

Université de Montréal

Étude de la liaison de l'hémoglobine porcine chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*

par

Marie ARCHAMBAULT

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en microbiologie et immunologie

Juin, 1999

© Marie ARCHAMBAULT, 1999



W
4
U58
2000
v. 018

Université de Montréal

Monsieur ARCHAMBAULT

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Montréal
en vue de l'obtention du grade de
Philosophie Doctor (Ph.D.)
en microbiologie et immunologie

juin 1992

Monsieur ARCHAMBAULT, 1992



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude de la liaison de l'hémoglobine porcine chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*

présentée par:

Marie Archambault

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Serge Larivière (Président-rapporteur)

Dr Mario Jacques (Directeur de recherche)

Dr Marcelo Gottschalk (Membre du jury)

Dr Daniel Grenier (Examineur externe)

Thèse acceptée le :

SOMMAIRE

Actinobacillus pleuropneumoniae est un pathogène strict des voies respiratoires du porc et l'agent causal d'une pleuropneumonie. Plusieurs facteurs de virulence déjà connus sont impliqués dans ce processus infectieux. Récemment, nous avons démontré la liaison de l'hémoglobine porcine au lipopolysaccharide (LPS) d'*A. pleuropneumoniae*. Nous avons également mis en évidence qu'*A. pleuropneumoniae* pouvait utiliser l'hémoglobine comme seule source de fer pour sa croissance. Par contre, aucune information n'est présentement disponible concernant le système d'acquisition en fer provenant de l'hémoglobine porcine. Certains chercheurs ont identifié la liaison entre le LPS de certaines bactéries et l'hémoglobine humaine. De plus, des protéines liant l'hémoglobine ont été mises en évidence chez certaines bactéries. L'intérêt premier des études décrites dans cette thèse était de caractériser les molécules impliquées dans la liaison de l'hémoglobine porcine chez *A. pleuropneumoniae*.

Le premier objectif de ce travail consistait à étudier l'effet de la liaison de l'hémoglobine porcine sur les propriétés biologiques et physiques du LPS d'*A. pleuropneumoniae*. Tout d'abord, la liaison de l'hémoglobine porcine à la surface de la cellule entière d'*A. pleuropneumoniae* a été mise en évidence par microscopie électronique à transmission (MET) et par spectroscopie. Puis il a été observé par cytométrie en flux que cette liaison ne modifiait pas l'accessibilité des anticorps aux antigènes de surface O et K. Ensuite, la liaison de l'hémoglobine porcine au lipide A de la molécule de LPS a été confirmée par le déplacement de la sonde fluorescente dansylcadavérine. Des analyses en MET ont mis en évidence que l'hémoglobine porcine fragmentait le LPS et diminuait ainsi sa vélocité de sédimentation sur un gradient de sucrose. Des tests sur lysats d'améboocytes du *Limulus* (ou LAL) ont révélé que l'hémoglobine diminuait l'activité biologique du LPS et réduisait également son habileté à stimuler la production d'oxide nitrique par les macrophages murins.

Le deuxième objectif de notre étude consistait à élaborer une méthodologie nous permettant de quantifier la liaison de l'hémoglobine porcine à la surface d'*A. pleuropneumoniae* dans le but de comparer différentes souches et différentes conditions de croissance. L'activité liant l'hémoglobine a été évaluée chez *A. pleuropneumoniae* par cytométrie en flux à l'aide d'hémoglobine porcine marquée à la fluorescéine. L'activité liant l'hémoglobine a été démontrée chez des souches représentatives d'*A. pleuropneumoniae* appartenant aux sérotypes 1 et 2. En comparant l'activité liant l'hémoglobine chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 souche 4074 dans différentes

conditions de croissance, il a été démontré que la restriction en fer augmentait l'expression des récepteurs d'hémoglobine. Ceci implique que l'activité liant l'hémoglobine semble, en partie, répressible par le fer. Ces résultats nous indiquaient que, en plus des LPS, des protéines de la membrane externe (OMPs) régulées par le fer pourraient possiblement être impliquées dans l'activité liant l'hémoglobine. De plus, des mutants isogéniques LPS et un mutant acapsulé d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ont été testés par cytométrie en flux afin de comprendre le rôle des polysaccharides de surface dans l'activité liant l'hémoglobine. Les expériences menées avec le mutant acapsulé ont indiqué que les molécules de surface possédant une activité liant l'hémoglobine étaient plus exposées à la surface cellulaire en absence du polysaccharide capsulaire. Cependant, l'activité liant l'hémoglobine des mutants LPS analysés dans cette étude était semblable à celle de la souche mère. Le profil des protéines de la membrane externe d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 obtenu dans des conditions suffisantes ou restreintes en fer a été également évalué sur gel de polyacrylamide. Des OMPs régulées par le fer ont été observées suggérant qu'une ou plusieurs de ces OMPs pourraient jouer un rôle dans l'activité liant l'hémoglobine détectée par cytométrie en flux.

Le troisième objectif de notre étude était d'identifier et de caractériser un ou des récepteurs protéiques impliqués dans la liaison de l'hémoglobine porcine. Les souches de référence représentant les 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ont été examinées pour tester leur habileté à utiliser différentes sources de fer pour leur croissance. Dans un test de promotion, toutes les souches ont utilisé soit l'hémoglobine porcine ou l'hémine porcine. Cette acquisition ne semblait pas spécifique d'espèce étant donné que les souches d'*A. pleuropneumoniae* ont également utilisé l'hémoglobine bovine ou l'hémine bovine comme seule source de fer pour croître. En utilisant une procédure de purification par affinité à l'aide d'hémine- ou d'hémoglobine-agarose, une OMP majeure de 75 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine a été isolée chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 souche 4074 après croissance dans des conditions de restriction en fer. Des OMPs mineures de 47 et 36 kDa liant l'hémine ou l'hémoglobine ont également été identifiées. Une étude portant sur les souches de référence des 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* après croissance dans des conditions de restriction en fer a révélé que toutes les souches, excepté celles des sérotypes 3, 6, 7, et 10 synthétisaient l'OMP majeure de 75 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine. Cette étude a également démontré que l'OMP mineure de 47 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine était conservée chez toutes les souches testées représentant les 12 sérotypes; l'OMP mineure

de 36 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine a été isolée chez toutes les souches testées sauf chez la souche 8329/85 représentant le sérotype 12. Le marquage de la cellule entière d'*A. pleuropneumoniae* au palmitate radioactif a indiqué que l'OMP majeure de 75 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine n'était pas de nature lipoprotéique. Cependant, les OMPs mineures de 47 et 36 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine pourraient être des lipoprotéines étant donné que des bandes d'approximativement 47 et 36 kDa ont été observées suite au marquage. Malgré plusieurs essais, il n'a pas été possible de déterminer la séquence N-terminale en acides aminés de l'OMP majeure de 75 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine. Afin de prouver que l'OMP majeure de 75 kDa purifiée par hémine-agarose ou hémoglobine-agarose étaient identiques et dans le but d'obtenir une séquence nous permettant de synthétiser un oligonucléotide, ces protéines ont été analysées par un spectromètre de masse couplé à un HPLC et à un séquenceur Edman. Ces analyses ont révélé des peptides communs entre l'OMP purifiée par hémine-agarose et l'OMP purifiée par hémoglobine-agarose. Ces résultats suggèrent fortement que ces peptides proviendraient de la même protéine. L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que l'OMP majeure de 75 kDa et les OMPs mineures de 36 et 47 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine chez *A. pleuropneumoniae* pourraient être impliquées dans le système d'acquisition en fer provenant de l'hémine ou de l'hémoglobine porcine.

MOTS CLES: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, lipopolysaccharides, hémoglobine, hémine, cytométrie en flux, protéines liant l'hémoglobine, protéines liant l'hémine, fer.

TABLE DES MATIERES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIERES	vii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xvi
DÉDICACE	xvii
REMERCIEMENTS	xviii
I. INTRODUCTION	1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
1. Généralités sur la famille des <i>Pasteurellaceae</i>	4
2. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	4
2.1 Facteurs de virulence associés à la cellule bactérienne	5
2.1.1 Capsule	5
2.1.2 Membrane externe	6
2.1.2.1 Lipopolysaccharides	6
2.1.2.2 Protéines de la membrane externe	7
2.1.2.3 Fimbriae ou Pili	9
2.2 Facteurs de virulence sécrétés par la cellule bactérienne	9
2.2.1 Protéases	9
2.2.2 Exotoxines	9
2.2.3 Superoxyde dismutase	11
2.2.4 Uréase	11
2.2.5 Facteur de perméabilité	12
2.3 Pathogénie	12
2.4 Diagnostic	13
2.5 Traitement et prophylaxie	15
3. Les différents systèmes d'acquisition en fer chez les bactéries	16
3.1 Sidérophores et protéines liant la transferrine ou la lactoferrine	17
3.2 L'hème, l'hémine et l'hémoglobine	20

3.2.1 La liaison entre le lipopolysaccharide bactérien et l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine	24
3.2.2 Les protéines liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine	27
3.2.3 Le système hémophore-dépendant	39
3.2.4 Le transport bactérien de l'hème, de l'hémine ou de l'hémoglobine	41
3.2.5 Méthodes mettant en évidence l'activité liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine	43
III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	45
Article 1:	
ARCHAMBAULT, Marie , Martin Olivier, Bernadette Foiry, Moussa Diarra, Sonia-Élaine Paradis et Mario Jacques. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> lipopolysaccharides. Journal of Endotoxin Research, 4: 53-65, 1997.	46
Article 2:	
ARCHAMBAULT, Marie , Stéphane Rioux et Mario Jacques. Evaluation of the hemoglobin-binding activity of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. FEMS Microbiology Letters, 173: 17-25, 1999.	60
Article 3:	
ARCHAMBAULT, Marie , Clément Rioux, France Dumas, Pierre Thibault, Christopher Elkins et Mario Jacques. Identification of hemin- and hemoglobin-binding proteins of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 1.	70
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE	100
V. CONCLUSION GÉNÉRALE	106
VI. BIBLIOGRAPHIE	108

VII. ANNEXES

xix

Annexe 1:

Article en collaboration

xx

Annexe 2:

Liste des communications

xxii

LISTE DES TABLEAUX

II. REVUE DE LA LITTÉRATURE

Tableau I. Protéines bactériennes liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine de l'hôte. 33

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article 2.

TABLE I. Percentages of fluorescent events and modes recorded in flow cytometry analysis of *A. pleuropneumoniae* reference strains and field isolates grown under iron-restricted conditions and incubated with a 1:10 dilution of FLUOS-Hb. 66

TABLE II. Percentages of fluorescent events and modes recorded in flow cytometry analysis of isogenic mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 NaI^R grown under iron-restricted conditions and incubated with a 1:10 dilution of FLUOS-Hb. 67

Article 3.

TABLE I. Ability of *A. pleuropneumoniae* reference strains representing the twelve serotypes to use Hm and Hb as iron sources in a growth promotion assay. 92

TABLE II. Presence of Hb- and Hm-binding OMPs in *A. pleuropneumoniae* reference strains representing the twelve serotypes. 93

TABLE III. Common tryptic peptides between the 75-kDa OMPs purified by either Hb-agarose or Hm-agarose obtained by Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight (MALDI-TOF). 94

LISTE DES FIGURES

II. REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1. Modèle schématique de l'acquisition du fer provenant de la transferrine chez les *Pasteurellaceae*. L'interaction de la transferrine avec le complexe Tbp1/2 et la transduction d'énergie via TonB entraîne un changement conformationnel de la transferrine et permet ainsi le relâchement de ses cations ferriques. Ces ions sont transportés à travers Tbp1 où ils s'associent avec Fbp. Fbp transporte un cation ferrique à travers l'espace périplasmique à une perméase de la membrane interne formée de Fpc1 et Fpc2 qui transloquent le Fe^{3+} à travers la membrane interne dans le cytoplasme. Le complexe Apo-Fbp est alors séparé et Fbp redevient disponible pour un autre cycle de transport du fer. Le transport du fer à travers la membrane interne pourrait concomitamment se produire avec la réduction de l'ion ferrique en ion ferreux, le rendant ainsi disponible pour son utilisation biologique. Transferrine (Tf), protéine 1 liant la transferrine (Tbp1), protéine 2 liant la transferrine (Tbp2), protéine liant le fer ferrique (Fbp), perméase 1 liant le fer ferrique (Fpc1), perméase 2 liant le fer ferrique (Fpc2), membrane externe (OM), membrane interne (IM). Le cercle noir représente le fer. Traduit et modifié de Kirby et coll. (110).

19

Figure 2. Modèle hypothétique général pour l'acquisition de l'hème, de l'hémine ou de l'hémoglobine. L'hémine libre ou lié à l'hémoglobine serait internalisé dans le périplasma via les récepteurs de la membrane externe par l'action des molécules TonB-ExbBD. La topologie exacte et l'identité précise de plusieurs récepteurs bactériens de surface demeure encore une spéculation. L'hémine serait transporté dans le cytoplasme par l'action d'un système comprenant une protéine périplasmique liant l'hémine, une perméase de la membrane cytoplasmique et une ATPase. Le fer serait relâché de l'anneau porphyrinique par l'action d'une oxygénase liant l'hème localisée dans le cytoplasme. Hémoglobine (Hb), récepteur d'hémoglobine (HmbR), récepteur d'hémine (HemR), membrane externe (OM), périplasma (PP), membrane cytoplasmique (CM). Traduit et modifié de Stojiljkovic et coll. (201).

23

III. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article 1.

Figure 1. Electron transmission micrographs of whole cells of *A. pleuropneumoniae* serotype 1. (A) Control cells that were not stained, nor incubated with pig Hb. (B) Unstained cells that were incubated during 30 min with pig Hb (1 mg/ml). Bar, 200 nm.

50

Figure 2. EDS spectrum of whole cells of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 shown in Fig.1. Elemental analysis of control cells (A) or cells incubated with pig Hb (B). A 8-fold increase in iron (Fe, arrows) was observed in cells previously incubated with pig Hb.

51

Figure 3. Flow cytometry analysis of whole cells of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 not incubated with pig Hb (A) or incubated with pig Hb (B) were labeled with the anti-mouse IgG fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibody (left peak, control) or with monoclonal antibodies against serotype 2 O-antigen plus the anti-mouse IgG FITC-conjugated antibody (right peak). Whole cells of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 not incubated with pig Hb (C) or incubated with pig Hb (D) were labeled with the anti-mouse IgG FITC-conjugated antibody (left peak, control) or with monoclonal antibodies against serotype 1 capsular-antigen plus the anti-mouse IgG FITC-conjugated antibody (right peak). The horizontal bars labelled "1" indicate non-specific fluorescence while bars labelled "2" indicate specific fluorescence.

52

Figure 4. Transmission electron micrographs of negatively stained *A. pleuropneumoniae* serotype 2 extracted LPS. In the absence of Hb, the LPS appeared as ribbon-like structures with frequent branching (A). When LPS was incubated with Hb (1 mg/ml) during 1 h, the typical structure was broken down in shorter molecular aggregates or completely disaggregated in small particules (B). After 18 h of incubation with pig Hb, micelles were observed (C). A hexagonal lattice was observed when LPS from *A. pleuropneumoniae* was incubated with polymyxin B (1 mg/ml) (D). Bar, 200 nm.

53

Figure 5. Western Blot analysis of fractions obtained following sucrose density centrifugation. *A. pleuropneumoniae* serotype 2 extracted LPS (A), pig Hb (C), or *A. pleuropneumoniae* serotype 2 extracted LPS incubated with pig Hb (B and D) were

layered over a 5-20 % continuous sucrose gradient. After centrifugation, 8 fractions (of 1.5 ml) were recovered and analyzed by SDS-PAGE and Western Blot; fractions 1 and 8 correspond to the bottom and the top of the tubes, respectively. Nitrocellulose membranes were either incubated with a serum from a pig experimentally infected with *A. pleuropneumoniae* (A and B) or with a rabbit antiserum against pig Hb (C and D). 54

Figure 6. Dansylcadaverine displacement assay: representative emission spectra. The maximum fluorescence of DC was achieved by using 20 $\mu\text{g/ml}$ of *A. pleuropneumoniae* lipid A. The addition of different concentration of pig Hb (A) or polymyxin B (B) to the mixture of lipid A and DC resulted in an attenuation of fluorescence intensity which is indicative of the displacement of bound DC to lipid A by these compounds. DC alone (50 μM) was used as control. 55

Figure 7. Inhibition of extracted LPS or bacterial cells activation of cLAL by pig Hb or polymyxin B. A decrease was obtained in cLAL activation from the addition of ten-fold diluted pig Hb (starting concentration 1mg/ml) (A) or polymyxin B (starting concentration 1 mg/ml) (B) to a constant concentration of extracted LPS from serotype 1 or serotype 2 (1 $\mu\text{g/ml}$) or bacterial cells of serotype 1 or serotype 2 (1 mg/ml). Two independent experiments were performed, * $P < 0.05$. 56

Figure 8. Effect of pig Hb (pHb), human Hb (hHb), or polymyxin B (PX) on LPS biological activity of *Salmonella minnesota* smooth or Re 595 or *A. pleuropneumoniae* serotype 1 in the cLAL test. The addition of pHb (1 mg/ml) or hHb (1 mg/ml) or PX (1 mg/ml) to extracted LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) resulted in a significant decrease of cLAL activation, * $P < 0.05$. 57

Figure 9. Effect of pig Hb on LPS biological activity of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 in inducing NO_2^- production in J774 cells. The addition of a constant concentration of pig Hb (1 mg/ml) to ten-fold diluted extracted LPS (starting concentration 1 $\mu\text{g/ml}$) resulted in a significant decrease of NO_2^- production, * $P < 0.05$. 57

Article 2.

Figure 1. Flow cytometry analysis of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain 4074. Bacterial cells were grown under iron-restricted conditions and incubated with 1:5 (C), 1:10 (D), 1:50 (E), or 1:100 (F) dilutions of FLUOS-Hb. Bacterial cells not

incubated with FLUOS-Hb (A) or incubated with unlabeled pig Hb (B) served as controls.

63

Figure 2. Flow cytometry analysis of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain 4074. Cells were grown under iron-restricted (A, peak II) or iron-sufficient conditions (B, peak II) and incubated with a 1:10 dilution of FLUOS-Hb. Bacterial cells grown under iron-restricted (A, peak I) or iron-sufficient conditions (B, peak I) and not incubated with FLUOS-Hb served as controls.

65

Figure 3. Outer membrane proteins profile of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain 4074 grown under iron-restricted or iron-sufficient conditions. OMPs were separated on 12.5% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (A) or transferred to nitrocellulose membranes for Western immunoblotting (B). The membranes were then incubated with serum from a pig experimentally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1. Lane 1, Molecular mass markers in kDa. Lane 2, OMPs obtained from cells grown under iron-sufficient conditions. Lane 3, OMPs obtained from cells grown under iron-restricted conditions. Arrows indicate the position of iron-regulated OMPs.

68

Article 3.

