae* serotype 5a strain while we used an *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain;

the chemical structure of the LPS of the serotypes 1 and 5a are different (Perry 1990) and thus, might have an influence on serum resistance. We previously demonstrated that the LPS were involved in resistance of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (unpublished data). In *E. coli*, of the more than 80 types of K-antigens and more than 160 different O-antigens, only certain O and K antigens provide resistance to serum (Burns and Hull 1998). With uropathogenic *E. coli* O75:K5, O75 antigen is more important than the K5 antigen in serum resistance (Burns and Hulls 1998). A second reason, might be the source of serum used for the bactericidal tests; we used pig normal serum while Ward *et al.* (1998) used precolastral calf serum. Finally, the possibility of mutations in other genes of their spontaneous and chemically-induced capsule mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 5a, although this explanation obviously does not stand for their recently obtained knockout mutant.

Finally, *A. pleuropneumoniae* *cpxC* mutant #33.2 was markedly less virulent in pigs than the parent strain. These results are in agreement other studies which showed that acapsular mutants of *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 and 5a were also less virulent in pigs (Inzana *et al.* 1993; Rosendal and MacInnes 1990; Ward *et al.* 1998); CPS of *A. pleuropneumoniae* are without a doubt an important virulence factor.

Mutant #33.2 is, to the best of our knowledge, the first *A. pleuropneumoniae* mutant in a CPS transport gene; attempts to generate acapsular mutants by allelic replacement of *cpxBA* containing a kanamycin cassette failed (Ward and Inzana 1997). It is also the first time that *in vitro* adherence of *A. pleuropneumoniae* CPS mutant is evaluated. In summary, the

absence of CPS resulted in a significant increase in adherence of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 suggesting that capsular material masks, at least in part, outer membrane components which are involved in adherence.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The nalidixic acid-resistant mutant (4074 Nal^r) obtained from *A. pleuropneumoniae* reference strain representing serotype 1 (strain 4074) was grown on BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI) agar plates supplemented with 15 µg of NAD per ml and 30 µg of nalidixic acid (Nal) per ml. *Escherichia coli* S17.1 λ pir (pLOF/Km) was grown on LB agar plates supplemented with 50 µg of kanamycin (Km) per ml while *E. coli* HB101 was grown on LB agar plates. Transpositional mutants were grown on BHI agar plates supplemented with 15 µg/ml of NAD, 30 µg/ml of Nal, and 75 µg/ml of Km. Plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 18-24 h.

Transpositional mutagenesis. Mutagenesis in *A. pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative (de Lorenzo 1994) was done as described by Tascón *et al.* (1993) with some modifications. In brief, overnight cultures of donor and recipient strains were diluted in 0.85% NaCl to give an A_{650nm} of 0.8. One hundred µl of each bacterial suspension were mixed in 5 ml of sterile 10 mM MgSO₄ and then filtered through a Millipore type HA 0.45 µm membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA). Mating filters containing donor and recipient bacteria were placed onto BHI-NAD agar plates (cells side up), and incubated at 37°C for 4 h. The membrane was then transferred to BHI-NAD agar plates containing 100 µM IPTG to induce expression of the transposase. After incubation at 37°C for 15-18 h, the bacterial cells were resuspended in sterile NaCl (0.85%), and appropriate dilutions were plated on the counterselecting medium (BHI-NAD-Nal-Km).

Selection of mutants. Different bacterial colonies from a master plate were inoculated onto BHI-NAD-Nal-Km agar plates supplemented with 2 µg of novobiocin per ml. After incubation, the colonies that did not grow in the presence of this hydrophobic antibiotic were selected from the master plate. These novobiocin-sensitive mutants were then analyzed by immunoblotting using monoclonal antibodies against CPS.

SDS-PAGE and Immunoblotting. The whole-cell proteinase K-treated samples were separated by SDS-PAGE using a 10% or 12.5% polyacrylamide separating gel as described previously (Rioux *et al.* 1997). Gels were either stained with the silver-staining procedure of Tsai and Frasch (1982) or transferred to nitrocellulose for immunoblotting as described by Towbin *et al.* (1979). The samples separated by SDS-PAGE were transferred using a mini Trans-Blot apparatus (Bio-Rad Laboratories) to a nitrocellulose membrane (0.2 µm; Bio-Rad Laboratories) for 1 h at 100 V. The membranes were first incubated for 1 h with a blocking solution consisting of 2% (wt/vol) skim milk in TSB, followed by an overnight incubation at 4°C with the monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 capsular antigen (1.5 C5 F4) or serotype 1 O-antigen (5.1 G8F10). The membranes were then washed in TSB, and incubated for 1 h with a goat anti-mouse IgG + IgM (H+L) horseradish peroxidase conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories). The reaction was revealed by addition of 4-chloro-1-naphthol and hydrogen peroxide (Sigma) as described by Hawkes (1982).

DNA techniques. Restriction and modification enzymes were purchased from Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Québec, Canada) and were used according to the supplier's specifications. Plasmid DNA was prepared with the Plasmid

maxi kit and QIAprep spin miniprep kit (Qiagen Inc, Mississauga, Ontario, Canada). Chromosomal DNA was purified using the guanidium thiocyanate method from Pitcher *et al.* (1989). Briefly, cells were lysed with GES-buffer (5 M guanidine thiocyanate, 100 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% sodium-lauryl-sarcosinate) and proteins were precipitated with 7.5M ammonium acetate. Phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1; Sigma) was used to remove remaining exonucleases and lipoproteins from the DNA. Finally, the DNA was precipitated with isopropanol.