Figure. 1. Identification of Hm- and Hb-binding OMPs of *A. pleuropneumoniae* using affinity chromatography. A SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue is shown. Molecular mass markers in kDa (lane 1); Hb-agarose (lane 2) or Hm-agarose (lane 3) affinity-purified OMPs from *A. pleuropneumoniae* grown under iron-sufficient conditions; Hb-agarose (lane 4) or Hm-agarose (lane 5) affinity-purified OMPs from *A. pleuropneumoniae* grown under iron-limited conditions. Arrows indicate the position of the 75, 47 and 36-kDa Hm- and Hb-binding OMPs.

95

Figure. 2. Detection of Hm- and Hb-binding proteins in culture supernatants. A SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue is shown. Molecular mass markers in kDa (lane 1). Proteins located in concentrated culture supernatants of *A. pleuropneumoniae* grown under iron-limited conditions and purified by affinity with Hb-agarose (lane 2) or with Hm-agarose (lane 3). OMPs from *A. pleuropneumoniae* grown under iron-limited conditions and affinity purified by Hb-agarose (lane 4) or Hm-agarose (lane 5). Arrows indicate the position of the 75, 47 and 36-kDa Hm- and Hb-binding OMPs.

96

Figure. 3. Labeling of *A. pleuropneumoniae* with [³H]palmitate. Fluorographic analysis of *A. pleuropneumoniae* metabolically labelled with [³H]-palmitic acid. Molecular mass markers in kDa (lane 1); *A. pleuropneumoniae* grown under iron-sufficient conditions (lane 2) or iron-limited conditions (lane 3). Arrows indicate the position of lipoproteins.

97

Figure. 4. Western blot with biotinylated porcine Hb and avidin-horseradish peroxidase conjugate. Hm- and Hb-binding OMPs were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and incubated with biotinylated porcine Hb (A) or avidin-horseradish peroxidase conjugate (B). Molecular mass markers in kDa (lane 1); OMPs from *A. pleuropneumoniae* grown under iron-limited conditions and affinity purified by Hb-agarose (lane 2) or Hm-agarose (lane 3). The arrow indicates the position of the 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP.

98

Figure. 5. A hypothetical model for the utilization of Hb and/or Hm by *A. pleuropneumoniae*. Extracellular Hm- and Hb-binding proteins would catch heme and shuttle it back to specific outer membrane receptors. Hm and/or Hb-bound Hm would be internalized into the periplasm through the outer membrane receptors by the action of TonB-ExbBD machinery. Hm would be transported into the cytoplasm by the action of the Hm-specific protein-dependent uptake system which involves periplasmic Hm-binding protein, cytoplasmic membrane permease and ATPase. Iron would be released from the porphyrin ring by the action of cytoplasmically located heme oxygenase. Periplasmic and cytoplasmic components of the *A. pleuropneumoniae* Hm and Hb utilization system are not yet identified.

99

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Ac:	anticorps
AcMo:	anticorps monoclonaux
ADN:	acide désoxyribonucléique
°C:	degré centigrade
Da:	dalton
DO:	densité optique
ELISA:	enzyme linked immuno-sorbent assay
g:	gramme
h:	heure
Hm:	hémine
Hb:	hémoglobine
IgG:	immunoglobuline G
IROMP:	protéine de la membrane externe régulée par le fer
Kb:	kilobase
kDa:	kilodalton
L:	litre
LPS:	lipopolysaccharide
M:	molaire
mg:	milligramme
min:	minutes
mL:	millilitre
mM:	millimole
MET:	microscopie électronique à transmission
nm:	nanomètre
OMP:	protéine de la membrane externe
PBS:	solution saline tamponnée
rpm:	rotations par minute
SDS-PAGE:	électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécyl sulfate de sodium
sec:	seconde
μg:	microgramme
μL:	microlitre
X g:	force de centrifugation

A la mémoire de mon Père, Jacques

A mon mari, Ludovic

A ma famille

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette étude. Je tiens à exprimer plus particulièrement ma reconnaissance envers:

- le Dr Mario Jacques, professeur titulaire et directeur du Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses Porcines (GREMIP) de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour la confiance, le support, la disponibilité et les excellents conseils scientifiques offerts pendant la réalisation de ce travail ainsi que pour son soutien financier;
- le Fond pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), la Faculté de médecine vétérinaire et la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour leur appui financier;
- le Dr Robert Higgins, professeur titulaire à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour m'avoir permis de travailler au laboratoire de diagnostic en bactériologie clinique pendant toute la durée de mon programme de doctorat;
- le Dr Christopher Elkins, chercheur à l'Université de la Caroline du Nord, pour ses excellents conseils scientifiques concernant une partie de ce travail;
- les Drs Monique Doré et Marcelo Gottschalk, professeurs agrégés à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal et membres de mon comité conseil, pour leur collaboration et leurs conseils avisés;
- le secrétariat du GREMIP pour les nombreux services rendus.

I. INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine. Cette infection, répandue à travers le monde, entraîne des pertes économiques importantes à l'industrie porcine. L'adhérence d'un agent pathogène à la surface des cellules de l'hôte et l'acquisition de fer représentent des étapes importantes de la pathogénèse de l'infection bactérienne. Des études ont démontré que l'adhésine majeure d'*A. pleuropneumoniae* était le LPS. De plus, la partie polysaccharidique du LPS a été identifiée comme agent responsable de l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules des voies respiratoires du porc. Récemment, il a été démontré que les LPS d'*A. pleuropneumoniae* pouvait également lier l'hémoglobine porcine et pourrait donc jouer un rôle dans l'acquisition du fer chez ce micro-organisme.

À notre connaissance, aucune étude approfondie sur la liaison de l'hémoglobine porcine par *A. pleuropneumoniae* n'a été réalisée jusqu'à maintenant. Une telle étude permettrait de caractériser la liaison entre l'hémoglobine porcine et la surface d'*A. pleuropneumoniae* et d'améliorer nos connaissances sur les composantes impliquées dans le mécanisme d'acquisition du fer de l'hémoglobine par cet agent pathogène.

L'un des buts du présent travail était d'étudier l'effet de la liaison de l'hémoglobine porcine au LPS d'*A. pleuropneumoniae*. Nous avons étudié en détail cette interaction et avons déterminé que l'hémoglobine modifie les propriétés physiques et biologiques du LPS d'*A. pleuropneumoniae*. Nous avons ensuite élaboré une méthodologie nous permettant de quantifier la liaison de l'hémoglobine porcine à la surface d'*A. pleuropneumoniae* en utilisant la cytométrie en flux. Nous avons alors déterminé que l'activité liant l'hémoglobine était en partie répressible par le fer et qu'elle pourrait donc impliquer des protéines de la membrane externe régulées par le fer. Nous avons par la suite identifié chez *A. pleuropneumoniae* des récepteurs protéiques liant l'hémine et l'hémoglobine.

II. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Généralités sur la famille des *Pasteurellaceae*

Cette famille comprend trois genres officiels: *Pasteurella*, *Actinobacillus* et *Haemophilus*. Ce sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatifs et parasites stricts des vertébrés. Les germes du genre *Actinobacillus* sont en forme de coques et de bacilles pléomorphes, seuls ou en paires, et ne sont pas particulièrement résistants aux conditions adverses. Ce présent travail porte sur une espèce causant une infection respiratoire importante chez le porc, soit *Actinobacillus pleuropneumoniae* (145).

2. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

A. pleuropneumoniae (anciennement connu sous le nom d'*Haemophilus pleuropneumoniae* et d'*Haemophilus paraahaemolyticus*) est l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine (145). Cette infection est contagieuse et atteint surtout les porcelets en bas âge. Cette bactérie est distribuée mondialement et entraîne des pertes économiques à l'industrie porcine. La maladie se caractérise par une pneumonie hémorragique nécrosante et une pleurésie fibrineuse (76). C'est une bactérie en forme de coccobacille, capsulée et β -hémolytique. C'est un germe fragile qui survit peu longtemps dans l'environnement. Deux biotypes ont été décrits: le biotype 1 requiert pour sa croissance du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), une co-déhydrogénase de la chaîne respiratoire, tandis que le biotype 2 est NAD-indépendant. Jusqu'à présent, 12 sérotypes du biotype 1 et deux sérotypes du biotype 2 ont été décrits selon des différences antigéniques et structurelles dans leurs polysaccharides capsulaires. Le sérotypage est d'ailleurs principalement basé sur les antigènes capsulaires. Les sérotypes 1 et 5 du biotype 1 ont été subdivisés en sous-groupes (1a, 1b et 5a, 5b) selon des différences antigéniques localisées dans les lipopolysaccharides et la capsule. De plus la composition des LPS varie entre les sérotypes sauf pour les sérotypes suivants: 1, 9, 11 et 3, 6, 8 ainsi que pour 4 et 7 qui partagent des épitopes communs (159). La virulence entre les souches est variable. Des observations cliniques démontrent que les souches du biotype 1 sérotypes 1a, 1b, 5a, 5b, 9 et 10 sont plus virulentes que les autres souches du biotype 1 (37, 76). Les sérotypes 2 et 3 se retrouvent dans plusieurs pays d'Europe (208).

2.1 Facteurs de virulence associés à la cellule bactérienne

2.1.1 Capsule

La structure et la composition chimique de la capsule d'*A. pleuropneumoniae* ont été déterminées pour les 12 sérotypes de référence (159). En général, les capsules consistent en des unités répétées de deux ou trois sucres maintenus par des liens glycosidiques, ou de polymères de type acide téichoïque maintenus par des liens phosphate diester, ou de polymères d'oligosaccharides maintenus par des liens phosphate (159).

La spécificité des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* est déterminée par la capsule (92). Il a été démontré, en utilisant la microscopie électronique, que l'épaisseur de la capsule varie selon le sérotype; les plus virulents possèderaient une capsule plus épaisse ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi les sérotypes ne possèdent pas tous le même degré de virulence (96). Paradis et coll. (1996) ont démontré que la croissance sous des conditions réduites en fer n'affecte pas la production de la capsule.

La principale structure de surface bactérienne contre les mécanismes de défense de l'hôte est la capsule conférant une protection contre la phagocytose et la lyse cellulaire médiée par le complément (91, 181). Normalement, les souches capsulées d'*A. pleuropneumoniae* sont résistantes à la lyse par le complément dans le sérum porcin en présence d'anticorps spécifiques (91, 181, 219); alors que les mutants acapsulés sont lysés par le sérum normal (91, 219). Une capsule fragile et facilement détachable a été identifiée chez une souche avirulente du sérotype 5 (100). D'autres études ont démontré que des mutants déficients en matériel capsulaire des sérotypes 1 et 5 obtenus par passage en série *in vitro* sont substantiellement atténués dans leur virulence comparé à la souche mère (91, 172).

Il a été rapporté que l'injection de matériel capsulaire purifié n'induit pas de signes cliniques et n'entraîne pas de lésions pulmonaires chez les porcs (44, 45). L'immunisation à l'aide de matériel capsulaire purifié produit typiquement une faible réponse humorale (88). Même si le matériel capsulaire purifié est conjugué à une protéine améliorant son immunogénicité, seulement une protection partielle contre l'infection est obtenue (91).

Récemment, Ward et Inzana (218) ont identifié, cloné et séquencé une portion du locus (*cpxDCBA*) impliqué dans le transport des polysaccharides capsulaires d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5a. Une région de l'ADN impliquée dans la biosynthèse des polysaccharides capsulaires d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 5a a été également identifiée et caractérisée (220).

2.1.2 Membrane externe

2.1.2.1 Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) ou endotoxine est une molécule de haute masse moléculaire faisant partie de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (169). Il est le constituant majeur du feuillet externe de la membrane externe. Le LPS est composé de trois parties: le lipide A, le noyau oligosaccharidique et l'antigène O. Le lipide A est attaché au noyau oligosaccharidique qui à son tour est relié à l'antigène O. Le lipide A, partie toxique du LPS, est la région la moins variable de la molécule. Il est constitué d'un sucre, le diglucosamine, de groupes phosphates et de longues chaînes d'acides gras. Le lipide A sert à ancrer le LPS dans la membrane externe de la bactérie. Des travaux menés dans notre laboratoire ont mis en évidence qu'une région du lipide A d'*A. pleuropneumoniae* est accessible en surface (7). Le noyau oligosaccharidique est composé d'un noyau interne et d'un noyau externe. Le noyau interne est composé d'heptoses et d'acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique (KDO) alors que le noyau externe est composé d'hexoses. Le KDO comporte huit atomes de carbone et relie la partie polysaccharidique au lipide A. Le noyau oligosaccharidique possède une structure plus uniforme que celle de l'antigène O, le segment le plus variable du LPS. L'antigène O est composé d'unités répétées de sucres. La longueur des chaînes d'antigène O détermine le profil électrophorétique des LPS pouvant être lisse (sérotypes 2, 4, 5 et 7), semi-rugueux (sérotypes 1 et 5) ou rugueux (sérotypes 3 et 6) (19, 45). La composition de la chaîne-O est spécifique du sérotype, leur longueur peut cependant varier entre les souches entraînant des profils distincts à l'intérieur d'un même sérotype (2).

Le LPS possède diverses activités biologiques (43). En laboratoire, le LPS induit une toxicité chez les embryons de poulets, une blastogenèse lymphocytaire et une gélification du test LAL. Chez l'hôte, le LPS confère la résistance au complément et à l'activité bactéricide du sérum. Il stimule également le relâchement de médiateurs

proinflammatoires. Trois groupes de médiateurs peuvent être sécrétés : des protéines (TNF, IL1, IL6, et IL8), des radicaux libres oxygénés (O_2^- , H_2O_2 , et NO), et des lipides (prostaglandines E2). Si ces substances sont libérées en faible quantité, elles sont alors bénéfiques et offrent une stimulation générale du système immunitaire entraînant ainsi une destruction du pathogène. La situation est différente si une grande quantité de ces substances sont libérées dans l'organisme. Cette stimulation exagérée du système immunitaire peut à ce moment conduire à un choc endotoxique léthal (182). Le LPS d'*A. pleuropneumoniae* n'est pas capable d'induire à lui seul les lésions nécrosantes et hémorragiques de la pleuropneumonie porcine. Le LPS doit alors agir de concert avec les autres facteurs de virulence pour provoquer les lésions typiques de la pleuropneumonie porcine (214).

Des études menées dans notre laboratoire ont démontré que le LPS est l'adhésine majeure d'*A. pleuropneumoniae* (8, 95, 157). Nos recherches ont démontré que les isolats possédant des LPS lisses adhèrent fortement aux anneaux de trachée de porcelet tandis que les isolats possédant des LPS semi-rugueux adhèrent plus faiblement (8). D'autres travaux ont mis en évidence que la partie lipidique du LPS ne semble pas responsable de l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* mais que la partie polysaccharidique est plutôt impliquée dans ce phénomène (157). Récemment, la liaison de l'hémoglobine porcine au lipide A du LPS d'*A. pleuropneumoniae* a été démontrée et cette liaison pourrait être impliquée dans le système d'acquisition du fer provenant de l'hémoglobine (7).

2.1.2.2 Protéines de la membrane externe

La membrane externe d'*A. pleuropneumoniae* est composée de trois à cinq protéines majeures et de 10 à 20 protéines mineures (90). Certaines d'entre elles semblent posséder un rôle dans la réponse immune protectrice (28, 63, 166). De plus, des anticorps contre les OMPs d'*A. pleuropneumoniae* semblent jouer un rôle important comme opsonines lors de la phagocytose (212). Sept profils protéiques sur SDS-PAGE ont été identifiés parmi les souches de référence des neuf premiers sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Les sérotypes 1 et 9 appartiennent à un profil, les sérotypes 2 et 6 à un deuxième profil et les sérotypes 3, 4, 5, 7 et 8 forment les cinq autres profils (165).

Même si les profils des OMPs diffèrent entre les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*, il a été démontré que les isolats de tous les sérotypes possèdent plusieurs OMPs communes incluant: une lipoprotéine de 14 kDa associée au peptidoglycane, nommée PalA et hautement immunogène (54); une OMP modifiable par la chaleur de 29/41 kDa; une OMP majeure variant entre 32 et 42 kDa selon les sérotypes et une OMP de 48 kDa (28). Leurs rôles demeurent pour l'instant inconnus.

Les effets de la restriction en fer sur le profil des OMPs d'*A. pleuropneumoniae* ont été documentés (34, 152). Des protéines majeures de la membrane externe régulées par le fer identifiées par Deneer et Potter (34) ont des masses moléculaires relatives de 76 et 105 kDa. Ces chercheurs ont suggéré alors que ces protéines pourraient servir à acquérir le fer sous différentes formes pendant la croissance *in vivo*. Des polypeptides de 47, 54, 79 et entre 96 et 102 kDa ont été également identifiés chez *A. pleuropneumoniae* dans des conditions de croissance restreinte en fer (152).

A. pleuropneumoniae est capable d'utiliser la transferrine comme seule source de fer (64, 65). Deux protéines de la membrane externe régulées par le fer, de masse moléculaire de ≈ 60 kDa (TfbA) et de ≈ 100 kDa (TfbB), ont été identifiées comme des protéines liant la transferrine (64, 67). Des anticorps contenus dans le sérum de porcs convalescents ont réagit contre ces deux protéines, indiquant ainsi qu'elles sont exprimées *in vivo* (34, 152). L'analyse génétique des déterminants codant pour les protéines liant la transferrine a révélée deux gènes arrangés en un opéron. Un gène *Fur* codant pour un répresseur a été observée en amont de l'opéron *tfb* (*tbp*) (68, 203). Cette organisation est similaire à celle décrite pour les récepteurs de transferrine de *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus influenzae* (68).

Lorsque du maltose est ajouté au milieu de culture des sérotypes 1, 2, 3, 5, 6 et 7 d'*A. pleuropneumoniae*, une protéine de 42 kDa est nouvellement synthétisée (34). Les chercheurs supposent que cette protéine serait impliquée dans le transport du maltose et permettrait une meilleure croissance *in vitro*. Son importance *in vivo* n'est pas encore connue.

Une protéine de 50 kDa, dénommé Omp1A, de la membrane externe d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 a été identifiée comme étant une lipoprotéine (63).

L'immunisation de porcs avec Omp1A a conféré une protection homologue (63). Son rôle précis demeure inconnu.

2.1.2.3 Fimbriae ou Pili

Inzana (90) a observé une structure ressemblant à des fimbriae chez *A. pleuropneumoniae* retrouvé à l'intérieur des phagosomes après internalisation par des leucocytes polymorphonucléaires. Des fimbriae ont été également observés chez des isolats d'*A. pleuropneumoniae* après croissance sur géloses au sang (215). Ces fimbriae sont par contre rapidement perdus après quelques passages sur ce milieu. Pour l'instant le rôle de cette structure dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae* n'a pas encore été établi.

2.2 Facteurs de virulence sécrétés par la cellule bactérienne

2.2.1 Protéases

Six protéases pouvant dégrader les immunoglobulines A porcines, la gélatine et l'hémoglobine humaine, bovine ou porcine ont été décrites chez *A. pleuropneumoniae* (142). Leur masse moléculaire est de > 200, 200, 90, 80, 70 et 50 kDa. L'inhibition par l'EDTA de l'activité protéolytique et la réactivation subséquente par le calcium suggère que des métalloprotéases sont responsables de cette activité. Les chercheurs suggèrent que ces protéases pourraient être impliquées dans la virulence en clivant les immunoglobulines A porcines, facilitant ainsi la colonisation de ce micro-organisme au niveau des voies respiratoires. De plus, elles pourraient être impliquées dans la formation des lésions pulmonaires en clivant directement les protéines de l'hôte. Ces protéases pourraient également jouer un rôle dans l'acquisition du fer en dégradant l'hémoglobine porcine.