PCR amplification of the transposon mini-Tn10 was made using the oligonucleotides primers KMTN903-L (5' AAGGGGTGTTATGAGCCATATT 3') and KMTN903-R (5' CCAATTCTGATTAGAAAAAGTC 3') at annealing temperature of 53°C using standard conditions (Ausubel 1990). Labelling of a specific probe for the transposon with digoxigenin (DIG) was made in a standard PCR which was supplemented with 50 µM digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada) using plasmid pLOF/Km as template and the same primers. Southern blot analysis with *Hind*III, *Xho*I or *Eco*RI-digested genomic DNA was done using a standard protocol (Ausubel 1990) with the following washing conditions: two washes for 5 min at room temperature with 2 X SSC containing 0.1% SDS, and twice for 15 min at 68°C with 0.2 X SSC containing 0.1% SDS. The DIG-labelled probe was detected using phosphatase-labelled anti-DIG antibodies with CDP-Star as substrate (Boehringer Mannheim) according to the manufacturer's instructions.

Identification of the mutated gene was performed as follows. Chromosomal DNA was digested with restriction enzyme *Eco*RI and ligated into pBR325 plasmid, digested with the same enzyme. The recombinant

plasmids were transformed into *E. coli* HB101 prepared by CaCl₂/MOPS transformation following procedure C of the U.S.E. mutagenesis kit (Pharmacia Biotech). The kanamycin-resistance cassette of the mini-Tn10 was used to detect recombinant containing the transposon and the flanking chromosomal DNA from *A. pleuropneumoniae* on LB agar plates supplemented with 50 µg of Km per ml. Sequencing was then performed using the primers EcoRI-REV (5' GGT TTT CAC CGT AAC ACG C 3') and EcoRI-FOR (5' AAG CAC AAG TTT TAT CCG G 3') by using an ABI model 373A stretch DNA sequencer. Subsequent primers were based on the obtained sequence. DNA sequence information was analyzed with programs from University of Wisconsin Genetics Computer Group software (Devereux 1984) using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases.

Electron microscopy. Bacterial cells were prepared for transmission electron microscopy after polycationic ferritin labeling, a method which allows good preservation of capsular material, as described previously by Jacques *et al.* (1988).

Flow cytometry. Cells of *A. pleuropneumoniae* were incubated with either monoclonal antibody against serotype 1 capsular antigen (1.5 C5 F4) or serotype 1 O-antigen (5.1 G8F10) and analyzed by flow cytometry as described previously (Paradis). The flow analysis was performed with a FACStar flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) equipped with a water-cooled 2-W argon ion laser operating at 488 nm and a 200-mW light output.

Adherence assay. The adherence assay to frozen tracheal sections was performed as described by Paradis *et al.* (1994). Briefly, bacteria were diluted in PBS containing 1% (wt/vol) bovine serum albumin and 0.01% (vol/vol) Tween 20 to give an $A_{540\text{nm}}$ of 0.2. A volume (100 μl) of bacterial suspension was pipetted onto piglet tracheal frozen sections on glass slides and incubated in a moist chamber at 37°C for 2 h. After intensive washing in distilled water, sections were stained with the Diff-Quik stain (Baxter Healthcare Corporation, McGraw Park, IL.) according to the manufacturer's instructions. Upon microscopic examination, the number of bacterial cells attached to the tracheal epithelium was determined at a magnification of X1,000. Results were compared for statistical significance by Student's t test.

Serum bactericidal assay. A modification of the serum bactericidal assay procedure described by Ward and Inzana (1994) was used. A 6-h old culture of *A. pleuropneumoniae* was harvested and washed at room temperature with PBS containing 0.15 mM CaCl_2 and 0.5 mM MgCl_2 (PBS^{++}). Bacteria were diluted to approximately 5×10^4 CFU/ml in PBS^{++} . A volume of 50 μl of the bacterial suspension was added to 450 μl of normal swine serum and incubated at 37°C. Control tubes contained heat-inactivated serum. Viable-cell counts were estimated at 0, 1, 2 and 3 h by plating 50 μl of this bacterial suspension in serum on BHI-NAD agar. Plates were incubated overnight at 37°C and the percentage of viability was determined according to the equation: (number of colonies after incubation/number of colonies before incubation) X 100. A bacterial strain [*E. coli* O115 strain 2 (Ngeleka 1992)] known to be serum-sensitive was also used as an additional control.

Growth curves. BHI broth (50 ml vols) without antibiotics was inoculated with 0.5 ml of a bacterial suspension containing 10^8 CFU/ml and incubated at 37°C with agitation (100 rpm). Growth was monitored spectrophotometrically at 540 nm at 0, 4, 8, 24, and 48 h.

Experimental pig infection. Twenty specific-pathogen-free, 9-week-old piglets reared in a pathogen-free environment were used. One group of six piglets received BHI broth supplemented with 15 µg of NAD per ml and 30 µg of nalidixic acid (Nal) per ml, one group of seven piglets received the parent strain 4074 Nal^r, and one group of seven piglets received CPS mutant #33.2. These groups were housed separately. Piglets were challenged once intranasally with a total of 1 ml (0.5 ml per nostril) of a 6-h old culture containing approximately 1×10^6 CFU. Animals were monitored daily for a rise in body temperature and dyspnea. Pigs were euthanized 14 days after the inoculation. All pigs were examined thoroughly at necropsy, including macroscopic and microscopic lesions, and reisolation of challenge bacteria. Lungs were cultured for the presence of *A. pleuropneumoniae* parent strain using BHI-NAD-Nal and mutant strain using BHI-NAD-Nal-Km. Samples of lungs were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and 6-µm thick sections were cut and stained with hematoxylin, phloxin and saffron.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (OGP0003428) to M. J. S. R. and C. G. are the recipient of a studentship from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche. We are indebted to V. de Lorenzo (Centro de Investigaciones Biológicas, Velázquez 144, 28006 Madrid, Spain) for the generous gift of plasmid pLOF/Km. We are grateful to Bernadette Foiry for performing the electron microscopy and to Serge Sénéchal for his expertise in flow cytometry.

REFERENCES

- Nicolet J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ, Eds. *Diseases of swine*, 7th edn. Ames: Iowa State University Press, 1992: 401-8.
- Nielsen R. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet Scand* 1986; **27**: 453-5.
- Mittal KR, Higgins R, Larivière S, Nadeau, M. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet Microbiol* 1992; **32**: 135-48.
- Frey J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol* 1995; **3**: 257-61.
- Bélanger M, Dubreuil D, Harel J, Girard C, Jacques M. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect Immun* 1990; **58**: 3523-30.
- Bélanger M, Rioux S, Foiry B, Jacques M. Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; **97**: 119-26.
- Jacques M. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol* 1996; **4**: 408-10.

Paradis SÉ, Dubreuil D, Rioux S, Gottschalk M, Jacques M. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect Immun* 1994; **62**: 3311-9.

Archambault M, Olivier M, Foiry B, Diarra MS, Paradis SÉ, Jacques M. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. *J Endotoxin Res* 1997; **4**: 53-65.

Bélangier M, Bégin C, Jacques M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun* 1995; **63**: 656-62.

Inzana TJ. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathogen* 1991; **11**: 305-16.

Tascón RI, Vázquez-Boland JA, Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Barbosa JI, Rodríguez-Ferri EF. Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiología SEM* 1996; **12**: 171-84.

Haesebrouck F, Chiers K, Van Overbeke I, Ducatelle R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiol* 1997; **58**: 239-49.

Jacques M, Foiry B, Higgins R, Mittal KR. Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol* 1988; **170**: 3314-8.

Jacques M, Gottschalk M. Use of monoclonal antibodies to visualize capsular material of bacterial pathogens by conventional electron microscopy. *Microsc. Microanal.* 1997; **3**: 234-8.

Inzana TJ, Ma J, Workman T, Gogolewski RP, Anderson P. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun* 1988; **56**: 1880-9.

Rycroft AN, Cullen JM. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. *Am J Vet Res* 1990; **51**: 1449-53.

Ward CK, Inzana TJ. Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994; **153**: 2110-21.

Ward CK, Lawrence ML, Veit HP, Inzana TJ. Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun* 1998; **66**: 3326-36.

Perry MB, Altman E, Brisson JR, Beynon LM, Richards JC. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of

Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae strains. *Serodiag Immunother Infect Dis* 1990; **4**: 299-308.

Ward CK, Inzana TJ. Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. *Infect Immun* 1997; **65**: 2491-6.

Inzana TJ, Todd J, Veit HP. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect Immun* 1993; **61**:1682-6.

Inzana T.J. Mathison B. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun* 1987; **55**: 1580-7.

Rosendal S, MacInnes JI. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1. *Am J Vet Res* 1990; **51**: 711-7.

Lairini K, Stenbaek E, Lacouture S, Gottschalk M. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet Microbiol* 1995; **46**: 369-81.

Dungworth DL. The respiratory system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, Eds. *Pathology of domestic animals*, 4th edn. San Diego: Academic press Inc, 1993:539-699.

Kroll JS, Loynds B, Brophy LN, Moxon ER. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. *Mol Microbiol* 1990; **4**: 1853-62.

Jacques M, Bélanger M, Roy G, Foiry B. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. *Vet Microbiol* 1991; **27**: 133-43.

Bélanger M, Dubreuil D, Jacques M. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 1994; **62**: 868-73.

St. Geme III JW, Falkow S. Loss of capsule expression by *Haemophilus influenzae* type b results in enhanced adherence to and invasion of human cells. *Infect Immun* 1991; **59**: 1325-33.

Virji M, Kayhty H, Ferguson DJP, Alexandrescu C, Moxon ER. Interactions of *Haemophilus influenzae* with cultured human endothelial cells. *Microb Pathog* 1991; **10**: 231-45.

Jacques M, Kobisch M, Bélanger M, Dugal F. Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. *Infect Immun* 1993; **61**: 4785-92.

Favre-Bonte S, Joly B, Forestier C. Consequence of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. *Infect Immun* 1999; **67**: 554-61.

Stephens DS, Spellman PA, Swartley JS. Effect of the (α 2-8)-linked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells. *J Infect Dis* 1993; **167**: 475-9.

Virji M, Makepeace K, Ferguson DJP, Achtman M, Sarkari J, Moxon ER. Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 1992; **6**: 2785-95.

Virji M, Makepeace K, Ferguson DJP, Achtman M, Moxon ER. Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* 1993; **10**: 499-510.