2.2.2 Exotoxines

A. pleuropneumoniae élabore différentes toxines labiles à la chaleur. Ces toxines, membres de la famille des toxines RTX (repeats in the structural toxin), sont connues sous les noms ApxI, ApxII, ApxIII et ApxIV pour *A. pleuropneumoniae* RTX toxins (51, 52). Les toxines RTX se retrouvent chez d'autres bactéries à Gram négatif et elles sont considérées comme des facteurs de virulence. Un membre bien connu de

cette famille est l'hémolysine alpha d'*Escherichia coli*. Les membres de cette famille partagent des propriétés structurales et fonctionnelles, incluant la présence d'unités répétées riches en glycine, un mode de sécrétion particulier ayant une séquence signal à l'extrémité C-terminale, une activation post-traductionnelle, et une toxicité cellulaire reliée à la formation de pores membranaires. Cependant, les toxines ont différentes cellules cibles, activités toxiques (hémolytique, cytotoxique, leucotoxique ou adénylate cyclase) et spécificités d'hôte selon l'espèce bactérienne impliquée (22).

Les gènes codant pour les toxines RTX sont regroupées en opéron consistant en quatre gènes contigus soit C, A, B, et D (223). Le gène structural A et le gène activateur C sont impliqués dans l'élaboration des protéines alors que les gènes transporteurs B et D sont impliqués dans l'exportation des protéines. Ces gènes sont exprimés à partir d'un promoteur commun situé en amont du gène C.

ApX I est une toxine fortement hémolytique de masse moléculaire apparente de 105 kDa (56). ApX I est également fortement cytotoxique pour les macrophages alvéolaires et les neutrophiles (105). La toxine est produite par les sérotypes 1, 5, 9, 10, et 11. L'opéron *apx I* contient les quatre gènes de la famille des toxines RTX. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ApXI sont dénommés *apxIC*, *apxIA*, *apxIB* et *apxID* (51). Les sérotypes 2, 4, 6, 7, 8, et 12 ne possèdent pas l'opéron *apxIA* et ne produisent alors pas la toxine ApX I. L'opéron *apxI* est complètement absent chez le sérotype 3 (50), généralement moins virulent (55).

ApXII est une toxine d'environ 103 à 105 kDa. Elle a été originellement caractérisée à partir de la souche de référence du sérotype 2 (57). ApXII est faiblement hémolytique et peu cytotoxique pour les macrophages alvéolaires et les neutrophiles (105). Elle est synthétisée par tous les sérotypes sauf le sérotype 10. Les gènes de la toxine ApXII sont également organisés en un opéron nommé *apxII* comprenant *apxIIC* et *apxIIA*. Aucun gène de sécrétion n'a été identifié dans cet opéron (51).

ApX III est une toxine de 120 kDa et elle est synthétisée par les sérotypes 2, 3, 4, 6 et 8. Cette protéine est non hémolytique mais hautement cytotoxique (52, 90, 207). L'opéron *apxIII* comprend les gènes *apxIIIC*, *apxIIIA*, *apxIIIB* et *apxIIID* (51).

ApX IV est une nouvelle toxine RTX découverte récemment chez *A. pleuropneumoniae* (53). Cette toxine, exprimée seulement dans des conditions *in vivo*,

est présente chez tous les sérotypes et possède une masse moléculaire de 202 kDa (183).

Plusieurs souches d'*A. pleuropneumoniae* sécrètent différentes combinaisons de deux toxines Apx. Sachant qu'*A. pleuropneumoniae* peut utiliser l'hémoglobine porcine comme seule source de fer (7, 34), il est tentant de spéculer que les souches ayant une forte activité hémolytique serait avantagée *in vivo* de par leur capacité à relâcher l'hémoglobine par la lyse des érythrocytes. Des expériences d'inoculation menées chez le porc à l'aide de toxines purifiées ont révélé que les toxines ApxI, ApxII et ApxIII sont les facteurs de virulence responsables du développement des signes cliniques et des lésions caractéristiques de la pleuropneumonie porcine (106).

2.2.3 Superoxyde dismutase

A. pleuropneumoniae produit une [Cu, Zn]-superoxyde dismutase (SOD) (113). Sa séquence peptidique N-terminale suggère une localisation extra-cytosolique de l'enzyme. Ceci suggère une protection contre les superoxydes environnementaux. Plusieurs bactéries commensales des voies respiratoires supérieures produisent du SOD. Cette enzyme pourrait donc être impliquée dans la survie des bactéries implantées sur la surface mucoale (112). Des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si l'enzyme SOD contribue à la survie de ce micro-organisme.

2.2.4 Uréase

Un cas clinique de pleuropneumonie associé à une souche uréase négative d'*A. pleuropneumoniae* a été précédemment décrit (12). Tascon et coll. (206) ont démontré à l'aide de mutants uréase négative d'*A. pleuropneumoniae* que la perte de l'activité uréase ne modifie pas la virulence de ce micro-organisme chez le porc. Par contre, dans des conditions expérimentales différentes, des mutants uréase négative se sont avérés moins virulents (13) de sorte que l'importance de cette enzyme comme facteur de virulence demeure pour l'instant controversée.

2.2.5 Un facteur de perméabilité

Un facteur de perméabilité a été retrouvé dans le surnageant de culture chez 18 isolats des sérotypes 1 et 5 d'*A. pleuropneumoniae* (116). Ce facteur est non hémolytique, non protéolytique et cause de l'oedème dermique chez le lapin. Son rôle dans la virulence demeure inconnu.

2.3 Pathogénie

L'infection causée par *A. pleuropneumoniae* peut être subaiguë, aiguë ou chronique (186). Les porcs de tous âges peuvent être affectés mais ceux de plus de 12 semaines semblent les plus vulnérables. Dans la forme subaiguë, la mort survient à l'intérieur de 24 à 36 heures post-infection. De plus, des morts subites chez des porcelets sans signes cliniques ont été rapportées. Les signes cliniques d'une infection aiguë ou chronique à *A. pleuropneumoniae* peuvent inclure l'anorexie, la fièvre, une dyspnée légère ou sévère avec cyanose et de la toux. L'épitélaxie est communément retrouvée dans la forme aiguë de l'infection. À la nécropsie, les lésions de la forme aiguë sont représentées par une pleurésie sérofibrineuse et une pneumonie hémorragique nécrosante. La distribution des lésions est généralement bilatérale, affectant principalement les lobes caudaux des poumons (189). Selon l'étendue des lésions pulmonaires et l'efficacité de la thérapie à base d'antibiotiques, la forme aiguë peut progresser d'une infection clinique sévère à la mort en quelques jours ou bien se convertir en forme chronique. À la nécropsie, les infections chroniques se caractérisent par une pleurésie fibrineuse accompagnée de foyers nécrotiques pulmonaires (189). Les porcs atteints par la forme chronique de l'infection sont considérés comme étant des porteurs de la maladie puisque la bactérie se retrouve dans leurs foyers de nécrose pulmonaire (187). Les porcs atteints par la forme aiguë peuvent se rétablir complètement. Leurs poumons peuvent être alors totalement sains ou bien fibrosés ou nécrosés par endroit (11). Après s'être rétabli de l'infection, un porc peut demeurer porteur asymptomatique durant des mois (187).

La pathogénie de la pleuropneumonie porcine est influencée par différents facteurs. Le stress causé par l'entassement, le transport, les variations de température et une mauvaise ventilation des locaux augmente l'incidence de la maladie (145). En plus des conditions environnementales, le statut immunitaire de l'hôte et les facteurs de virulence discutés précédemment joueraient un rôle très important dans l'évolution de la

maladie (76, 90). La transmission de l'infection se fait par contact direct entre les porcs ou par voie indirecte (186). *A. pleuropneumoniae* serait inhalé et pénétrerait dans les alvéoles pulmonaires via la trachée et les bronches. Il y aurait ensuite attachement de ce micro-organisme à la muqueuse respiratoire. Ce processus impliquerait le LPS (8, 157) de la bactérie et possiblement des fimbriae (90, 215). La multiplication du germe entraînerait ensuite la colonisation de la surface des muqueuses (182). Plusieurs facteurs de virulence seraient alors impliqués dans cette étape. Les exotoxines, ApxI à IV, et les protéases permettraient au micro-organisme d'accéder aux nutriments essentiels à sa croissance. Ce germe pourrait alors exprimer un ou des récepteurs lui permettant d'acquérir les nutriments. C'est le cas pour la transferrine porcine dont l'acquisition se fait via des récepteurs protéiques de la membrane externe d'approximativement 60 et 100 kDa (59, 64, 65, 67). Les toxines, les protéases et le LPS seraient également impliqués dans la formation des lésions chez le porc (76, 90).

Ce micro-organisme doit également interférer avec les défenses de l'hôte afin d'assurer sa survie. Encore une fois, plusieurs facteurs de virulence seraient impliqués dans ce processus. La capsule protégerait de la phagocytose et de l'effet bactéricide du sérum (91, 181). Les toxines Apx semblent interférer avec les systèmes de défense de l'hôte en détruisant les macrophages alvéolaires (27, 29). Il est intéressant de spéculer que la liaison de l'hémoglobine au LPS d'*A. pleuropneumoniae* (7) permettrait le camouflage d'*A. pleuropneumoniae* au système immunitaire. Les protéines de la membrane externe liant la transferrine porcine pourraient également représenter un moyen par lequel cette bactérie se recouvre de protéines de l'hôte afin d'échapper à la réponse immune. La SOD permettrait une protection contre les superoxydes environnementaux ce qui pourrait favoriser la survie des bactéries implantées à la surface de la muqueuse respiratoire (112, 113). Le rôle précis de la SOD dans la pathogénie de l'infection demeure à être élucidé.

2.4 Diagnostic

A. pleuropneumoniae est un pathogène strict, le porc étant le seul animal connu comme étant susceptible à ce germe. De plus, ce micro-organisme ne persiste pas dans l'environnement (145). Les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* sont distribués géographiquement à travers le monde et leur prévalence varie selon les pays. Les sérotypes 1, 5 et 7 sont les plus fréquents aux Etats-Unis (188). En France, les isolats appartiennent principalement aux sérotypes 2 et 9 (132). Une étude portant sur

l'évolution de la distribution des différents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* isolés de porcs malades au Québec, de la période 1970-1982 jusqu'à décembre 1997 a révélé que le sérotype 1, qui était dominant jusqu'en 1992, a diminué considérablement et il ne représente maintenant qu'environ 20 pour cent de tous les isollements effectués dans les différents laboratoires de diagnostic (133). Depuis 1993, le sérotype 5 prédomine, de plus en plus suivi de près par le sérotype 7. Le nombre d'isolats d'*A. pleuropneumoniae* appartenant aux sérotypes 3, 6 et 8 se maintient entre un et trois pour cent et il en est de même pour les autres sérotypes (133).

Les spécimens permettant l'identification d'*A. pleuropneumoniae* au laboratoire de diagnostic sont les poumons. Le frottis direct est peu utile et n'est pas effectué sur les poumons. Une culture sur gélose au sang avec une strie de *Staphylococcus aureus*, pour fournir le facteur V, permet l'isolement du germe. On peut utiliser également des milieux spéciaux, c'est-à-dire des géloses PPLO (Pleuropneumoniae like organism). Il est maintenant possible de mettre en évidence le germe directement dans les poumons à l'aide d'immuno-techniques (59). Cette technique est environ 1000 fois plus sensible que l'isolement par culture directe.

Plusieurs tests permettent le sérotypage des isolats. Les techniques d'agglutination sur lame, d'agglutination en tube et de précipitation en tube capillaire utilisant des antisérums de lapins contre les bactéries entières ont été utilisés (135). Le typage de routine se fait par le test de coagglutination (136). Il est toutefois reconnu que des isolats non typables ainsi que des réactions croisées surviennent à l'occasion (134). Les réactions croisées existent en particulier entre les sérotypes 3, 6 et 8, les sérotypes 1, 9 et 11 et les sérotypes 4 et 7 (131, 147, 150). La capsule serait l'antigène spécifique de sérotype (159) et les réactions croisées seraient dues aux polysaccharides de la chaîne O du LPS des différents sérotypes (9). Toutefois, l'immunodiffusion en gélose, l'hémagglutination indirecte et la contre-immunoelectrophorèse sont utilisées lorsque le moindre doute existe quant à l'identité du sérotype (136, 137). Le sérotypage peut être également effectué par PCR en identifiant les gènes activateurs et structuraux des toxines d'*A. pleuropneumoniae* (51). Il est également possible de sérotyper ces micro-organismes dans les tissus à l'aide d'un test de particules en latex (89). Le sérotypage des isolats est recommandé pour confirmer rapidement un diagnostic et est essentiel si on considère un programme de vaccination. Le sérotypage peut démontrer la distribution locale des sérotypes et permet l'évaluation de la situation épidémiologique (208).

Plusieurs tests ont été décrits pour le diagnostic sérologique de la pleuropneumonie. La fixation du complément, l'ELISA et le test de neutralisation de l'hémolysine détectent la présence d'anticorps contre *A. pleuropneumoniae* chez les porcs. Un test d'agglutination en tube au 2-mercaptoéthanol (2-ME) peut également être utilisé (138). La spécificité et la sensibilité varient selon les tests. La fixation du complément possède une haute spécificité et une faible sensibilité; l'ELISA possède généralement une forte sensibilité et une faible spécificité; et le test de neutralisation des hémolysines, qui a été développé récemment, ne détecte pas le sérotype 7 car il ne produit pas d'hémolysine. La procédure de fixation du complément demeure la méthode standard et est utilisée de routine pour tester les troupeaux aux États-Unis (41). Des études ont été réalisées récemment afin d'augmenter la spécificité de la technique d'ELISA (5, 70, 114, 164, 196) où des extraits cellulaires et des LPS à longues chaînes ont été évalués comme antigènes (69, 71). Dans un test ELISA, les antigènes spécifiques de sérotype permettent l'identification des anticorps appartenant à un sérotype (146). La détermination des anticorps dans le sérum peut être utilisée afin de déterminer les profils d'anticorps des élevages ou pour démontrer la présence d'anticorps dans le colostrum (146). La sérologie est utilisée au Québec pour le contrôle de l'infection et la mise sur pied d'élevages assainis. Dans tous les tests sérologiques, des précautions doivent être prises afin d'exclure les anticorps produits par une infection à *Actinobacillus suis* ainsi que par les autres membres des Pasteurellaceae (208).

2.5 Traitement et prophylaxie

L'antibiothérapie est de mise lors d'une infection causée par *A. pleuropneumoniae* et l'antibiogramme est fait de routine. La pénicilline, les tétracyclines, les sulfamidés, la tiamuline et le ceftiofure peuvent être utilisés comme traitement (41). Bien que ces antibiotiques peuvent réduire la mortalité et améliorer le gain de poids, ils n'éliminent pas l'infection dans un troupeau. De plus, la résistance aux antibiotiques devient de plus en plus commune chez *A. pleuropneumoniae*. Différents plasmides seraient responsables de la résistance à la streptomycine, aux sulfamidés, au chloramphénicol et à la kanamycine (94).

La sérologie et la vaccination sont utilisées dans le but de diminuer l'incidence de l'infection à *A. pleuropneumoniae*. Cette incidence peut être également

réduite en regroupant les porteurs séro-positifs, en achetant des porcs séro-négatifs et en utilisant la quarantaine pour les nouveaux porcs (145). Il existe plusieurs vaccins sur le marché; ce sont des bactérines faites de cellules entières et inactivées chimiquement. Les vaccins préviennent les mortalités mais ne préviennent pas l'infection ou le développement de la maladie chronique et ceci peut affecter sérieusement la rentabilité de l'élevage (42). De plus, les vaccins n'offrent pas de protection croisée contre les autres sérotypes (86). L'infection naturelle ou l'immunisation avec une souche vivante d'*A. pleuropneumoniae* confèrent une protection contre tous les sérotypes (148, 149). Dû au succès limité des vaccins commerciaux, plusieurs stratégies d'immunisation à l'aide de différents facteurs de virulence ont été testées afin de déterminer si une protection complète peut être obtenue (35, 42, 63, 90, 163, 170, 171, 209). En général, ces expérimentations ont atteint des niveaux de protection supérieure ou égale à ceux des bactérines commerciales sans toutefois atteindre une protection complète. Des vaccins expérimentaux constitués de micro-organismes atténués et tués ont été donnés par aérosol ou par voie orale et ont démontré une certaine protection (93). Une autre stratégie réside dans la génération de bactérines autogènes pouvant être plus efficace que les bactérines commerciales car elles confèrent une immunité spécifique à la souche enzootique de l'élevage (185). Des vaccins sous-unitaires sont présentement à l'étude et certains vont faire leur introduction bientôt sur le marché. Ils consistent en une variété de combinaisons de sous-unités. Un grand nombre d'antigènes se sont révélés protecteurs. Ils incluent les toxines Apx, les protéines de la membrane externe, les produits extracellulaires et certains antigènes de structure ou de fonction (77, 216). Les vaccins de ce type protègent généralement contre tous les sérotypes (208). Le traitement, la vaccination et de bonne mesure d'hygiène permettent généralement le contrôle de la pleuropneumonie sur la ferme (208).

3. Les différents systèmes d'acquisition en fer chez les bactéries

De toutes les interactions qui surviennent entre un pathogène et son hôte, une des composante commune et essentielle d'un processus infectieux implique la multiplication du micro-organisme envahissant à l'intérieur des tissus de l'hôte. Cette croissance est critique à l'établissement d'une infection et dépend, en partie, de l'habileté du pathogène à acquérir certains nutriments essentiels (182). Le fer est un élément essentiel pour la plupart des pathogènes bactériens (17, 47, 120, 127, 158, 221, 222). Le fer fonctionne comme un cofacteur médiant le transport de l'oxygène, la génération d'énergie et possède également des fonctions d'oxydation. De plus, le fer

chélaté dans un anneau porphyrrique, dénommé hème, peut servir comme substrat pour la croissance. Chez l'hôte, le fer extracellulaire est lié à des glycoprotéines telles la lactoferrine et la transferrine contenues dans les sécrétions exocrines. Le fer intracellulaire est séquestré dans la ferritine se retrouvant à l'intérieur des cellules eucaryotes et dans les protéines contenant l'hème telle l'hémoglobine. Le fer contenu dans l'hémoglobine constitue environ 60% des réserves totales de fer chez un humain (155). Cette séquestration limite la disponibilité du fer libre à des niveaux en-dessous de ceux requis pour supporter la croissance microbienne chez l'hôte (18, 222). Cependant, afin de survivre chez l'hôte, les bactéries pathogènes ont développé différents mécanismes de haute affinité pour acquérir le fer (182). Un de ces systèmes consiste en l'élaboration de sidérophores sécrétés dans l'environnement chélatant le fer de l'hôte puis se liant ensuite à un récepteur situé à la surface de la bactérie, ce qui permet alors une internalisation du fer. Un autre système consiste en un mécanisme dépendant d'un récepteur bactérien de surface permettant d'acquérir le fer provenant directement de la lactoferrine, de la transferrine ou des protéines contenant de l'hème (25, 120, 127, 155, 158). Un nouveau système de captation du fer provenant de l'hème, de l'hémine ou de l'hémoglobine a été très récemment proposé. Ce nouveau système, dénommé hémophore-dépendant, consiste en la sécrétion de protéines bactériennes capables de lier les molécules d'hème ou d'hémoglobine de l'environnement et de les transporter ensuite aux récepteurs bactériens de surface liant l'hème ou l'hémoglobine (66).