Runnels PL, Moon HW. Capsule reduce adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells of pigs. *Infect. Immun.* 1984; **45**: 737-40.

Burns SM, Hull SI. Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5. *Infect Immun* 1998; **66**: 4244-53.

de Lorenzo V, Timmis KN. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* 1994; **235**: 386-405.

Tascón RI, Rodríguez-Ferri EF, Gutiérrez-MartínCB, Rodríguez-Barbosa I, Berche P, Vázquez-Boland JA. Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. *J Bacteriol* 1993; **175**: 5717-22.

Rioux S, Bégin C, Dubreuil JD, Jacques M. Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr Microbiol* 1997; **35**: 139-44.

Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1982; **119**: 115-9.

Towbin H., Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 4350-4.

Hawkes R. Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. *Anal Biochem* 1982; **123**: 143-6.

Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbio* 1989; **8**: 151-6.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current protocols in molecular biology*. New York: Wiley Interscience, 1990.

Devereux J, Haerberli P, Smithies O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res* 1984; **12**: 387-95.

Ngeleka M, Harel J, Jacques M, Fairbrother JM. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K'V165':F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect Immun* 1992; **60**: 5048-56.

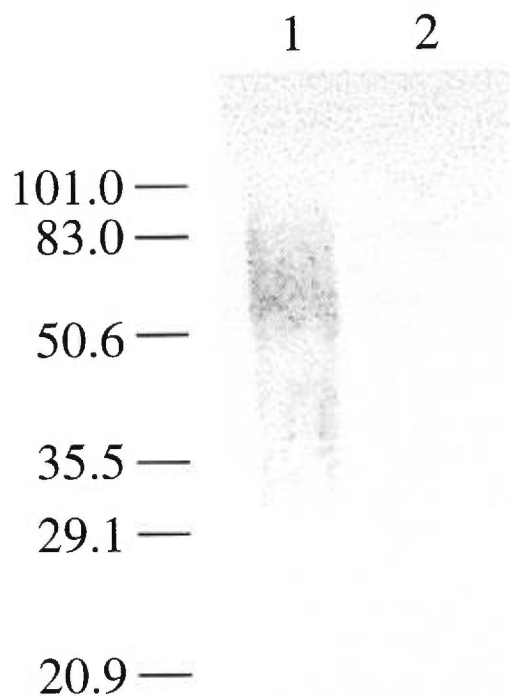


FIG. 1. Immunoblot of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI^r (lane 1) and CPS mutant #33.2 (lane 2). The immunoblot was probed with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 capsular antigen (1.5 C5 F4). Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.

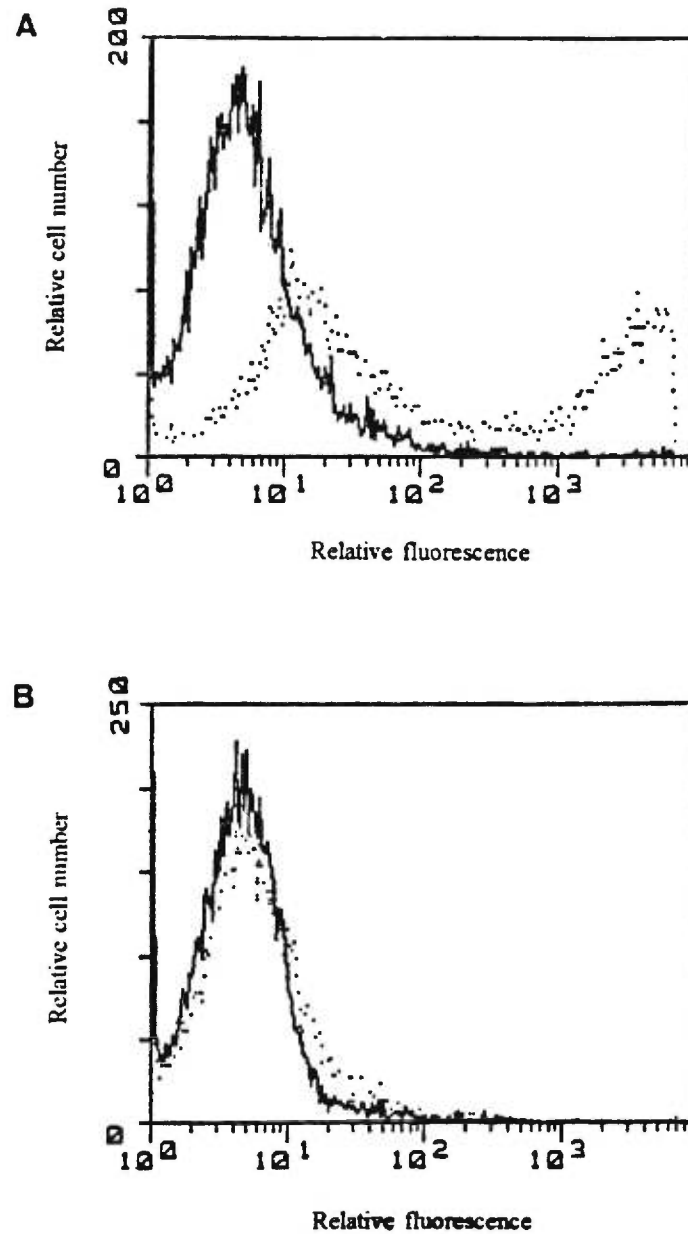


FIG. 2. Flow cytometry analysis of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI^r (A) and CPS mutant #33.2 (B). Cells were incubated with monoclonal antibody 1.5 C5 F4 and anti-mouse IgG FITC-conjugated antibody. The peaks in plain line represent control cells incubated with the anti-mouse IgG FITC-conjugated antibody.

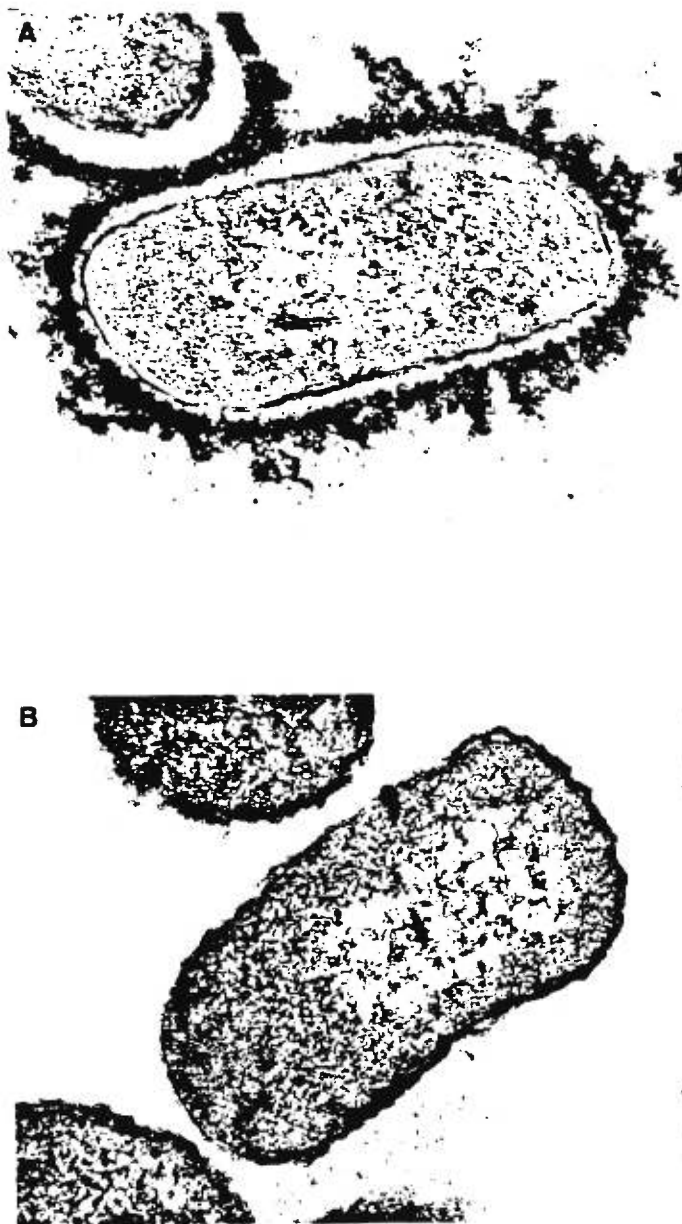


FIG. 3. Transmission electron micrographs of thin sections of cells of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 Nal^r (A) and CPS mutant #33.2 (B) labelled with polycationic ferritin. Bars, 200 nm.

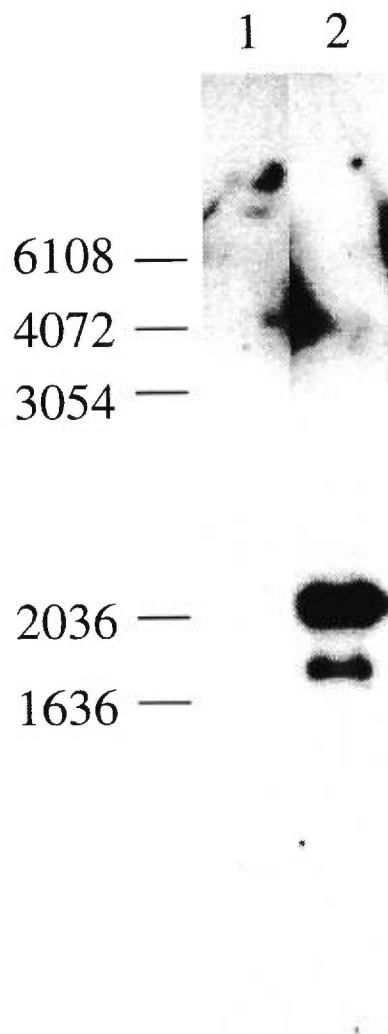


FIG. 4. Single insertion of the Tn10 element in *A. pleuropneumoniae* CPS mutant #33.2 as determined by Southern blot analysis. Lane 1, parent strain 4074 NaI^r; lane 2, CPS mutant #33.2. Molecular size standards (in kilobases) are indicated on the left.