3.1 Sidérophores et protéines liant la transferrine ou la lactoferrine

Le système le plus connu d'acquisition en fer implique la synthèse de molécules de faible masse moléculaire nommées sidérophores. Plusieurs germes pathogènes synthétisent un ou plusieurs sidérophores; ceux-ci sont des agents chélatant le fer de l'hôte. Ces germes peuvent alors utiliser le fer lié au sidérophore et ainsi croître. Les sidérophores sont capables d'enlever le fer de la transferrine et de la lactoferrine de l'hôte (155). La production de sidérophores constitue donc un facteur de virulence important permettant d'accéder au fer de l'hôte. Les sidérophores sont sécrétés suite à une restriction en fer et, une fois complexés au fer, ils sont alors transportés de nouveau à l'intérieur de la cellule via des récepteurs spécifiques de la membrane externe. Les protéines régulées par le fer servent généralement de récepteurs pour le complexe sidérophores-fer et semblent essentielles pour l'acquisition du fer (143, 144).

Les sidérophores microbiens peuvent être divisés en deux types chimiques: les phénolates et les hydroxamates (155). Plusieurs bactéries entériques synthétisent par exemple le sidérophore phénolate entérobactine et le sidérophore hydroxamate aérobactine. Certaines bactéries ont également la capacité d'obtenir le fer via une variété de sidérophores de types hydroxamates qui ne sont pas synthétisés par le micro-organisme lui-même mais plutôt produit par un autre germe (6). Le ferrichrome et le ferrioxamine sont les sidérophores les plus connus utilisés par d'autres bactéries. Ils sont produits respectivement par certains fungi et par *Actinomyces* (155). *A. pleuropneumoniae* semble capable d'utiliser les sidérophores exogènes (36).

Dans les fluides corporels de l'hôte le fer se retrouve lié à des protéines, entre autre à la lactoferrine et à la transferrine. La transferrine se retrouve majoritairement dans le sang et la lymphe alors que la lactoferrine se retrouve à l'intérieur des neutrophiles et dans les sécrétions exocrines telles la salive, les sécrétions nasales, le colostrum et le lait (155). On peut dire que la production de transferrine et de lactoferrine par l'hôte est un important mécanisme de défense, appelé parfois immunité nutritive. Les germes ont su développer des mécanismes rendant disponible ce fer sous ces différentes formes pour leur croissance. Les germes possédant des récepteurs membranaires liant la transferrine ou la lactoferrine enlève directement le fer de celles-ci (155). Par exemple, *Neisseria meningitidis* possède des récepteurs de surface liant la transferrine et la lactoferrine de l'hôte, mais ces composés ne sont pas incorporés dans la cellule pendant l'acquisition du fer (184, 190). Un résumé des étapes permettant l'acquisition du fer de la transferrine est présenté à la Figure 1. Il est à noter ici qu'*A. pleuropneumoniae*, tel que mentionné à la section 2.1.2.2, possède des récepteurs liant la transferrine porcine (64, 65). Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a encore été réalisée sur les récepteurs liant la lactoferrine.

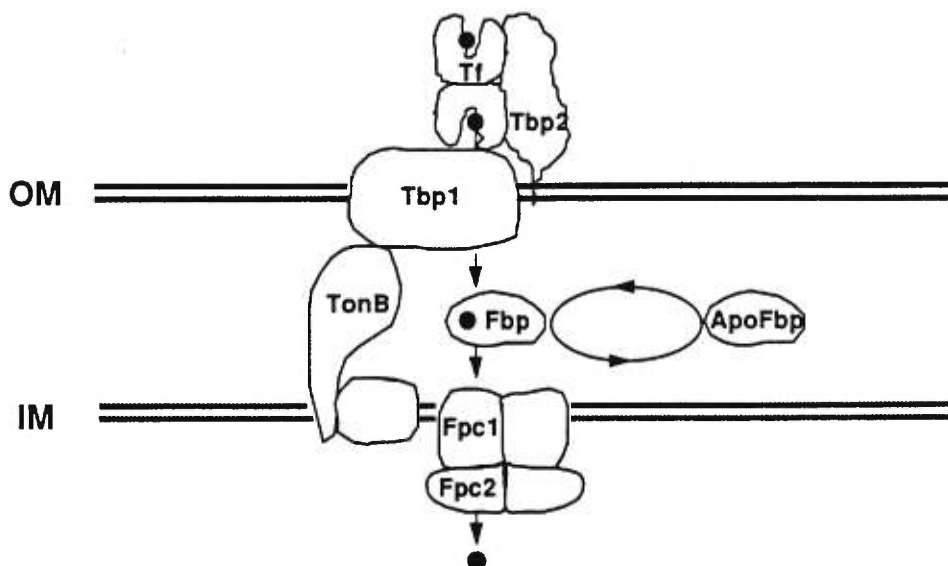


Figure 1. Modèle schématique de l'acquisition du fer provenant de la transferrine chez les *Pasteurellaceae*. L'interaction de la transferrine avec le complexe Tbp1/2 et la transduction d'énergie via TonB entraîne un changement conformationnel de la transferrine et permet ainsi le relâchement de ses cations ferriques. Ces ions sont transportés à travers Tbp1 où ils s'associent avec Fbp. Fbp transporte un cation ferrique à travers l'espace périplasmique à une perméase de la membrane interne formée de Fpc1 et Fpc2 qui transloquent le Fe^{3+} à travers la membrane interne dans le cytoplasme. Le complexe Apo-Fbp est alors séparé et Fbp redevient disponible pour un autre cycle de transport du fer. Le transport du fer à travers la membrane interne pourrait concomitamment se produire avec la réduction de l'ion ferrique en ion ferreux, le rendant ainsi disponible pour son utilisation biologique. Transferrine (Tf), protéine 1 liant la transferrine (Tbp1), protéine 2 liant la transferrine (Tbp2), protéine liant le fer ferrique (Fbp), perméase 1 liant le fer ferrique (Fpc1), perméase 2 liant le fer ferrique (Fpc2), membrane externe (OM), membrane interne (IM). Le cercle noir représente le fer. Traduit et modifié de Kirby et coll. (110).

3.2 L'hème, l'hémine et l'hémoglobine

L'hémoglobine, une protéine de 64 450 Da, est un tétramère composé de deux paires de sous-unités α et β appelées globines et de quatre groupements hèmes (155). Chaque sous-unité est liée à une molécule d'hème. L'hémoglobine est la protéine liant l'oxygène des globules rouges. Suite à une lyse érythrocytaire, l'hémoglobine est relâchée dans la circulation et se lie alors à l'haptoglobine, une glycoprotéine du plasma de 100 000 Da. Une molécule d'hémoglobine lie une molécule d'haptoglobine. Ce complexe hémoglobine-haptoglobine est rapidement métabolisé par les hépatocytes (85). L'hémoglobine libre apparaît lorsque l'haptoglobine est saturée; elle est alors rapidement oxydée et dissociée en molécules de globines et d'hèmes. L'hème libre est lié rapidement par une glycoprotéine du plasma dénommé hémopexine. Cette molécule de 57 000 Da lie une molécule d'hème par molécule de protéine. Ce complexe est ensuite transporté au foie où l'hème peut alors être dégradé en bilirubine ou incorporé dans le cytochrome P-450 (140). Le fer provenant de l'hémoglobine est ainsi continuellement recyclé chez l'hôte.

L'hème représente un ion métallique chélaté dans un anneau porphyrinique (120). Des métalloporphyrines contenant d'autres ions métalliques comme le cuivre, le magnésium ou le zinc sont inclus sous la rubrique hème. La désignation usuelle de l'hème réfère plutôt à du fer complexé à un anneau de tétrapyrrole et sa masse moléculaire est alors de 650 Da. La réactivité biologique de l'hème dérive de l'habileté de son ion métallique, le fer, à subir des changements oxydatifs réversibles. Lorsque le fer est sous la forme réduite Fe^{2+} , le composé se nomme hème, alors que le terme hémine est utilisé pour la forme oxydée Fe^{3+} . Cette propriété permet à l'hème, un groupement prosthétique d'une variété d'hémoprotéines, d'effectuer le transport de l'oxygène (hémoglobine) et le storage (myoglobine), le transfert d'électron et la génération d'énergie cellulaire (cytochrome b et c), la biotransformation oxydative (cytochrome P450), et l'activité peroxyde d'hydrogène (catalases et peroxydases). Cette caractéristique permet également la participation de l'hème à la peroxydation des lipides des constituants de la membrane cellulaire (217). Cependant, l'hème est toujours associé à des protéines due à sa grande réactivité biologique entraînant sa propension à oxyder les constituants cellulaires (141).

L'hémoglobine, l'hème ou l'hémine ne sont normalement pas disponibles aux micro-organismes étant donné leur localisation intracellulaire. C'est pourquoi, les

bactéries pathogènes peuvent utiliser les composés contenant de l'hème seulement après les avoir rendu disponibles. Pour ce faire, les germes infectieux endommagent les tissus de l'hôte ce qui permet le relâchement de matériel intracellulaire. Les toxines bactériennes telles les hémolysines (32, 161, 198) sont de bons exemples de facteurs de virulence permettant la lyse des érythrocytes (120, 155); les protéases (154, 191) et les cytolysines (115) jouent probablement aussi des rôles importants dans le relâchement du matériel intracellulaire des cellules de l'hôte. Les germes pathogènes ont donc développé des mécanismes rendant disponible le fer sous ces différentes formes pour leur croissance. La majorité des bactéries sont capables de synthétiser leur groupement hème suite à l'acquisition du fer. Par contre certains micro-organismes sont incapables de synthétiser ces groupements due à une altération dans leur biosynthèse enzymatique. Ces derniers requièrent donc la molécule d'hème pour leur croissance (66).

L'hémoglobine due à sa masse moléculaire de 64,4 kDa ne peut pas traverser le canal d'une porine de la membrane externe (120). Le détachement des groupements hèmes aux chaînes globines semble alors être une étape essentielle à l'acquisition de l'hème provenant de l'hémoglobine. Aucune information concernant cette étape n'est disponible pour l'instant. L'hème, quant à lui, étant hydrophobique a tendance à s'agglomérer à pH physiologique (16). Ce qui suggère que l'hème ne traverserait pas le canal d'une porine de la membrane cellulaire sans protéine chaperone (151). Ces données laissent supposer que l'acquisition de l'hémoglobine, de l'hème ou de l'hémine impliquerait un processus médié par un récepteur protéique. Cette interaction spécifique avec un récepteur exposé à la surface constituerait une étape importante dans l'acquisition de l'hème (120, 155).

Certains chercheurs (120, 201) ont suggéré un système bactérien permettant l'acquisition de l'hémoglobine, de l'hème ou de l'hémine qui devrait contenir en général les éléments suivants (Figure 2): un moyen d'accéder au pool intracellulaire des hémoprotéines (les hémolysines); l'habileté à extraire l'hème lié aux protéines de transport du sérum (protéases dégradant l'hémoglobine); la présence de protéines de la membrane externe représentant des récepteurs fonctionnels accessibles à la surface (protéines liant l'hémoglobine, l'hème ou l'hémine); un moyen permettant le transport de l'hème intact dans le périplasme (protéine périplasmique); la présence de protéines de la membrane cytoplasmique permettant le passage de l'hème au cytoplasme (perméase); l'existence d'un élément fournissant l'énergie à ce système (Ton-B); et un moyen de réguler l'expression de ce système (le répresseur Fur). Chez les cellules

eucaryotes, il est postulé que la translocation de l'hème à travers les membranes des cellules dépend de récepteurs spécifiques liant l'hème (60, 61, 72, 194) et dont l'expression est induite par une restriction en fer (193). Chez les bactéries, plusieurs recherches supportent également ce modèle (voir sections 6.2.2). Il est par contre tentant de supposer une étape supplémentaire dans ce modèle hypothétique: l'existence de récepteurs non protéiques liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine représentant des réservoirs fonctionnels de ces composés hème à la surface de la bactérie pourrait être un mécanisme d'accumulation des groupements hème.

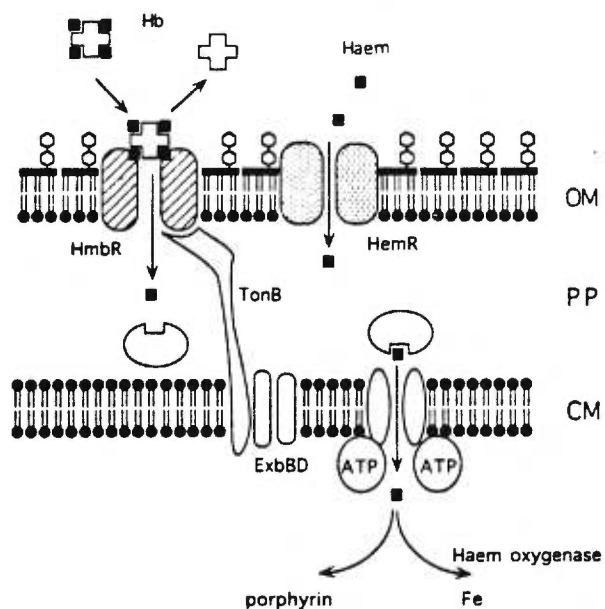


Figure 2. Modèle hypothétique général pour l'acquisition de l'hème, de l'hémine ou de l'hémoglobine. L'hémine libre ou lié à l'hémoglobine serait internalisé dans le périplasma via les récepteurs de la membrane externe par l'action des molécules TonB-ExbBD. La topologie exacte et l'identité précise de plusieurs récepteurs bactériens de surface demeure encore une spéculation. L'hémine serait transporté dans le cytoplasme par l'action d'un système comprenant une protéine périplasmique liant l'hémine, une perméase de la membrane cytoplasmique et une ATPase. Le fer serait relâché de l'anneau porphyrinique par l'action d'une oxygénase liant l'hème localisée dans le cytoplasme. Hémoglobine (Hb), récepteur d'hémoglobine (HmbR), récepteur d'hémine (HemR), membrane externe (OM), périplasma (PP), membrane cytoplasmique (CM). Modifié de Stojiljkovic et coll. (201).

3.2.1 La liaison entre le LPS bactérien et l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine

L'administration d'hémoglobine humaine purifiée comme substitut sanguin est associée en médecine humaine à de multiples toxicités organiques (176). Plusieurs de ces effets toxiques sont caractéristiques de ceux produits chez l'hôte par les endotoxines bactériennes (ou LPS). Afin de mieux comprendre le rôle potentiel du LPS dans la toxicité observée par l'hémoglobine humaine purifiée, certains chercheurs ont examiné les interactions entre ces deux molécules.

Roth et coll. (173-179) ont étudié la liaison du LPS de certaines entérobactéries (*Escherichia coli* O26:B6, *Salmonella typhimurium* PR122(Rc) et *Proteus mirabilis* S1959, R110 et R45) à l'hémoglobine humaine. Ces chercheurs ont démontré par plusieurs méthodes indépendantes la formation de complexes entre ces LPS et l'hémoglobine humaine purifiée. La liaison du LPS à l'hémoglobine humaine purifiée a été mise en évidence à l'aide de LPS radiomarké (103). La liaison du LPS à l'hémoglobine a été totalement inhibée par du LPS non marqué indiquant ainsi que la liaison était spécifique. Le LPS pouvait lier les deux sous-unités α et β de l'hémoglobine humaine purifiée. Par contre, une plus grande quantité de LPS se liait à la sous-unité β , indiquant ainsi une affinité plus forte pour celle-ci. Des études de liaison sur microplaque ont démontré que cette interaction était saturable et que la K_D était de $3,1 \times 10^{-8}$ M (103). L'insolubilité des LPS dans l'éthanol a été également utilisée afin de vérifier si l'hémoglobine humaine purifiée se complexait au LPS (176). La précipitation de l'hémoglobine par l'éthanol est augmentée en présence de LPS, prouvant ainsi la formation de complexe entre ces deux molécules.

Des ultrafiltrations de complexes hémoglobine-LPS sur des membranes de 300 et 100 kDa ont démontré que la majorité des LPS de ces complexes (87-97% et 64-72%, respectivement) sont détectables dans les filtrats (103). Alors qu'en absence d'hémoglobine, le LPS n'est pas détectable dans les filtrats. L'hémoglobine humaine purifiée entraîne donc une dissociation des LPS en particules de faibles masses moléculaires pouvant passer à travers ces membranes. Une centrifugation de densité sur un gradient de sucrose a démontré que le LPS co-migre avec l'hémoglobine, alors que le LPS libre a une vitesse de sédimentation plus élevée que le LPS des complexes hémoglobine-LPS (103, 175, 176). Ces résultats indiquent que l'hémoglobine humaine purifiée diminue la densité des LPS et modifie ainsi leur vitesse de sédimentation. Des

études en microscopie électronique à transmission ont révélé que l'hémoglobine humaine purifiée modifie l'ultrastructure des LPS en causant sa désaggrégation en petites particules (173). Ces études démontrent pour la première fois la formation de complexes entre l'hémoglobine et le LPS et indiquent que l'hémoglobine peut modifier certaines caractéristiques physiques et biologiques des LPS.

La liaison de l'hémoglobine humaine purifiée a été également associée à une augmentation de l'activité biologique du LPS déterminée par un test de LAL (103, 104, 175, 176). L'hémoglobine humaine purifiée a également augmenté l'habileté du LPS à stimuler la production de "tissue factor" par les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) (174) et par les cellules mononucléaires humaines (179). *In vitro*, l'hémoglobine a augmenté l'habileté du LPS à activer la coagulation (178) et la cascade du complément (46, 102). La synergie *in vitro* n'est pas encore comprise et demeure inexplicée.

La liaison entre le fer et le LPS a été également étudiée (180). Il a été démontré que 1,5 à 2 moles de fer se liait à 1 mole de LPS. La constante d'affinité entre le fer et le LPS est de 113 μM . Ces chercheurs ont également rapporté l'effet du fer sur l'activité biologique du LPS. La liaison du fer au LPS a entraîné une diminution de l'activité biologique déterminée par un test de LAL et une diminution de stimulation de l'activité procoagulante des cellules endothéliales. De plus, il a été rapporté que le LPS pré-incubé en présence de fer entraîne des taux de mortalité plus bas chez les souris comparés à ceux obtenus par l'injection de LPS seul (97, 162).

White et coll. (225) ont mené des études de toxicité *in vivo*. Un groupe de lapins recevant de l'hémoglobine contaminée par du LPS avait des taux de mortalité plus élevés comparé à ceux ayant reçu de l'hémoglobine sans LPS. Ces chercheurs ont également émis l'hypothèse que le LPS augmenterait l'activité toxique de l'hémoglobine humaine purifiée. En effet, une hépatotoxicité a été rapportée en absence de LPS, suggérant ainsi une toxicité intrinsèque par l'hémoglobine (128). De plus, il a été démontré que l'administration d'hémoglobine seule augmentait la susceptibilité des animaux et des humains aux infections bactériennes (17). L'hémoglobine s'est révélée être un facteur augmentant la virulence dans certaines infections péritonéales (17, 81, 82). Cet effet de virulence serait causé par l'habileté de l'hémoglobine à offrir aux bactéries envahissantes un supplément de fer pouvant soutenir une multiplication bactérienne rapide dans un environnement normalement restreint en fer (17, 75).