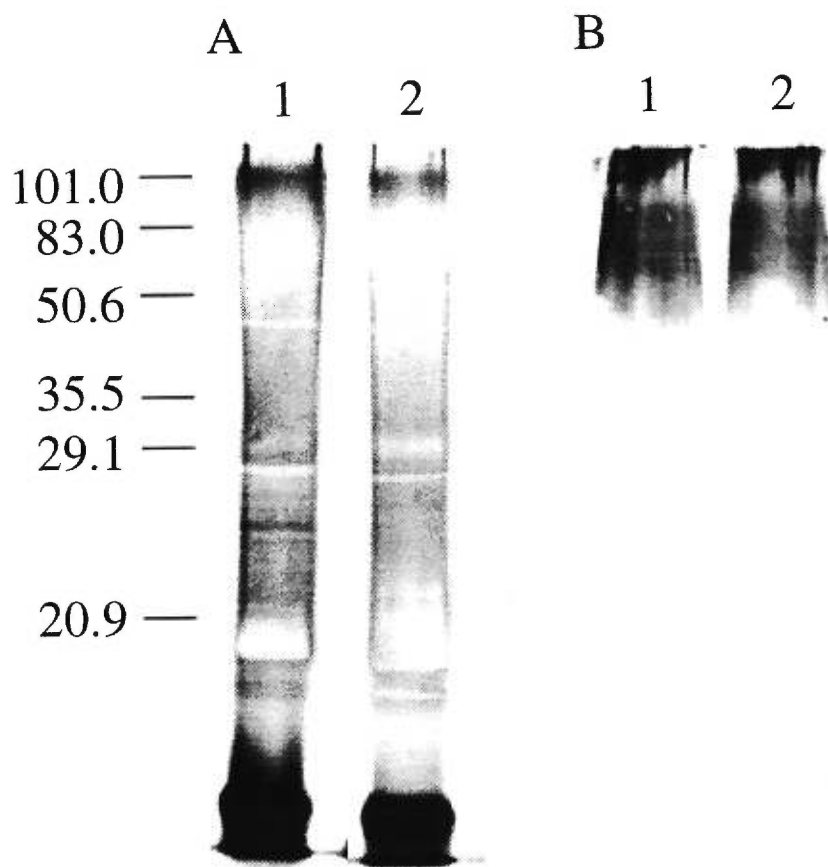


FIG. 5. Silver-stained SDS-PAGE profiles (A) and immunoblot (B) of whole-cell, proteinase K-treated preparations of *A. pleuropneumoniae* parent strain 4074 NaI^r (lane 1) and CPS mutant (lane 2). The immunoblot was probed with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.

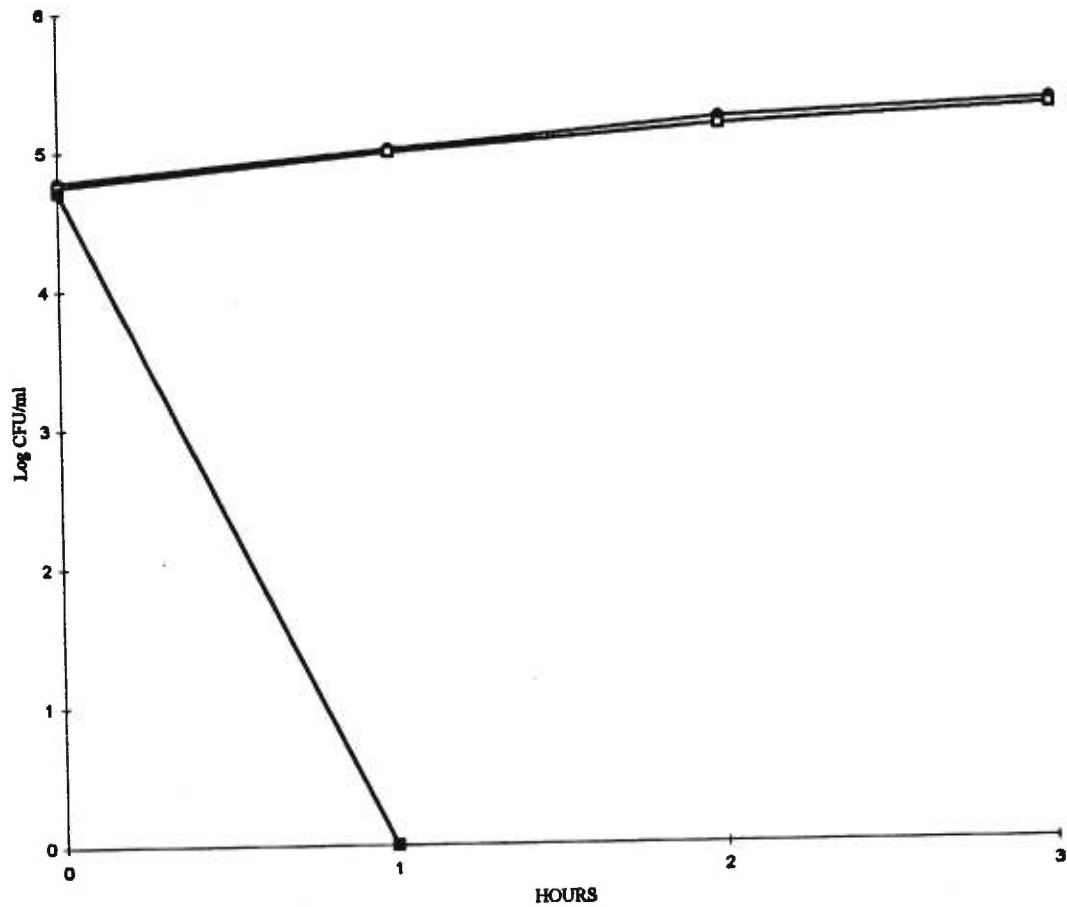


FIG. 6. Serum resistance of *A. pleuropneumoniae* parent 4074 NaI^r (●), CPS mutant (□), and *E. coli* O115 strain 2 (■). The bacteria were incubated with 90% normal pig serum. Survival and growth is expressed as the mean of two experiments.