L'hémoglobine libre, l'hème et le fer peut également abolir l'effet bactéricide et bactériostatique du plasma (17) et inactiver les neutrophiles (109). Il a été aussi démontré que l'hémoglobine diminue l'influx de neutrophiles transpéritonéaux (81) et nuisait au chémotactisme et à la réponse phagocytaire (82). En utilisant un modèle murin, Griffiths et Stevenson (75) ont récemment étudié les effets de l'administration d'hémoglobine seule et ont démontré qu'elle aggrave les septicémies à *E. coli*. L'hémoglobine est donc par elle-même toxique chez l'hôte en bloquant ses défenses immunitaires et en permettant aux bactéries envahissantes de se multiplier plus rapidement. La contribution du LPS dans la toxicité *in vivo* de l'hémoglobine n'est pas encore bien comprise. Griffiths et Stevenson ont spéculé qu'un produit toxique, quel qu'il soit, administré chez l'hôte pourrait contribuer à la toxicité intrinsèque de l'hémoglobine (75).

La liaison du LPS bactérien à l'hémoglobine ou l'hémine a été également étudiée afin de comprendre l'importance de cette liaison chez les micro-organismes. L'hémine est un facteur de croissance chez *Porphyromonas gingivalis* (62). La liaison de l'hémine humaine au LPS de *P. gingivalis* a été démontrée (73). Cette activité liant l'hémine semble être médiée par la région du lipide A du LPS. De plus la cellule entière a été capable de lier l'hémine, démontrant ainsi indirectement qu'une région du lipide A est accessible en surface. Cette interaction a été suggérée comme moyen de stockage de l'hémine à la surface de la cellule bactérienne.

Actinobacillus actinomycetemcomitans est capable d'utiliser l'hémoglobine humaine comme seule source de fer pour sa croissance (74). Il a été démontré que le LPS d'*A. actinomycetemcomitans* pouvait lier l'hémoglobine humaine (74). Cette interaction ne semble pas impliquer la région du lipide A de la molécule de LPS étant donné qu'aucune inhibition n'a été observée avec le LPS pré-incubé en présence de polymyxine B, un antibiotique inhibiteur de l'activité biologique du LPS et capable de lier le lipide A du LPS. Les chercheurs ont proposé que cette liaison entre le LPS et l'hémoglobine pourrait faciliter l'acquisition du fer chez cette bactérie et suspectent également que cette interaction pourrait être due à la charge des deux molécules.

Des travaux menés dans notre laboratoire ont mis en évidence la liaison entre le LPS d'*A. pleuropneumoniae* et l'hémoglobine porcine (7). Cette liaison implique la région du lipide A du LPS car la polymyxine B a réussi à inhiber

l'attachement de l'hémoglobine au LPS de ce micro-organisme. De plus, il a été démontré en microscopie électronique à transmission à l'aide d'un anticorps anti-lipide A (AcMo E5) qu'une région du lipide A est accessible en surface.

Appelmelk et coll. (4) ont réalisé une étude portant sur la liaison entre la lactoferrine et le LPS de différentes bactéries à Gram négatif. Il a été démontré que la lactoferrine diminue l'habileté du LPS à stimuler la production de cytokines par les monocytes. Ces études *in vitro* ont démontré que la lactoferrine lie directement le lipide A purifié ainsi que le LPS intact de différentes bactéries à Gram négatif. Cette liaison a été inhibée par le lipide A et la polymyxine B. Cette interaction a été suggérée pour expliquer l'effet anti-endotoxique de la lactoferrine.

Aucun transport transmembranaire de molécule d'hème, d'hémine ou d'hémoglobine via le LPS n'a été rapporté dans la littérature. Le LPS ne permettrait donc pas le passage de ces molécules d'hème à travers la membrane externe. Cette fonction serait plutôt effectuée par des protéines de la membrane externe liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine (120).

3.2.2 Les protéines liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine

Plusieurs protéines dont la fonction serait de lier l'hémoglobine, l'hème ou l'hémine à la surface de la cellule bactérienne ont été caractérisées (120) et un résumé de celles découvertes jusqu'à ce jour est présenté dans le Tableau 1. Elles résident généralement dans la membrane externe, et leur domaine de liaison est accessible à la surface. Cette affirmation est supportée par les résultats d'études biochimiques portant sur le marquage de cellules entières et la chromatographie d'affinité de cellules entières. Le mécanisme d'interaction le plus fréquemment rencontré consiste en une liaison directe entre le récepteur de surface bactérien et le composé contenant de l'hème (18, 120, 127, 155). Seulement quelques uns de ces récepteurs liant l'hémoglobine, l'hème ou l'hémine ont été caractérisés au niveau génétique. Ces nouvelles informations ont démontré la nécessité de ces protéines bactériennes de surface dans l'acquisition du fer provenant de l'hémoglobine, de l'hème ou de l'hémine (120, 127).

Ces protéines liant l'hémoglobine, l'hème ou l'hémine démontrent une spécificité importante pour la molécule d'hème (14, 84, 117-119, 123). Cette propriété semble être conférée par la présence de fer à l'intérieur de l'anneau tétrapyrrole étant

donné que cette interaction ne s'étend pas à la protoporphyrine IX, un composé structurellement relié à l'hème (84, 117-119). La reconnaissance de la protéine escorte liant l'hémoglobine, l'hème ou l'hémine ne semble pas en général être un préalable au processus (84, 117-119, 123). C'est pourquoi une propriété implicite de ces récepteurs semble être leur capacité à lier l'hème sans tenir compte de l'environnement protéique immédiat (120). Des études de compétition (117-119) et de mutation (84) confirment cette propriété.

Plusieurs protéines liant l'hémoglobine, l'hème ou l'hémine ont été identifiées chez des bactéries du genre *Haemophilus* et *Neisseria*. *Haemophilus influenzae* est un parasite strict retrouvé surtout au niveau des muqueuses respiratoires des vertébrés. *H. influenzae* type b peut causer des méningites, des péricardites et des pneumonies chez les humains (30). *H. influenzae* est un pathogène qui requiert de l'hème pour sa survie (78). Chez ce micro-organisme, une protéine de 39,5 kDa de la membrane externe liant l'hémine et régulée par le fer a été reconnue pour avoir également une spécificité pour l'hémoglobine (118). De plus, le gène, *hel*, codant pour une lipoprotéine E(P4) de la membrane externe semble être essentiel dans l'acquisition de l'hème par *H. influenzae* dans des conditions aérobiques (167). Cette lipoprotéine E(P4) jouerait un rôle dans la liaison et/ou le transport de l'hème chez *H. influenzae* (167).

Une lipoprotéine périplasmique de 51 kDa liant l'hème, nommée HbpA, a été découverte chez *H. influenzae* type b (78) et sa structure ainsi que ses fonctions ont été étudiées (38). Cette lipoprotéine serait impliquée dans l'importation de l'hème à travers la membrane interne à l'intérieur de la bactérie et serait l'élément clef de la survie de ce micro-organisme dans le sang. La lipoprotéine HbpA serait une cible intéressante car son inhibition permettrait l'arrêt du transport de l'hème. Cette lipoprotéine pourrait également servir comme moyen de transport sélectif permettant à des composés toxiques d'atteindre l'intérieur de la cellule bactérienne. Les chercheurs suggèrent que leurs résultats est le point de départ de nouvelles stratégies concernant le développement de nouvelles drogues (38).

En utilisant une méthode de purification par affinité à l'aide d'hémoglobine-agarose, une protéine régulée par le fer de 120 kDa liant l'hémoglobine, nommée HgpA a été isolée chez *H. influenzae* type b souche HI689 (101). Ren et coll (168) ont identifié par la suite une autre protéine de 115 kDa, dénommée HgpB, liant

l'hémoglobine seule ou complexée à l'haptoglobine chez *H. influenzae* HI689. Un double mutant HgpA et HgpB a présenté une habileté réduite à utiliser l'hémoglobine complexée à l'haptoglobine, par contre son aptitude à utiliser l'hémoglobine seule n'a pas été altérée. Un isolement par chromatographie d'affinité des protéines liant l'hémoglobine du double mutant a révélée une nouvelle protéine d'approximativement 120 kDa. La séquence interne de ce peptide a révélée que cette nouvelle protéine liant l'hémoglobine est une troisième protéine mais hautement homologue à HgpA et HgpB. (168). Des travaux réalisés sur des sécrétions provenant des canaux auditifs de jeunes enfants ont révélé que les gènes codant pour la protéine HgpA de 120 kDa liant l'hémoglobine chez *H. influenzae* sont transcrits *in vivo* lors d'otites aiguës (224).

Wong et coll. (226) ont également identifié et caractérisé des récepteurs de l'hème complexé à l'hémopexine chez la souche 760705 d'*H. influenzae* type b. Trois protéines de la membrane externe de 29, 38 et 57 kDa ont été identifiées comme des récepteurs d'hémopexine par chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne Sépharose-4B couplée à de l'hémopexine. De plus, ces récepteurs seraient régulés par le fer. Après immunobuvardage, les protéines de 29 et 57-kDa ont été capables de lier l'hémopexine. Les auteurs suggèrent alors l'existence d'au moins deux récepteurs liant l'hème complexé à l'hémopexine chez *H. influenzae* type b.

Haemophilus ducreyi est l'agent causal d'une infection transmissible sexuellement qui se manifeste par des ulcérations génitales pouvant être accompagnées par une lymphadénopathie génitale (39). *H. ducreyi* doit obtenir la molécule d'hème de son hôte étant incapable de la synthétiser lui-même. Les hémolysines produites par ce pathogène permettent la libération de l'hémoglobine des globules rouges (156). Ce micro-organisme ne produit pas de sidérophore et est incapable d'utiliser la transferrine et la lactoferrine comme source de fer pour croître; l'hémine et l'hémoglobine représentent donc des sources de fer et d'hème importantes pour *H. ducreyi*. Une protéine de 100 kDa liant l'hémoglobine, désignée HgbA, a été identifiée récemment chez plusieurs souches d'*H. ducreyi* (39). Cette protéine semble être fonctionnellement et immunologiquement conservée parmi diverses souches d'*H. ducreyi* (39). L'expression de HgbA est régulée par le niveau d'hémine dans le milieu de culture et non par la quantité de fer. La liaison de l'hémoglobine à *H. ducreyi* n'est pas spécifique d'espèce car l'hémoglobine de plusieurs espèces animales ont supporté la croissance d'*H. ducreyi* et ont compétitionné contre de l'hémoglobine humaine marquée (39). Le gène *hgbA* codant pour cette protéine liant l'hémoglobine a été

identifié et caractérisé (40). Des insertions ou des délétions dans le gène *hgbA* ont aboli l'expression de la protéine HgbA ainsi que la liaison à l'hémoglobine. Une mutagenèse dans le gène *hgbA* effectuée par insertion à l'aide d'échanges alléliques a aboli la liaison à l'hémoglobine ainsi que son utilisation comme source de fer. La séquence déduite en acides aminés est similaire à celle des récepteurs de la membrane externe appartenant à la famille TonB-dépendante (40)

La construction de mutants isogéniques HgbA a démontré que ce récepteur d'hémoglobine était TonB-dépendant (36). Le séquençage des gènes du système TonB a révélé que leur arrangement était *exbB exbD TonB*. La proximité et la structure de ces gènes suggèrent qu'ils soient transcrits en opéron. Leur arrangement et leur séquence en nucléotides et en acides aminés sont très similaires à ce que l'on retrouve chez les autres *Pasteurellaceae*. Un mutant isogénique HgbA d'*H. ducreyi* n'a pas été capable de lier ou d'utiliser l'hémoglobine comme source de fer mais a réussi cependant à utiliser l'hémine libre, indiquant que l'utilisation de l'hémine ne requiert pas le récepteur d'hémoglobine HgbA. De plus il a été démontré par Stevens et coll. (197) qu'un mutant isogénique de *hgbA* (*HupA* mutant) exprime une virulence réduite dans un modèle animal d'infection pour *H. ducreyi*.

Le gène *tdhA* codant pour un récepteur de la membrane externe de 75 kDa liant l'hème chez *H. ducreyi* a été cloné puis séquencé (210). Ce récepteur est exprimé dans des conditions restreintes en hème et semble bien conservé chez les différentes souches d'*H. ducreyi*. Une boîte TonB semble être présente près de l'extrémité N-terminale de TdhA et des boîtes *Fur* ont été observées dans la région du promoteur de *tdhA*. Les homologies de séquences ont révélé une relation avec cinq récepteurs TonB-dépendants appartenant à d'autres bactéries. Des études de comparaison entre HgbA et TdhA ont mis en évidence que dans des conditions de restriction en hème, la protéine HgbA est exprimée 50 à 100 fois plus que la protéine TdhA. Cette dernière observation laisse supposer l'existence d'un système complexe de régulation.

Neisseria gonorrhoeae est l'agent étiologique de la gonorrhée, une maladie transmissible sexuellement affectant l'humain et caractérisée par une inflammation purulente du tractus génital mâle et femelle (20). La majorité des isolats de *N. gonorrhoeae* ne peuvent pas utiliser l'hémoglobine humaine comme source de fer pour leur croissance par contre une minorité d'isolats en sont capables. Cette population mineure d'isolats croît facilement à l'aide d'hémoglobine et exprime des protéines de la

membrane externe de 42 kDa (HpuA) et de 89 kDa (HpuB) liant l'hémoglobine dans des conditions restreintes en fer. Il semble que les deux protéines soient nécessaires à l'utilisation de l'hème provenant de l'hémoglobine (20).

Chen et coll. (21) ont identifié et purifié également une protéine de la membrane externe de 89 kDa régulée par le fer et liant l'hémoglobine chez *N. gonorrhoeae*. La séquence N-terminale des acides aminés de la protéine a révélé qu'en positions de 2 à 16, les acides aminés sont identiques à ceux d'une protéine de la membrane externe de 85 kDa de *N. meningitidis* régulée par le fer et liant le complexe hémoglobine-haptoglobine. Des mutants isogéniques construits par échange allélique n'exprimant plus la protéine de 89 kDa ont été incapables d'utiliser l'hémoglobine pour supporter leur croissance; ils peuvent par contre croître à l'aide d'hème. Les chercheurs suggèrent que ce récepteur liant l'hémoglobine est fonctionnel et essentiel à la croissance à l'aide d'hémoglobine.

N. gonorrhoeae exprime également deux protéines liant l'hémine de masse moléculaire de 97 et 44 kDa. Un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine de 97 kDa liant l'hémine a inhibé l'utilisation de l'hémine par la bactérie. Ce qui suggère que la protéine de 97 kDa de *N. gonorrhoeae* soit impliquée dans l'acquisition en fer sous forme d'hémine (122).

Neisseria meningitidis est l'agent causal d'une méningite cérébro-spinale d'allure épidémique chez l'humain (201). Les protéines liant l'hémine chez *N. meningitidis* possèdent des masses moléculaires de 98 et 50 kDa, qui ressemblent beaucoup à celles retrouvées chez *N. gonorrhoeae* (117). De plus, des anticorps ont révélé que les protéines de *N. meningitidis* et de *N. gonorrhoeae* sont antigéniquement reliées (120).

Le gène codant pour un récepteur liant l'hémoglobine chez *N. meningitidis* du séro-groupe C a été cloné par complémentation dans un mutant *E. coli* requérant de la porphyrine (201). Ce gène nommé *hmbR* code pour une protéine de la membrane externe de 89.5 kDa et elle possède une homologie de séquence en acides aminés avec des récepteurs TonB-dépendants de d'autres bactéries à Gram négatif. La protéine HmbR est très similaire aux récepteurs de transferrine et de lactoferrine des *Neisseria*. Un mutant *hmbR* a été incapable d'utiliser l'hémoglobine mais pouvait toujours utiliser l'hémine comme source de fer. Il s'est révélé atténué dans un modèle d'infection chez

le rat, ce qui indique que l'utilisation de l'hémoglobine est importante dans la virulence chez *N. meningitidis* (201). D'autres clones qui n'ont pas hybridé avec la sonde *hmbR* ont complété un mutant porphyrine *E. coli hemA aroB* sur un milieu gélosé supplémenté en hémine. Les chercheurs suggèrent alors l'existence d'un second gène codant pour un récepteur spécifique à l'hémine chez *N. meningitidis* (201). Il serait possible que le récepteur pour l'hémine soit indispensable pour l'utilisation de l'hème provenant de l'hémoglobine (120). Cette deuxième protéine pourrait avoir le rôle de faciliter voir même augmenter l'efficacité de la liaison à l'hème. Ceci ressemble au modèle proposé pour le récepteur de la transferrine chez *N. gonorrhoeae* où la protéine 2 liant la transferrine posséderait le rôle de faciliter la liaison de la transferrine à l'autre récepteur (120).

L'opéron *hpuAB* de *N. meningitidis* codant pour des protéines permettant l'utilisation de l'hémoglobine complexée à l'haptoglobine a été récemment caractérisé (126). Une protéine de la membrane externe régulée par le fer de 85 kDa, nommé HpuB, est requise pour l'utilisation du fer provenant de l'hémoglobine seule ou de l'hémoglobine complexée à l'haptoglobine. Le gène *hpuB* a été cloné et la séquence en acide aminé du produit de ce gène a révélé un récepteur de la membrane externe appartenant à la famille TonB. Le gène *hpuA*, codant pour une lipoprotéine de 34,8 kDa a été par la suite identifié (126). La structure de cet opéron suggère que HpuA et HpuB représente un système de récepteurs à deux composantes analogue aux récepteurs de transferrine TbpA et TbpB. La protéine HmbR s'est révélée être identique à HpuB (201). De plus, une protéine périplasmique liant l'hémine a été proposée chez *N. meningitidis* (201).

Tableau 1. Protéines bactériennes liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine de l'hôte.

Bactérie	Nom de la protéine ou du gène	Nature et localisation	Masse moléculaire (kDa)	Fonction	Référence
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 souche EDL 933	<i>chuA</i>	IROMP	69	lie hémine	(213)
<i>Escherichia coli</i> EB1	<i>hbp</i>	protéase	110	lie hème	(154)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	HgbA ou HupA	OMP TonB-dépendante	100-108	lie Hb et Hb-haptoglobine	(39)
	<i>tdhA</i>	OMP TonB-dépendante	75	lie l'hème	(210)
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	-	IROMP	39,5	lie Hb et hémine	(118)
	HgpA	IROMP	120	lie Hb et Hb-haptoglobine	(101)
	HgpB	OMP	115	lie Hb et Hb-haptoglobine	(168)
	-	protéine	120	lie Hb	(168)

Tableau 1. Protéines bactériennes liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine de l'hôte (suite).