Table 1. Virulence in pigs of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 parent strain 4074 NaI^r and CPS mutant #33.2

Group	Number of pigs (n)	Mortality (%)	Pigs with lung lesions (%) ^a	Lung lesions ^b	Isolation (%) ^c
Control	6	0	0	0	0
Parent strain 4074 NaI ^r	7	100	100	27.9 ± 12.2	100
CPS mutant #33.2	7	0	43	3.9 ± 5.7	28

^aMicroscopic examination of the pulmonary lesions revealed changes compatible with porcine pleuropneumonia.

^bRepresent area of pneumonic lesion. Values represent the mean ± SD.

^cStrain isolated from lung lesions.

Annexe 4

Résumé de conférence

Réduction de l'adhérence aux cellules du tractus respiratoire porcin de mutants LPS d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 1.

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

15^{ème} congrès de l'Association des Microbiologistes
du Québec, Institut Armand-Frappier, Laval, 14 novembre 1998.

Cette présentation m'a valu le premier prix décerné pour la
meilleure présentation écrite.

RÉDUCTION DE L'ADHÉRENCE AUX CELLULES DU TRACTUS
RESPIRATOIRE PORCIN DE MUTANTS LPS D'*ACTINOBACILLUS*
PLEUROPNEUMONIAE SÉROTYPE 1

C. GALARNEAU, S. RIOUX et M. JACQUES, Université de Montréal,
St-Hyacinthe, Québec, [REDACTED]

Actinobacillus pleuropneumoniae est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine. Nous avons déterminé 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 en utilisant la technique de mutagenèse par transposition à l'aide du mini-Tn10. Sept mutants ont démontré un phénotype rugueux, ne présentant pas de bandes de haut poids moléculaire sur SDS-PAGE et ne réagissant plus avec l'anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène-O d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1. Quatre mutants, exprimant les LPS de haut poids moléculaire, ont démontré une différence au niveau de la région du noyau oligosaccharidique et du lipide A lorsque visualisé par Tricine-SDS-PAGE. Deux autres mutants combinent les deux caractéristiques mentionnées. L'utilisation de coupes congelées de trachée de porcelet a permis de déterminer que les mutants rugueux adhéraient de façon similaire à la souche mère, tandis que les mutants au niveau du noyau oligosaccharidique adhéraient significativement moins. Le gène affecté par l'insertion du transposon dans un des mutants au niveau du noyau oligosaccharidique est *galU*, codant pour l'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransférase impliquée dans la biosynthèse du noyau oligosaccharidique chez d'autres bactéries Gram-négatif. La complémentation du mutant avec le gène sauvage a permis un retour au phénotype sauvage et un rétablissement complet de l'adhérence. Nos données suggèrent que la présence d'un noyau oligosaccharidique intact semble essentielle pour l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcine.

Annexe 5

Résumé de conférence

Reduced adherence to porcine respiratory tract cells of *Actinobacillus pleruopneumoniae* serotype 1 mutants.

C. Galarneau, S. Rioux, and M. Jacques.

48^{ème} Réunion Annuelle de la Société Canadienne des
Microbiologistes, University of Guelph, 14-17 juin 1998.

et

Fifth Conference of the International
Endotoxin Society, Santa Fe, NM, 12-15 septembre 1998.

Reduced Adherence to Porcine Respiratory Tract Cells of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 LPS Mutants

C. GALARNEAU*, S. RIOUX and M. JACQUES,
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, [REDACTED]

Actinobacillus pleuropneumoniae is the causative agent of porcine pleuropneumonia. We previously identified the lipopoly-saccharide (LPS) as the major adhesin of this microorganism. The purpose of the present study was to isolate and characterize LPS mutants by using a mini-Tn10 transposon mutagenesis system. Seven mutants appeared to possess a rough LPS as they did not express high-molecular-mass LPS bands in SDS-PAGE gels and did not react with a monoclonal antibody against *A. pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen when compared with the parent strain. Four mutants expressed the high-molecular-mass LPS bands, but as visualized by Tricine SDS-PAGE showed different patterns in the core-lipid A region than the parent strain. Two other mutants combined both characteristics. Use of piglet tracheal frozen sections indicated that the rough LPS mutants adhered similarly or in greater numbers than the parent strain. Interestingly, the LPS mutants with a modified core-lipid A region adhered significantly less than the parent strain. The gene affected by mini-Tn10 in one of the core-lipid A mutant is *galU*, the structural gene for UTP-glucose-1-phosphate uridylyl-transferase involved in LPS core biosynthesis of other gram-negative bacteria. Our data suggest that an intact core-lipid A region seems essential for adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells.

Annexe 6

Résumé de conférence

Evaluation of Tiamulin and Econor's effect on growth and production of virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*.

M. Jacques, S. Rioux, M. Archambault, B. Foiry,
C. Galarneau, and N. Y. Luki.

Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society,
Birmingham, England, 5-9 juillet 1998, p. 270.