Bactérie	Nom de la protéine ou du gène	Nature et localisation	Masse moléculaire (kDa)	Fonction	Référence
<i>Haemophilus influenzae</i> type b (suite)	HbpA	lipoprotéine, périplasme	51	lie hème	(78)
	HxuA	OMP sécrétée	100	lie hème-hémopexine	(24)
	HxuB	OMP	60	lie hème-hémopexine	(24)
	HxuC	OMP	78	lie hème-hémopexine	(24)
	-	IROMP	29	lie hème-hémopexine	(226)
	-	IROMP	38	lie hème-hémopexine	(226)
	-	IROMP	57	lie hème-hémopexine	(226)
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>hbp</i>	protéine sécrétée	15,5	lie hémine	(153)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	HpuA	IROMP	42	lie Hb	(20)
	HpuB	IROMP	89	lie Hb	(20)
	-	protéine	44	lie hémine	(122)
	-	protéine	97	lie hémine	(122)

Tableau 1. Protéines bactériennes liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine de l'hôte (suite).

Bactérie	Nom de la protéine ou du gène	Nature et localisation	Masse moléculaire (kDa)	Fonction	Référence
<i>Neisseria meningitidis</i>	HmbR ou HpuB	OMP TonB-dépendante	85-89,5	lie Hb et Hb-haptoglobine	(201)
	HpuA	lipoprotéine	34.8	lie Hb et Hb-haptoglobine	(126)
	-	protéine	98	lie hémine	(117)
	-	protéine	50	lie hémine	(117)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	HGP15	protéine	19	lie Hb	(58)
	KGP	protéinase	51	lie Hb	(227)
	-	OMP	26	lie hémine	(14)
	-	OMP	30/24	lie hémine	(87)
	-	protéine	32/19	lie hémine	(192)
<i>Proteus mirabilis</i>	-	IROMP	64	lie hémine	(160)
	-	IROMP	66	lie hémine	(160)
<i>Serratia marcescens</i>	HasA	protéine sécrétée	19	lie Hb et hème	(123)
	HasR	OMP	92	lie Hb et hème	(66)
	HasD	protéine, membrane interne	60,8	transport de HasA	(124)
	HasE	protéine, membrane interne	47,8	transport de HasA	(124)

Tableau 1. Protéines bactériennes liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine de l'hôte (suite).

Bactérie	Nom de la protéine ou du gène	Nature et localisation	Masse moléculaire (kDa)	Fonction	Référence
<i>Shigella flexneri</i>	-	OMP	101	lie hème	(204)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	protéine majeure, enveloppe	43	lie hémine	(205)
	-	protéine mineure	76	lie hémine	(205)
	-	protéine mineure	67	lie hémine	(205)
	-	protéine mineure	60	lie hémine	(205)
	-	protéine mineure	40	lie hémine	(205)
	-	protéine mineure	35	lie hémine	(205)
	-	protéine mineure	32	lie hémine	(205)
	-	protéine mineure	13	lie hémine	(205)
<i>Vibrio anguillarum</i> RV22	-	IROMP	88	lie Hb et hémine	(130)
	-	OMP	82	lie Hb et hémine	(130)
	-	IROMP	76	lie Hb et hémine	(130)
	-	OMP	46	lie Hb et hémine	(130)
	-	OMP	37	lie Hb et hémine	(130)

Tableau 1. Protéines bactériennes liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine de l'hôte (suite).

Bactérie	Nom de la protéine ou du gène	Nature et localisation	Masse moléculaire (kDa)	Fonction	Référence
<i>Vibrio</i>	-	OMP	97	lie Hb et hémine	(130)
<i>anguillarum</i>	-	IROMP	79	lie Hb et hémine	(130)
H775-3	-	IROMP	76	lie Hb et hémine	(130)
	-	OMP	56	lie Hb et hémine	(130)
	-	OMP	46	lie Hb et hémine	(130)
	-	OMP	39	lie Hb et hémine	(130)
<i>Vibrio cholerae</i>	-	protéine, membrane interne	26	lie Hb et hémine	(83)
	-	IROMP	77	lie Hb et hémine	(83)
<i>Vibrio parahaemoliticus</i>	-	OMP	83	lie hémine	(228)
<i>Vibrio vulnificus</i> biotype 2 séro groupe E souche E86	-	OMP	36,5	lie Hb et hémine	(48)

Tableau 1. Protéines bactériennes liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine de l'hôte (suite).

Bactérie	Nom de la protéine ou du gène	Nature et localisation	Masse moléculaire (kDa)	Fonction	Référence
<i>Yersinia</i>	HemR	IROMP	78	lie hémine	(199)
<i>enterocolitica</i>	HemP	-	6,5	lie hémine	(199)
	HemS	protéine cytoplasmique	42	enzyme, lie hémine	(200)
	HemT	protéine périplasmique	27	lie hémine	(200)
	HemU	perméase		lie hémine	(200)
	HemV	protéine liant l'ATP	24,5	transport hémine	(200)

3.2.3 Le système hémophore-dépendant

Dans les sections discutées précédemment, les récepteurs de la membrane externe reconnaissent directement les composés hème, hémine ou hémoglobine. Une autre façon d'obtenir ces composés impliquerait la sécrétion d'une protéine, dénommée hémophore, liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine retrouvés dans l'environnement; l'hémophore transporterait ensuite ces composés à un récepteur spécifique localisé dans la membrane externe (66). Ce système d'acquisition du fer provenant de l'hème, de l'hémine ou de l'hémoglobine se nomme système hémophore-dépendant et il a été détecté jusqu'à maintenant chez *H. influenzae* (23), *Serratiamarcescens* (123) et *E. coli* souche EB1 (154).

L'utilisation par *S. marcescens* de l'hème lié à l'hémoglobine requiert une protéine extracellulaire de 19 kDa liant l'hème, dénommée HasA (123). Selon les chercheurs, HasA servirait d'intermédiaire véhiculant ainsi l'hème au récepteur de surface pour l'internalisation subséquente. La protéine HasA est sécrétée via un système ABC transporteur et la chaperone SecB serait impliquée dans la sécrétion de cette protéine (33). Les travaux de Létoffé et coll. (124) ont permis l'identification chez *S. marcescens* d'une protéine de la membrane interne, HasD, possédant une cassette liant l'ATP, et d'une deuxième protéine de la membrane interne, HasE qui serait probablement la protéine de fusion. Les gènes *HasA*, *HasD*, et *HasE* appartiennent au même opéron et *Fur* semble réguler la transcription de cet opéron (124).

Ce système d'acquisition de l'hème chez *S. marcescens* a été également étudié chez un mutant d'*E. coli hemA* possédant des défauts enzymatiques dans la biosynthèse de l'hème et ne pouvant pas alors utiliser les suppléments d'hème exogène pour croître (66). Ceci implique que ce mutant ne possède pas de système de transport de l'hème à travers son enveloppe cellulaire. Des études de complémentation ont mis en évidence une OMP régulée par le fer de 92 kDa, dénommée HasR, qui à elle seule a permis au mutant *E. coli hemA* de croître avec de l'hème ou de l'hémoglobine comme seule source de fer. Ceci indique que HasR est essentielle à l'acquisition de l'hème provenant de l'hémoglobine. La sécrétion de la protéine extracellulaire liant l'hème HasA par le mutant *E. coli hemA* n'a pas permis à elle seule la croissance à l'aide d'hème ou d'hémoglobine démontrant ainsi que cette protéine ne semble pas essentielle au système. Par contre la sécrétion concomitante de HasA par le mutant *E. coli hemA* produisant HasR a grandement facilité l'acquisition de l'hème provenant de

l'hémoglobine. Sa sécrétion a en effet réduit de 100 fois la concentration minimale d'hémoglobine satisfaisant les besoins en porphyrine de la cellule. Les chercheurs suspectent que la protéine HasA, tout comme un sidérophore, pourrait lier l'hème ou l'hémoglobine de l'environnement et délivrer ensuite ces molécules à une OMP spécifique pour le complexe hème-HasA. Cette étude constitue le premier rapport démontrant une synergie entre une OMP, HasR, et une protéine extracellulaire liant l'hème, HasA. Cette dernière jouerait alors le rôle d'un transporteur de l'hème et les chercheurs l'ont nommé un hémophore.

H. influenzae type b souche DL42 est également capable de lier l'hème complexé à l'hémopexine (79, 226). Une protéine de la membrane externe de 100 kDa, nommée HxuA, a été identifiée chez *H. influenzae* type b comme étant un récepteur de l'hème complexé à l'hémopexine (79). Cette protéine semble fonctionnellement conservée parmi les souches d'*H. influenzae* et s'est retrouvée également dans le surnageant de culture (23). Des investigations génétiques ont défini une série de gènes impliqués dans le processus (24). L'analyse des mutations a incriminé trois gènes, nommé *hxuB*, *hxuC*, et *hxuA*, dans l'utilisation de l'hème complexé à l'hémopexine (24). Les gènes *hxuC* et *hxuB* codent pour des OMPs. La protéine HxuC de 78 kDa s'est révélée similaire aux OMPs TonB-dépendantes appartenant à d'autres bactéries. Alors que l'OMP de 60 kDa, dénommée HxuB, est similaire à l'hémolysine ShlB de *S. marcescens*. Des mutants de chacun de ces gènes ont été construits et aucun n'a été capable d'utiliser l'hème complexé à l'hémopexine. La protéine HxuB semble être impliquée dans le relâchement de la molécule soluble HxuA. Alors que l'expression de l'OMP HxuC semble requise pour l'utilisation de l'hème libre à faible concentration par *H. influenzae* type B. Un scénario ressemblant à celui proposé pour la protéine HasA de *S. marcescens* serait alors possible pour *H. influenzae* type b. L'acquisition de l'hème complexé à l'hémopexine serait alors en partie médiée par la liaison de ce composé à la forme sécrétée de la protéine HxuA (120). Ce complexe se lierait ensuite à la surface de la cellule bactérienne via d'autres récepteurs: les protéines HxuC, HxuB ou bien les protéines déjà décrites de 57, 38 ou 29 kDa (226). Une liaison directe entre l'hème complexé à l'hémopexine et la membrane externe pourrait également se réaliser indépendamment de la protéine HxuA, et pourrait représenter une méthode directe de liaison de l'hème complexé à l'hémopexine (120).

Otto et coll. (154) ont caractérisé une protéase de 110 kDa liant l'hémoglobine de la souche EB1 d'*E. coli* provenant d'une infection de plaie intra-

abdominale chez un humain. Cette enzyme apparaît être également une protéine liant l'hème. Une purification par affinité de cette protéine bifonctionnelle a permis d'identifier le produit extracellulaire du gène, puis de cloner et d'analyser ce gène. Cette protéine semblerait interagir d'abord avec l'hémoglobine, puis la dégraderait et subséquemment lierait la molécule d'hème relâchée. Ces résultats suggèrent que la protéine serait impliquée dans l'acquisition de l'hème provenant de l'hémoglobine. Cette protéase appartient à la classe IgA1 protéase-like, plus précisément à la famille Tsh. Elle serait portée par le plasmide de virulence pCoIV-K30 de 144 kpb et serait sécrétée comme un précurseur polypeptidique. Sa translocation à travers la membrane externe et son clivage subséquent semblerait être très rapide. Son transfert à travers la membrane cytoplasmique serait un processus plus lent. Les chercheurs suggèrent que cette protéase liant l'hémoglobine est une protéine autotransporteur. Les autotransporteurs sont de larges polypeptides organisés en domaines fonctionnels et sont éventuellement transloqués à la surface de la cellule. Les fonctions de translocation nécessaires seraient exécutées par son précurseur polypeptidique de 148 kDa. Le domaine B du précurseur serait responsable pour le transport final de cette protéase de 110 kDa à travers la membrane externe. Une étude présentement en cours vise à déterminer le ou les récepteur(s) membranaire(s) de ce système. Les chercheurs suspectent qu'un récepteur de l'hème de 69 kDa (213) pourrait possiblement jouer ce rôle.

3.2.4 Le transport bactérien de l'hème, de l'hémine et de l'hémoglobine

Chez les bactéries à Gram négatif, le fer doit être transporté à travers la membrane externe pour atteindre l'espace périplasmique; il doit ensuite se déplacer du périplasme au cytoplasme (1). Les événements succédant à la liaison entre l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine et leur(s) récepteur(s) bactérien(s) commencent à se définir. La dissociation du complexe récepteur-hème, hémine ou hémoglobine semble un événement spontané requérant peu d'énergie (195). L'hème semble être ensuite activement transporté à l'intérieur de la bactérie (26, 32, 62, 84).

Une fois l'hème à la surface de la cellule bactérienne, il peut alors traverser la membrane externe de deux façons. Le premier système de transport serait dépendant de la protéine TonB et permettrait ainsi le transport de l'hème à travers la membrane externe (120). Les informations suivantes supportent cette théorie: la présence d'un gène TonB ou de son équivalent (99), la présence d'une boîte TonB (111, 199, 201),

l'homologie structurale avec d'autres protéines TonB-dépendantes déjà caractérisées (83, 111, 199, 201) et la présence de protéines ExbB, ExbD et TonB (98). L'autre mécanisme, peu répandu, n'entraînerait pas le relâchement de l'hème à la surface cellulaire mais impliquerait plutôt le transfert du complexe hème-récepteur à travers la membrane externe comme il a été démontré pour la protéine de la membrane externe de 26 kDa chez *Porphyromonas gingivalis* (15). On ne sait pas encore si ce mécanisme est TonB-indépendant (120).

L'effet oxydatif de l'hème libre laisse supposer la présence d'une protéine de transport périplasmique permettant de véhiculer l'hème du périplasma au cytoplasme bactérien (120). La découverte, chez *Yersinia enterocolitica*, des composantes formant un ABC transporteur contrôlé par trois gènes (200) a confirmé cette spéculation (120). Une lipoprotéine de 51 kDa, nommée HbpA, a été identifiée comme étant une composante périplasmique chez *H. influenzae* type b (78, 80). Alors que chez *Vibrio cholerae* une composante de la membrane interne de 26 kDa serait également une candidate périplasmique (84). Une perméase, comme celle découverte chez *Y. enterocolitica* (200), permettrait ensuite l'entrée de l'hème dans le cytoplasme.

Plusieurs événements différents peuvent arriver à l'hème une fois à l'intérieur du cytoplasme. Certains de ces événements sont l'incorporation directe à l'intérieur des hémoprotéines, ou libération du fer de l'anneau porphyrinique et l'entrée de ce fer dans le pool de fer inorganique de la bactérie (120). Cette libération requiert la présence d'une enzyme dégradant l'hème, probablement une homologue de l'hème oxygénase. Un gène codant pour une protéine possédant ce genre d'activité a été isolé chez *Y. enterocolitica* (200).

Les facteurs gouvernant le trajet de l'hème à travers les différents compartiments de la cellule bactérienne demeurent encore peu compris (120). Le fer joue probablement un rôle primordial dans la régulation de l'expression des protéines impliquées dans l'acquisition du fer provenant de l'hème, de l'hémine ou de l'hémoglobine. L'expression de plusieurs protéines telle que HemR (199), HutA (84), et le récepteur hème-hémopexine (226) est augmentée dans des conditions de restriction en fer. Lorsque la disponibilité du fer est restaurée, la synthèse de ces protéines est alors réprimée (120). Des recherches ont identifié une séquence Fur localisée en amont du codon de départ chez *hxuC* (23), *hemR* (199), et *hutA* (83). De plus, l'identification chez *N. meningitidis* (108, 211) et *N. gonorrhoeae* (10) d'un homologue Fur confirme

que ce répresseur gouverné par le fer est également fonctionnel chez les pathogènes appartenant à la famille des *Neisseriaceae*. Chez *H. influenzae*, l'hème satisfait des demandes en fer et également une indispensable demande en porphyrine (26). C'est pourquoi un autre système de régulation impliquant l'hème semblerait exister chez cette bactérie (79, 139).

3.2.5 Méthodes mettant en évidence l'activité liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine

Plusieurs études ont examiné l'activité liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine chez différentes espèces bactériennes (120). Ces différentes méthodes se veulent être qualitatives ou quantitatives pour la bactérie entière et nous permettent donc de visualiser ou de quantifier la liaison de l'hème, de l'hémine ou de l'hémoglobine par la bactérie.

L'activité liant l'hémine chez *Legionella pneumophila*, *A. pleuropneumoniae*, *P. gingivalis* et *H. influenzae* Type b a été mise en évidence par une méthode liquide où l'analyse des résultats est effectuée par spectrophotométrie (34, 62, 78). Elle consiste à mesurer indirectement l'activité liant l'hémine ou l'hémoglobine en quantifiant l'habileté de la bactérie à enlever ces composés d'une solution dont la concentration en hémine ou en hémoglobine est bien connue. Une concentration fixe de bactérie est exposée à une concentration croissante d'hémine ou d'hémoglobine. Après incubation et centrifugation, l'absorbance du surnageant est obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 400 nm. Une solution d'hémine ou d'hémoglobine sans bactérie dont on connaît la concentration et la densité optique sert alors de contrôle. Il reste ensuite à établir la quantité d'hémine ou d'hémoglobine qui n'est plus dans le surnageant mais plutôt liée à la bactérie. L'activité liant l'hémine ou l'hémoglobine est donc inversement proportionnelle à l'absorbance du surnageant.

L'activité liant l'hémoglobine chez *Prevotella intermedia* et *P. gingivalis* a été déterminée par liaison directe en utilisant l'hémoglobine humaine radiomarquée à l'iode¹²⁵ (3, 62, 125). Le principe de la technique est d'incuber des concentrations croissantes d'hémoglobine marquée à une quantité précise de bactéries. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gradient de sucrose puis centrifugés. La radioactivité est ensuite déterminée par un compteur gamma. Les résultats sont analysés par un programme nommé "Equilibrium Binding Data Analysis".

La liaison de l'hémoglobine par des souches d'*E. coli*, d'*Haemophilus* et de *Neisseria* a été quantifiée par des tests d'immunobuvardage en utilisant de l'hémoglobine biotinylée (20, 21, 49, 101, 121, 129, 202, 226). Le principe consiste à effectuer des dilutions en série de cellules bactériennes entières et de les déposer sur une membrane de nitrocellulose. Une concentration prédéterminée d'hémoglobine biotinylée est ensuite ajoutée. La membrane est incubée avec un conjugué avidine ou streptavidine qui se lie alors avec la partie biotinylée de l'hémoglobine. La réaction est révélée grâce au substrat, le 4-chloro-1-naphthol. Ce type de protocole a été également utilisé pour doser l'activité liant l'hémoglobine chez *N. meningitidis* et *P. gingivalis* (58) avec de l'hémoglobine marquée à la peroxidase. Après la révélation, les immunobuvardages sont quantifiés en utilisant un densitomètre.

L'activité liant l'hème complexé à l'hémopexine a été déterminée chez *H. influenzae*. De l'hème couplé à de l'hémopexine humaine a été marqué à la radioactivité à l'aide d'iode¹²⁵ et a été utilisé dans une méthode d'immunobuvardage sur cellules entières (23). Des empreintes de colonies bactériennes sont effectuées sur un papier filtre Whatman. Le filtre est ensuite incubé avec le complexe hème-hémopexine-iode¹²⁵. Après lavages le filtre est autoradiographié. Cette technique a été également utilisée pour mettre en évidence l'activité liant l'hémoglobine chez *H. ducreyi* à l'aide d'hémoglobine humaine radiomarquée à l'iode¹²⁵ (39).

La liaison de l'hémoglobine porcine à la surface d'*A. pleuropneumoniae* a été précédemment démontrée dans notre laboratoire par microscopie électronique à transmission (7). Une goutte d'une suspension bactérienne est placée sur une grille qui est par la suite incubée en présence d'hémoglobine porcine. Les grilles sont ensuite incubées avec un antisérum de lapin contre l'hémoglobine porcine puis incubées avec un antisérum contre des IgG de lapin conjugué à des particules d'or. Puis les grilles sont colorées par coloration négative au phosphotungstate et examinées à l'aide d'un microscope électronique à transmission.

Jusqu'à présent, aucune étude ne mentionne l'utilisation de la cytométrie en flux afin de quantifier l'activité liante de chacune des cellules d'une population bactérienne.

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Article 1:

ARCHAMBAULT, Marie, Martin Olivier, Bernadette Foiry, Moussa Diarra,
Sonia-Élaine Paradis et Mario Jacques.

Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of
Actinobacillus pleuropneumoniae lipopolysaccharides.

Journal of Endotoxin Research 4: 53-65, 1997.

Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides

M. Archambault,¹ M. Olivier,² B. Foiry,¹ M. S. Diarra,³
S.-É. Paradis,¹ M. Jacques¹

¹Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

²Pavillon CHUL, Laboratoire et Service d'Infectiologie, and ³Pavillon St-François d'Assise, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Québec, Canada

Summary Binding of pig hemoglobin (Hb) to *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide (LPS), either extracted or present at the surface of whole cells, was studied. After a short incubation period, pig Hb seemed to cover the bacterial cell surface and enhanced the cells' contrast when examined by transmission electron microscopy (TEM). Energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis showed that the amount of elemental iron detected was increased when cells of *A. pleuropneumoniae* were incubated with pig Hb. Coating with pig Hb, however, did not interfere with the accessibility of O- and capsular antigens to antibodies on the bacterial cell surface. Binding of pig Hb and polymyxin B to lipid A of *A. pleuropneumoniae* was confirmed with a fluorescent probe (dansylcadaverine) displacement assay. The binding of pig Hb to extracted LPS resulted in a disaggregation of LPS as observed by TEM after negative staining. Additional evidence for a direct physical interaction between pig Hb and *A. pleuropneumoniae* LPS was demonstrated by a shift in the sedimentation velocity of LPS-Hb complexes determined by sucrose gradient centrifugation. Pig Hb binding to extracted LPS or to bacterial cells resulted in a significant decrease of chromogenic *Limulus* amoebocyte lysate activation. Finally, the capacity of extracted LPS to induce NO₂⁻ in the presence of pig Hb was tested by using cell line J774 and determined by the Greiss' reaction. LPS alone induced, as expected, NO₂⁻ production, whereas the presence of pig Hb significantly reduced NO₂⁻ production by murine macrophages. Taken together, our results indicate that binding of pig Hb affected some physical and biological properties of *A. pleuropneumoniae* LPS.

INTRODUCTION

Recent studies have clearly demonstrated that in vitro, complex formation occurs between endotoxin (LPS or

lipopolysaccharide) and human hemoglobin (Hb), and that the procoagulant activity of these complexes was increased compared with endotoxin alone as determined by LAL (*Limulus* amoebocyte lysate) gelation or chromogenic tests.¹⁻³ In addition, these endotoxin-Hb complexes have increased potency for the production of tissue factor by cultured human umbilical vein endothelial cells⁴ and human monocytes.⁵ However, the mechanisms of their synergistic interaction are not known. It has been also demonstrated that binding of LPS to the β-chains of Hb was particularly prominent and that a portion of LPS in the presence of Hb had increased electrophoretic mobility, and co-electrophoresed with

Received 21 June 1996

Revised 16 December 1996

Accepted 3 January 1997

Correspondence to: Mario Jacques PhD, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3 200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6
Tel. +1 514 773 8521 ext. 8348; Fax. +1 514 778 8108
E-mail jacqum@ere.umontreal.ca

Hb.² A reduction in LPS sedimentation velocity was observed when LPS was incubated with Hb and then subjected to a sucrose gradient centrifugation.² In addition, synergistic *in vivo* toxicities of endotoxin and Hb have been reported.^{6,7}

Actinobacillus pleuropneumoniae, a member of the *Pasteurellaceae*, is the etiological agent of porcine pleuropneumonia, a severe disease that causes economic loss to the swine industry. Several bacterial components, including hemolysins and/or cytolytins, LPS, and capsular polysaccharides, appear to contribute to the disease process.⁸ We previously demonstrated that LPS was the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to porcine respiratory tract cells.⁹⁻¹¹ More recently, we observed the binding of pig Hb to *A. pleuropneumoniae* LPS.¹² We demonstrated that lipid A was involved and that polymyxin B completely inhibited binding of Hb to *A. pleuropneumoniae* lipid A. Interestingly, this hemolytic microorganism is also able to use pig Hb as a sole source of iron for growth.^{12,13}

The current study was undertaken to further investigate the binding of pig Hb to *A. pleuropneumoniae* LPS, either extracted or present at the surface of whole cells, in order to determine whether such interactions might affect some physical and biological properties of *A. pleuropneumoniae* LPS.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates and growth conditions

A. pleuropneumoniae reference strains of serotype 1 (strain 4074; semi-rough LPS profile) and serotype 2 (strain 4226; smooth LPS profile) were provided by A. Gunnarson, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden. Bacteria were grown on brain heart infusion agar plates (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 15 µg of NAD/ml. Plates were incubated at 37°C for 18 h.

Reagents

Pig and human Hb, and polymyxin B sulfate were obtained from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. Dansylcadaverine was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). LPS from *Salmonella minnesota* (smooth and Re 595) and *Escherichia coli* (O111:B4 and Rd F583) were obtained from Sigma. Pig and human Hb stock solutions (1 mg/ml) were prepared in endotoxin free water (Associates of Cape Cod, Woods Hole, MA, USA) and contained less than 0.6 EU/ml of endotoxin as determined by cLAL.

Extraction of LPS

LPS from *A. pleuropneumoniae* was extracted and isolated by the method of Darveau and Hancock¹⁴ with some modifications.¹⁵ Briefly, disrupted cells were treated with DNase, RNase, pronase and sodium dodecyl sulfate (SDS), and then subjected to MgCl₂ precipitation and high-speed centrifugation.

Electron microscopy

Negative staining of LPS aggregates

Extracted LPS from *A. pleuropneumoniae* (1 mg/ml) was incubated for 1 h or 18 h at 37°C with either pig Hb (1 mg/ml) or polymyxin B sulfate (0.1 or 1 mg/ml). Samples were recovered after ultracentrifugation at 80 000 *g* for 6 h. A drop of each LPS preparation was placed on 200-mesh Formvar-coated grids that were then stained with 1 % (w/v) phosphotungstate. The grids were examined with a Phillips 201 electron microscope at an accelerating voltage of 60 kV. LPS of *A. pleuropneumoniae* that had not been incubated with Hb or polymyxin B served as control.

Whole cells

Whole cells of *A. pleuropneumoniae* were incubated for 30 min at 37°C with pig Hb (1 mg/ml of PBS, 0.01 M, pH 7.4). A single drop of the sample was placed on Formvar-coated grids and was allowed to partially air dry. The grids were washed in distilled water and examined without any additional staining by transmission electron microscopy as described above. Cells of *A. pleuropneumoniae* that have not been incubated with pig Hb served as controls.

Energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis

Grids with whole cells of *A. pleuropneumoniae* prepared as described above were also viewed with a Phillips EM400T transmission electron microscope equipped with a model LZ-5 light element detector and an eXL multichannel analyzer (both from LINK Analytical) operating at 100 kV, with a cold trap in place, to obtain elemental analysis. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) spectra were taken by using a beam current of 0.1 µA and a spot size of 200 nm. The counting time was 100 s (live time).¹⁶

Flow cytometry

Overnight cultures of *A. pleuropneumoniae* were washed and resuspended in PBS to an A₅₄₀ of 0.2, equivalent to approximately 10⁸ CFU/ml. Bacterial suspensions (1 ml) were incubated with pig Hb (1 mg/ml) for 60 min at 37°C. Cells were washed twice in PBS and centrifuged at

10 000 *g* for 2 min, then the pellets were resuspended in 1 ml of a dilution of a monoclonal antibody against serotype 1 O-antigen (5.1G8F10) or serotype 1 capsular-antigen (1.5C5F4), or serotype 2 O-antigen (102-G02) (all kindly supplied by M. Gottschalk, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Montréal, Canada) and incubated for 60 min at room temperature. Samples were washed twice in PBS, and then 0.5 ml of sheep fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada) diluted 1:50 in PBS was added. After a further incubation of 60 min at room temperature, samples were washed twice in PBS and fixed with 2% paraformaldehyde. Cells were kept in the dark at 4°C until analyzed by flow cytometry as previously described.¹⁰ Suspensions of cells of *A. pleuropneumoniae* that have not been incubated with pig Hb served as controls.

Sucrose centrifugation

Continuous sucrose density gradients (12 ml; 5–20%) were prepared in 0.05 M Tris and 0.25% deoxycholic acid in pyrogen-free water. LPS from *A. pleuropneumoniae*, final concentration of 1 mg/ml, was added to a pig Hb solution of 10 mg/ml and the mixture was incubated for 1 h at 37°C. Aliquots (100 µl) of LPS-Hb mixtures, LPS alone, or Hb alone were then layered over a sucrose gradient and centrifuged at 52 000 *g* for 4 h in a Beckman L7-65 ultracentrifuge using a SW28 rotor. Following centrifugation, the tubes were punctured and 1.5 ml fractions were collected and analyzed by gel electrophoresis.

Electrophoresis

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was conducted by the discontinuous buffer system of Laemmli,¹⁷ with a 4.5% polyacrylamide stacking gel and a 15% polyacrylamide running gel. Samples were boiled for 15 min in solubilization buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol and 0.025% bromophenol blue). Prestained and low-molecular mass markers were obtained from Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). Gels were run in a Mini-PROTEAN II vertical slab electrophoresis cell (Bio-Rad) and were either stained with silver nitrate as described by Tsai and Frasch¹⁸ or stained with Coomassie brilliant blue R-250 or transferred to nitocellulose for Western blotting.

Western Blot

Western blots were carried out as described by Towbin et al.¹⁹ All incubations were followed by four 3 min washes with a Tris-saline buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4). The membrane were first incubated at room tempera-

ture for 1 h with 2% casein (a blocking solution) and then incubated overnight at 4°C with serum from a pig experimentally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 or a rabbit antiserum against pig Hb. The membranes were then incubated at room temperature for 1 h with a goat anti-pig IgG (heavy plus light chains) horseradish peroxidase conjugate (Jackson Immunoresearch Lab) or a goat anti-rabbit IgG (heavy plus light chains) horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad). Reactions were revealed by addition of 4-chloro-1-naphthol and hydrogen peroxide (Sigma) as chromogenic substrate.

Dansylcadaverine displacement assay

The use of dansylcadaverine (DC) as a fluorescent displacement probe to characterize the interaction of lipid A-binding molecules has been described by David et al.^{20,21} The binding of the probe to lipid A results in an intensity enhancement in the emission spectrum of DC. Compounds which bind lipid A displace the probe, resulting in quenching of fluorescence. Probe displacement is analyzed as a function of displacer (e.g. polymyxin B or pig Hb) concentration. In this study, we compared the relative binding affinities of polymyxin B and pig Hb to lipid A of *A. pleuropneumoniae* strain 4074. *A. pleuropneumoniae* lipid A was obtained after acid hydrolysis of extracted LPS.¹² The relative binding affinities were measured by DC displacement assays as described by David et al.^{20,21} using a spectrofluorometer Fluorolog CM-III (Spex industries, Edison, NJ, USA). The excitation wavelength was 340 nm. Emission wavelength is an interval between two wavelengths (450 and 660 nm) where bandpasses for excitation and emission were 5 nm for both monochromators. Briefly, 50 µM of DC and 20 µg of *A. pleuropneumoniae* lipid A were mixed together in 1 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) which resulted in maximum fluorescence. Different concentrations of polymyxin B or pig Hb were added to the solution and the subsequent decrease in fluorescence owing to the displacement of the DC from lipid A was recorded after each addition.

Chromogenic *Limulus* amoebocyte lysate (cLAL) test

Activation of cLAL by endotoxin was used to compare the biological activity of extracted LPS or LPS of whole cells in the presence or absence of pig Hb. Sterile, endotoxin-free water and microplates (Pyroplates) were purchased from Associates of Cape Cod. Glassware was heated at 190°C in a dry oven for 5 h. Some experiments were conducted with two-fold dilutions of extracted LPS (starting concentration 1 µg/ml) or two-fold dilutions of bacterial cells (starting concentration 1 mg/ml), and 50 µl of Hb (1 mg/ml) was added to diluted LPS or diluted bac-

terial cells. Other experiments were conducted with 10-fold dilutions of Hb (starting concentration 1 mg/ml) or polymyxin B sulfate (starting concentration 1 mg/ml), and 50 μ l of LPS (1 μ g/ml) was added to diluted Hb or diluted polymyxin B. Dilutions were prepared using pyrogen-free water, in nontreated polystyrene microplates. 50 μ l of cLAL (Pyrochrome, Associates of Cape Cod) was then added to each well and the plates were incubated at 37°C for 30 min. Absorbance was determined with an automated plate reader (Dynatech Laboratories Inc, Virginia, USA) at 410 nm. Background absorbance at 410 nm, which included a component of absorbance due to Hb, was subtracted from each reading. Polymyxin B sulfate, a well known inhibitor of LPS biological activity, was used as control. Activation of cLAL by LPS from *S. minnesota* or *E. coli* with or without human Hb was also evaluated. In some experiments, gelation LAL test (gLAL, Associates of Cape Cod) was done following the same protocol as for cLAL but instead of chromogen quantification, spectrophotometric measurement of turbidity was determined with the automated plate reader at 410 nm.

Nitric oxide production

Murine macrophages, cell line J774, were cultured in RPMI-1640 (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) without phenol containing 10% heat-inactivated FBS (HyClone Laboratories Inc., Logan, UT, USA), 5% L-glutamine (Gibco BRL) and 5% penicillin-streptomycin (Gibco BRL), stimulated with *A. pleuropneumoniae* serotype 2 LPS preincubated or not with pig Hb, and assayed for production of nitric oxide (NO_2^-) as described.²² Adherent macrophage monolayers were obtained by plating the cells in 24-well microtiter plates (Falcon 3047, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA) at 5×10^5 cells/well for 4 h at 37°C in 5% CO_2 and monolayers were then washed with warm culture medium. Cells were then exposed to dilutions of LPS (1 μ g/ml to 0.001 μ g/ml) preincubated (30 min) or not with pig Hb (1 mg/ml or 10 mg/ml) for 24 h at 37°C in 5% CO_2 . Following incubation, cell culture supernatants were collected and NO_2^- production determined by the Greiss' reaction. Briefly, aliquots of 300 μ l were removed from conditioned medium and incubated with an equal volume of Greiss' reagent (1% (w/v) sulfanilamide and 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid) at room temperature for 15 min. Absorbance was determined with an automated plate reader at 540 nm. Cell medium background absorbance at 540 nm, which included a component of absorbance due to Hb, was subtracted from each reading. NO_2^- concentration was determined by using sodium nitrite as a standard. The production was expressed as a $\mu\text{M}/5 \times 10^5$ cells.

Data analysis

All experiments were performed at least twice. The significance was evaluated by the one-tailed paired two group Student's *t*-test.

RESULTS

Electron microscopy and EDS of whole cells

Unstained preparations of *A. pleuropneumoniae* cells were examined by transmission electron microscopy. As expected, untreated cells (not stained and not incubated with pig Hb) offered a very poor contrast (Fig. 1A). However, cells of *A. pleuropneumoniae* incubated with pig Hb were more contrasted (Fig. 1B) which suggests that pig Hb, a relatively large molecule, was binding to

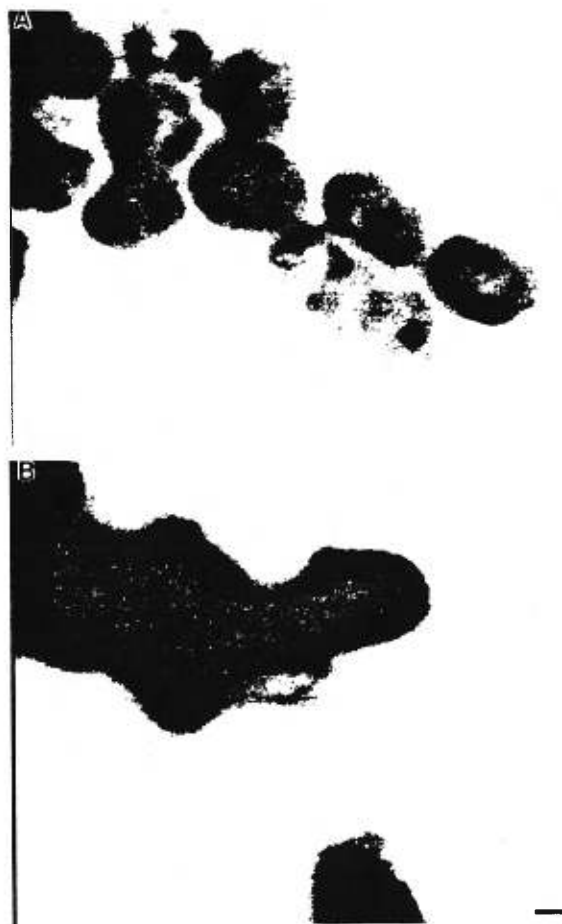


Fig. 1 Electron transmission micrographs of whole cells of *A. pleuropneumoniae* serotype 1. (A) Control cells that were not stained, nor incubated with pig Hb. (B) Unstained cells that were incubated during 30 min with pig Hb (1 mg/ml). Bar, 200 nm.

the cell surface and coating the cells. The same preparations were also analyzed by EDS (Fig. 2). The amount of elemental iron detected was increased 4–8-fold when cells of *A. pleuropneumoniae* were incubated with pig Hb as compared to control cells not incubated with pig Hb. The amount of Fe, expressed as atom %, increased from 4.47 to 18.64, and from 0.93 to 7.77, when cells of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 and serotype 2, respectively, were incubated with pig Hb. EDS does not differentiate, however, the iron present at the cell surface from the intracellular iron.

Flow cytometry

Since cells of *A. pleuropneumoniae* appeared to be coated with pig Hb after a short incubation period, we then determined whether binding of pig Hb to whole cells interfere with the accessibility of antibodies to surface antigens. Cells, incubated with or without pig Hb, were incubated with monoclonal antibodies against O- or capsular-antigens and analyzed by flow cytometry. Figure 3 shows representative flow cytometry profiles of whole cells of *A. pleuropneumoniae* incubated or not with pig Hb. The accessibility of LPS O-antigen (Fig. 3A,B) or capsular antigens (Fig. 3 C, D) to antibodies did not seem to be affected by a pre-incubation with pig Hb, since the fluorescence patterns (Fig. 3B,D) obtained were similar to the fluorescence patterns of control cells not pre-incubated with pig Hb (Fig. 3A,C).