EVALUATION OF THE EFFECTS OF TIAMULIN ("TIAMUTIN"®) AND VALNEMULIN ("ECONOR"®) ON THE GROWTH AND PRODUCTION OF VIRULENCE FACTORS OF ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE AND PASTEURELLA MULTOCIDA

M. Jacques, S. Rioux, M. Archambault, B. Foiry, C. Galameau, and N.Y. Luki
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S-7C6

Introduction

It is well known that antibiotics have different effects on bacteria at sub-minimal inhibitory concentrations (subMICs) (1,6). To alleviate the economic consequences of long term respiratory disease, extended antibiotic medication periods may be required. The evaluation of the effects of subMICs of an antibiotic on bacteria may provide additional information for the rational clinical use of an antibiotic in such situations. The purpose of the present work was to compare the effects of subMICs of tiamulin and of a new pleuromulin derivative, valnemulin (Econor), on the growth and expression of virulence factors of two of the most important swine respiratory tract pathogens, namely, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*. Although the pathogenesis of the diseases caused by these two microorganisms is not clearly understood, capsular polysaccharides, LPS, some OMPs and different toxins seem to be involved in virulence.

Materials and Methods

Bacterial isolates and MICs. Three isolates of *A. pleuropneumoniae* (one serotype 1, one serotype 2 and one serotype 5) and two isolates of *P. multocida* (one toxigenic capsular type D and one non-toxicogenic capsular type A) were grown on Mueller-Hinton agar plates or broth with (MIC/2, MIC/4, MIC/8) or without antibiotics. NAD (15 µg/ml) was added in media for growth of *A. pleuropneumoniae*. Organisms were also inoculated onto plates supplemented with 36 µg/ml EDDHA to obtain bacterial growth under conditions of iron limitation. All comparative studies were performed with tiamulin (tiamulin hydrogenfumarate) and the new pleuromulin derivative SDZ PMD 396 (Econor: valnemulin hydrochloride). The MICs of these antibiotics were determined by a standard agar dilution procedure for all bacterial isolates. The effects of subMICs (MIC/2, MIC/4, MIC/8) on bacterial growth and on the production of different virulence factors were then determined.

Effects of subMICs on growth. Mueller-Hinton broth (50 ml vols), with or without various concentrations of antibiotics were inoculated with 0.5 ml of a bacterial suspension containing 108 cfu/ml and incubated at 37°C with agitation (100 rpm). Growth was monitored spectrophotometrically at 540 nm at 0, 4, 8, 24 and 48 h (4).

Effects of subMICs on morphology. Control bacterial cells and cells exposed to antibiotics were prepared for transmission electron microscopy following polycationic ferritin labelling, a method which allows good preservation of capsular material (3). Thin sections were examined with a Philips 201 microscope at an accelerating voltage of 60 kV.

Effects of subMICs on protein profiles. The protein profile of control bacterial cells and cells exposed to antibiotics were examined after SDS-PAGE (5). To study the effect of subMICs on iron-regulated proteins, bacterial cells were grown under iron-restricted conditions and their protein profile determined by SDS-PAGE.

Effects of subMICs on toxin production. The toxin production of control bacterial cells and cells exposed to antibiotics was determined. Dermonecrotic toxin (DNT) production by *P. multocida* was evaluated

using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (Dako ELISA PMT Kit). The haemolytic activity of *A. pleuropneumoniae* (due to toxins ApxI and ApxII) was determined as described by Frey and Nicolet (2).

Results and Discussion

A good inhibitory activity of tiamulin against *A. pleuropneumoniae*, and of valnemulin against both *A. pleuropneumoniae* and *P. multocida* was observed, with MICs of 2 to 16 µg/ml. The effect of the two antibiotics used at MIC/2, MIC/4, or MIC/8 on bacterial growth was evaluated. The presence of tiamulin or valnemulin in the culture medium markedly reduced the growth of all isolates tested, even using a drug concentration as low as MIC/8. A prolonged lag phase was observed when bacterial cells were incubated with MIC/2 of one of these two antibiotics, indicating an effect on the initiation of growth.

Growth in the presence of subMICs of tiamulin or valnemulin greatly affected the morphology of *A. pleuropneumoniae* and *P. multocida*, and long filamentous cells were observed by transmission electron microscopy. In addition, the production of their capsule, which is considered an important virulence factor, was markedly reduced.

The expression of proteins and/or iron-regulated proteins was altered by subMICs of tiamulin or valnemulin in all isolates. Finally, the production of DNT by *P. multocida* was not affected by subMICs of tiamulin or valnemulin. However, the haemolytic activity of *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 and 5 isolates was markedly reduced by growth in the presence of subMICs of tiamulin or valnemulin.

This is the first study which deals with the effects of subMICs of tiamulin and valnemulin on two of the most important swine respiratory tract pathogens. Taken together, our results indicate that growth in the presence of low concentrations of tiamulin or valnemulin can reduce the expression of important molecules, such as capsular polysaccharides, iron-regulated proteins, and haemolysins, all known to be involved in bacterial pathogenesis.

References

1. Desnottes, J.F. (1996) *Trends Biotechnol.* 14, 134-40
2. Frey, J. and Nicolet, J. (1990) *J. Clin. Microbiol.* 28, 232-6
3. Jacques, M. and Foiry, B. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 3470-2
4. Jacques, M. et al. (1991) *J. Gen. Microbiol.* 137, 2663-8
5. Lebrun, A. et al. (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2093-8
6. Lorian, V. (1991) *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore

Tiamulin and Econor are registered trademarks of Novartis AG, Basle, Switzerland.