Electron microscopy examination of extracted LPS

This experiment was conducted to evaluate the effect of pig Hb binding on the morphology of LPS aggregates. Molecular aggregates of *A. pleuropneumoniae* extracted LPS appeared as ribbons of approximately 12 nm wide in the absence of pig Hb (Fig. 4A) as previously described.¹⁰ Incubation of pig Hb with extracted LPS for 1 h resulted in the disaggregation of LPS into smaller aggregates (Fig. 4B). After a longer incubation period (18 h) with pig Hb, small spherical particles which seem to be micelles were observed (Fig. 4C). The effect of pig Hb on LPS was different from the hexagonal lattice observed when *A. pleuropneumoniae* LPS was incubated with polymyxin B (Fig. 4D).

Sucrose density centrifugation

Mixtures of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 LPS and pig Hb were layered over a sucrose gradient. After ultracentrifugation and SDS-PAGE, Western blot was performed to demonstrate the distribution of LPS in the different fractions. LPS alone sedimented into all fractions (Fig. 5A, lanes 1–8) of the sucrose gradient, whereas most of the

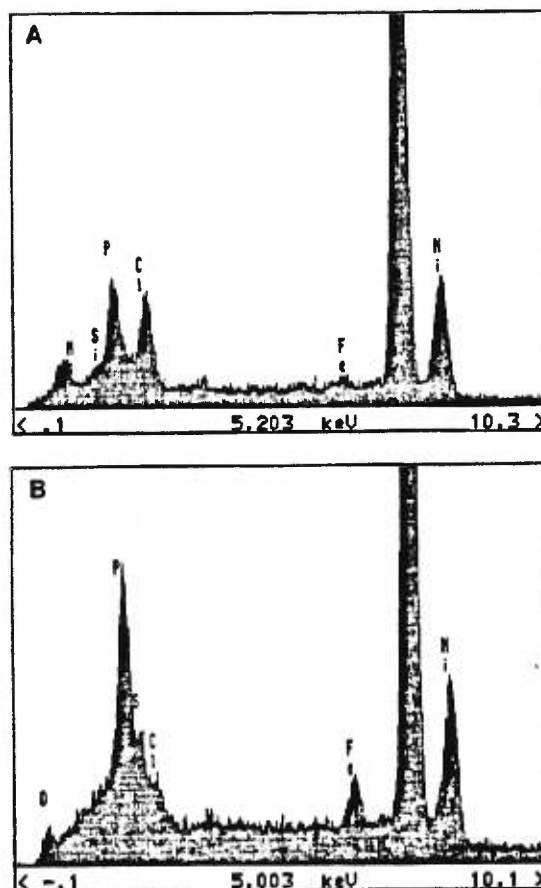


Fig. 2 EDS spectrum of whole cells of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 shown in Figure 1. Elemental analysis of control cells (A) or cells incubated with pig Hb (B). An 8-fold increase in iron (Fe) was observed in cells previously incubated with pig Hb.

LPS in Hb/LPS mixtures (Fig. 5B, lanes 7,8) had a sedimentation rate similar to that of Hb alone (Fig. 5C, lanes 7,8). Most of the Hb from Hb/LPS mixtures (Fig. 5D, lanes 7,8) and Hb alone remained in the top layer of the sucrose gradient. Similar results were obtained with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS. Therefore, incubation with pig Hb decreased the density of LPS, resulting in a different migration of LPS in a sucrose gradient.

Dansylcadaverine displacement assay

We tested the ability of polymyxin B or pig Hb to displace DC from *A. pleuropneumoniae* lipid A. The addition of *A. pleuropneumoniae* lipid A to DC resulted in a marked

enhancement of fluorescence intensity which is indicative of interaction of DC with lipid A. The maximal fluorescence of DC was achieved with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *A. pleuropneumoniae* lipid A. The addition of polymyxin B or pig Hb to the mixture of lipid A and DC resulted in an attenuation of fluorescence intensity (Fig. 6) which is indicative of the displacement of bound DC to lipid A by these compounds.

cLAL assay with extracted LPS and whole cells

We used a chromogenic LAL test to study the influence of pig Hb on LPS biological activity. A decrease in cLAL

activity was obtained after addition of different dilutions of pig Hb to a constant concentration of extracted LPS or bacterial cells (Fig. 7A). As expected, we observed a reduction of cLAL activation when LPS were incubated with polymyxin B (Fig. 7B). Used at the same concentration (e.g. 0.01 mg/ml), pig Hb (0.15 nM) was a better inhibitor of cLAL activation (1.5–2-fold) than polymyxin B (6.89 nM). LAL gelation tests were used to confirm the results obtained with cLAL. As shown in Figure 8, addition of human Hb to *Enterobacteriaceae* LPS from *S. minnesota* (smooth and rough Re 595) or *E. coli* (O111:B4 and Rd F583) (data not shown) also significantly decreased LAL activation.

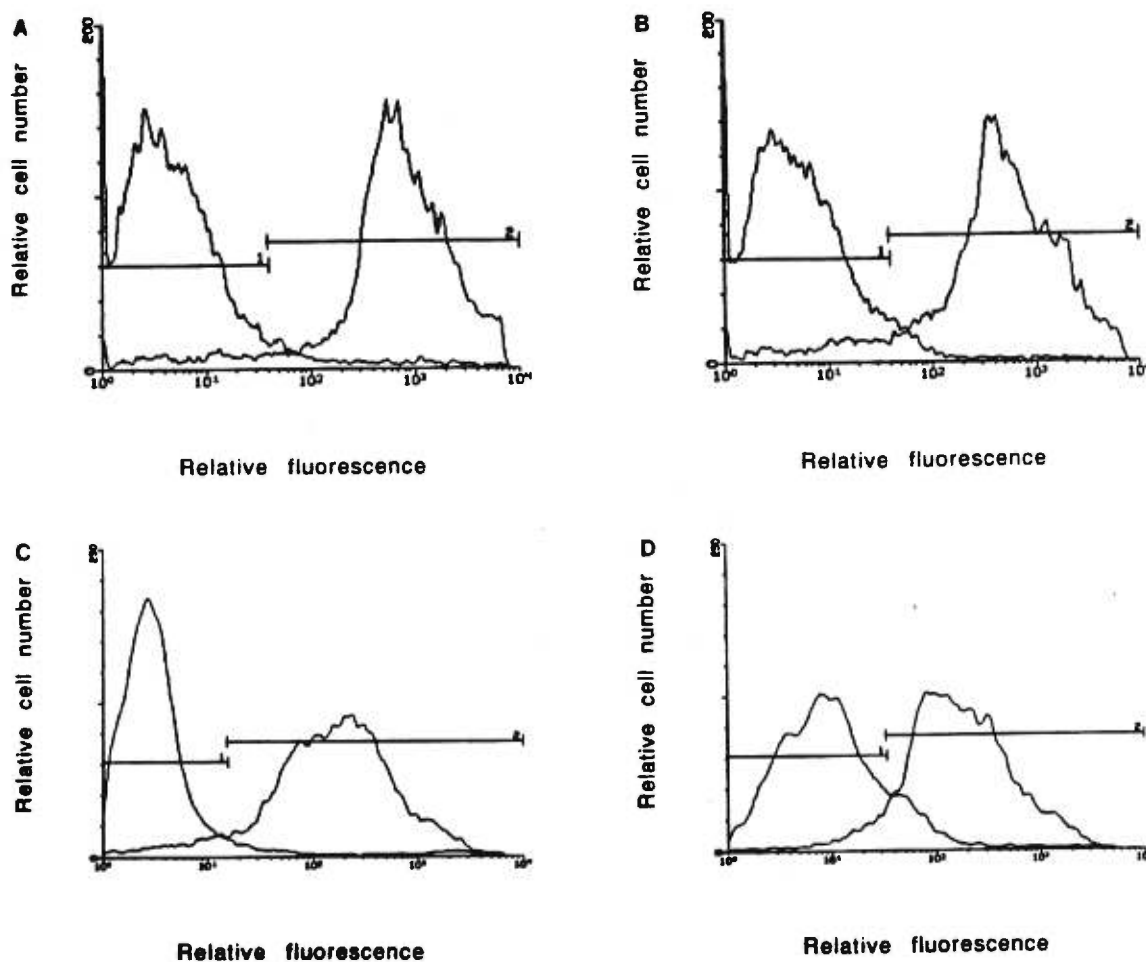


Fig. 3 Flow cytometry analysis of whole cells of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 not incubated with pig Hb (A) or incubated with pig Hb (B) were labeled with the anti-mouse IgG fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibody (left peak, control) or with monoclonal antibodies against serotype 2 O-antigen plus the anti-mouse IgG FITC-conjugated antibody (right peak). Whole cells of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 not incubated with pig Hb (C) or incubated with pig Hb (D) were labeled with the anti-mouse IgG FITC-conjugated antibody (left peak, control) or with monoclonal antibodies against serotype 1 capsular-antigen plus the anti-mouse IgG FITC-conjugated antibody (right peak). The horizontal bars labelled '1' indicate non-specific fluorescence while bars labelled '2' indicate specific fluorescence.

Nitric oxide production

We compared LPS alone and LPS-Hb complexes for their ability to decrease murine macrophages NO_2^- releasing capacity. LPS alone (0.1–1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) induced substantial NO_2^- release (Fig. 9), whereas incubation of LPS (0.1–1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) with pig Hb (1 mg/ml) significantly decreased release of NO_2^- . Incubation of LPS with pig Hb (10 mg/ml) resulted in NO_2^- production similar to the background level (macrophages alone in RPMI-1640) (data not shown).

DISCUSSION

We previously demonstrated that LPS was the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to

porcine respiratory tract cells.^{9,10} More recently, we observed the binding of pig Hb to the lipid A portion of *A. pleuropneumoniae* LPS.¹² The current study was undertaken to further examine the binding of pig Hb to *A. pleuropneumoniae* LPS from serotypes 1 and 2, either extracted or present at the surface of whole cells. These 2 serotypes were selected because they represent the two LPS profiles found in *A. pleuropneumoniae*, semi-rough (serotype 1) or smooth (serotype 2).

We first used electron microscopy which allowed the visualization of pig Hb at the surface of *A. pleuropneumoniae* whole cells. Pig Hb covered the bacterial cell surface and enhanced the cells' contrast. The same preparations were also analyzed by EDS and the amount of elemental iron detected at the surface or inside the cell was increased when *A. pleuropneumoniae* were incubated

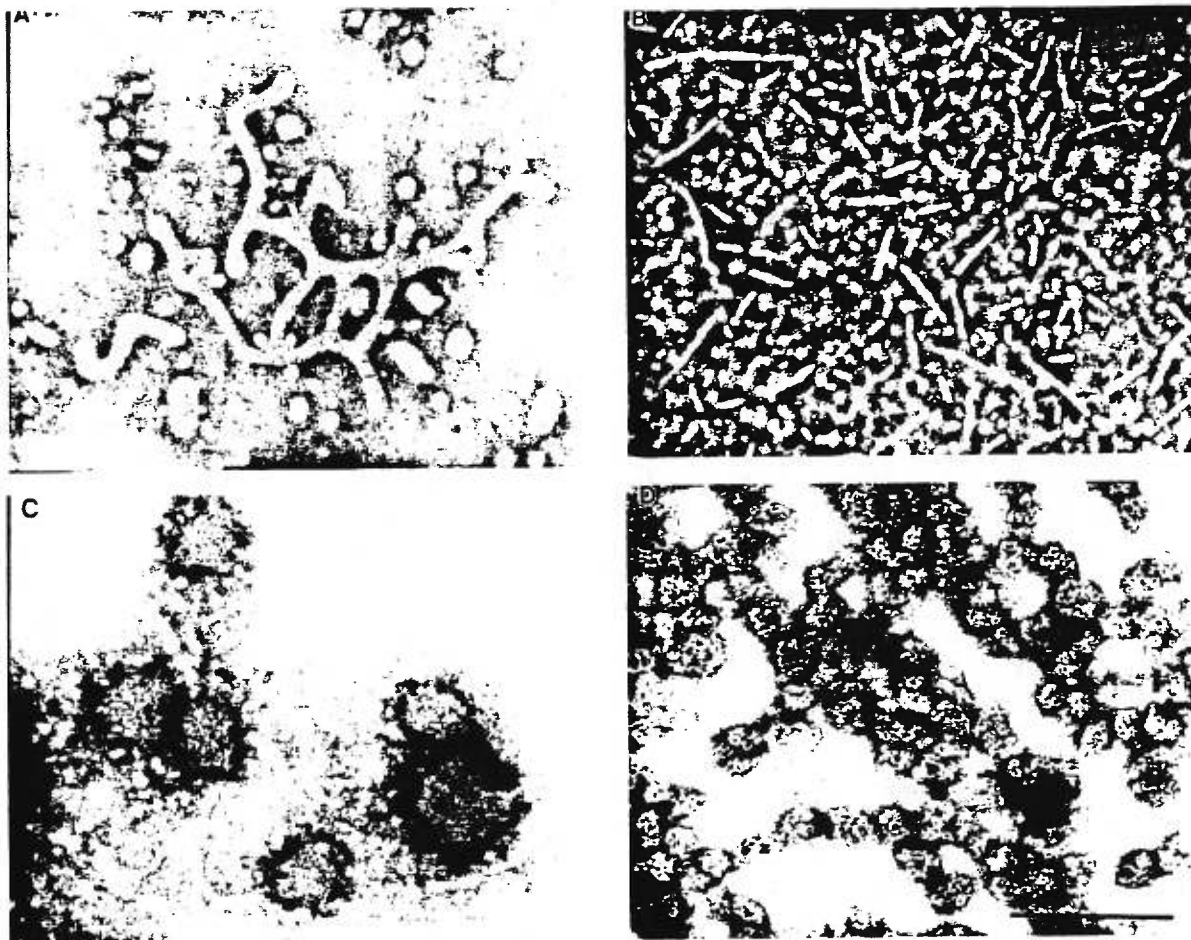


Fig. 4 Transmission electron micrographs of negatively stained *A. pleuropneumoniae* serotype 2 extracted LPS. In the absence of Hb, the LPS appeared as ribbon-like structures with frequent branching (A). When LPS was incubated with Hb (1 mg/ml) for 1 h, the typical structure was broken down into shorter molecular aggregates or completely disaggregated in small particles (B). After 18 h of incubation with pig Hb, micelles were observed (C). A hexagonal lattice was observed when LPS from *A. pleuropneumoniae* was incubated with polymyxin B (1 mg/ml) (D). Bar, 200 nm.

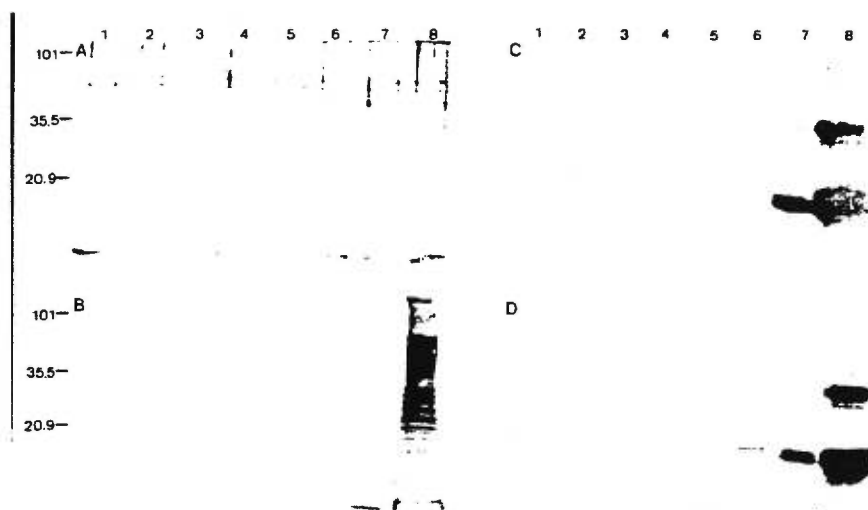


Fig. 5 Western Blot analysis of fractions obtained following sucrose density centrifugation. *A. pleuropneumoniae* serotype 2 extracted LPS (A), pig Hb (C), or *A. pleuropneumoniae* serotype 2 extracted LPS incubated with pig Hb (B,D) were layered over a 5–20% continuous sucrose gradient. After centrifugation, 8 fractions (of 1.5 ml) were recovered and analyzed by SDS-PAGE and Western blot; fractions 1 and 8 correspond to the bottom and the top of the tubes, respectively. Nitrocellulose membranes were either incubated with a serum from a pig experimentally infected with *A. pleuropneumoniae* (A,B) or with a rabbit antiserum against pig Hb (C,D).

with pig Hb. The ability of *A. pleuropneumoniae* to bind Hb to its surface might be quite advantageous for this microorganism knowing that it can express two hemolysins²³ and can use Hb as a source of iron for growth.^{12,23} Our observations suggest that *A. pleuropneumoniae* LPS might represent a non-specific 'receptor' for pig hemoglobin or that it might perform a 'docking' function. It is possible that pig Hb would then be transferred to a specific receptor, such as the hemoglobin-binding proteins that have been reported in *Haemophilus ducreyi*,²⁴ *Haemophilus influenzae*,^{24,25} and *Neisseria meningitidis*.²⁶ Additional work is needed to identify the proteins that are involved in the subsequent uptake of iron from pig Hb.

It is conceivable that binding of a host iron-containing protein such as Hb by *A. pleuropneumoniae* serves a dual function as a source of iron and as a protective coat. Hb binding to the bacterial cell surface may be operational in the ability of pathogens in evading host responses, in particular, activation of complement. However, addition of Hb had little or no effect on the intrinsic complement fixing abilities of endotoxin or endotoxin partial structures.²⁷

Binding of host proteins by bacteria has been shown to change their physicochemical surface properties.^{28,29} Flow cytometry experiments were conducted to determine whether Hb binding would also modify the cell surface characteristics of *A. pleuropneumoniae* and by this means interfere with the antibodies accessibility to surface antigens. Our results indicated that binding of pig

Hb to the cell surface did not interfere with the accessibility of antibodies to O- and capsular antigens. We and others have shown that Hb was binding to the lipidic region of LPS.^{2,12} We previously obtained evidence, using a monoclonal antibody (E5), directed against bacterial lipid A, that some lipid A residues are accessible at the surface of *A. pleuropneumoniae* cells, especially around outer membrane blebs.¹² Preferential binding of pig Hb to outer membrane blebs might explain why the binding of pig Hb to the cell surface did not interfere with the accessibility of antibodies to O- and capsular antigens. We have shown that LPS was the adhesin of *A. pleuropneumoniae* and that the active component of LPS involved in adherence was not the lipid A but the polysaccharides.¹⁰ Further studies will be needed to verify that Hb binding to lipid A residues does not affect *A. pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. It would also be quite interesting to determine whether Hb binding to LPS could affect *A. pleuropneumoniae* interaction with host alveolar macrophages where lipid A certainly plays a major role.

To determine whether Hb binding altered some physical properties of *A. pleuropneumoniae* LPS, we visualized the binding of pig Hb to *A. pleuropneumoniae* extracted LPS by electron microscopy after negative staining. In the absence of Hb, the LPS isolated from *A. pleuropneumoniae* appeared as ribbon-like structures with frequent branching. When the LPS was incubated with Hb, the typical structure was broken down in shorter molecular

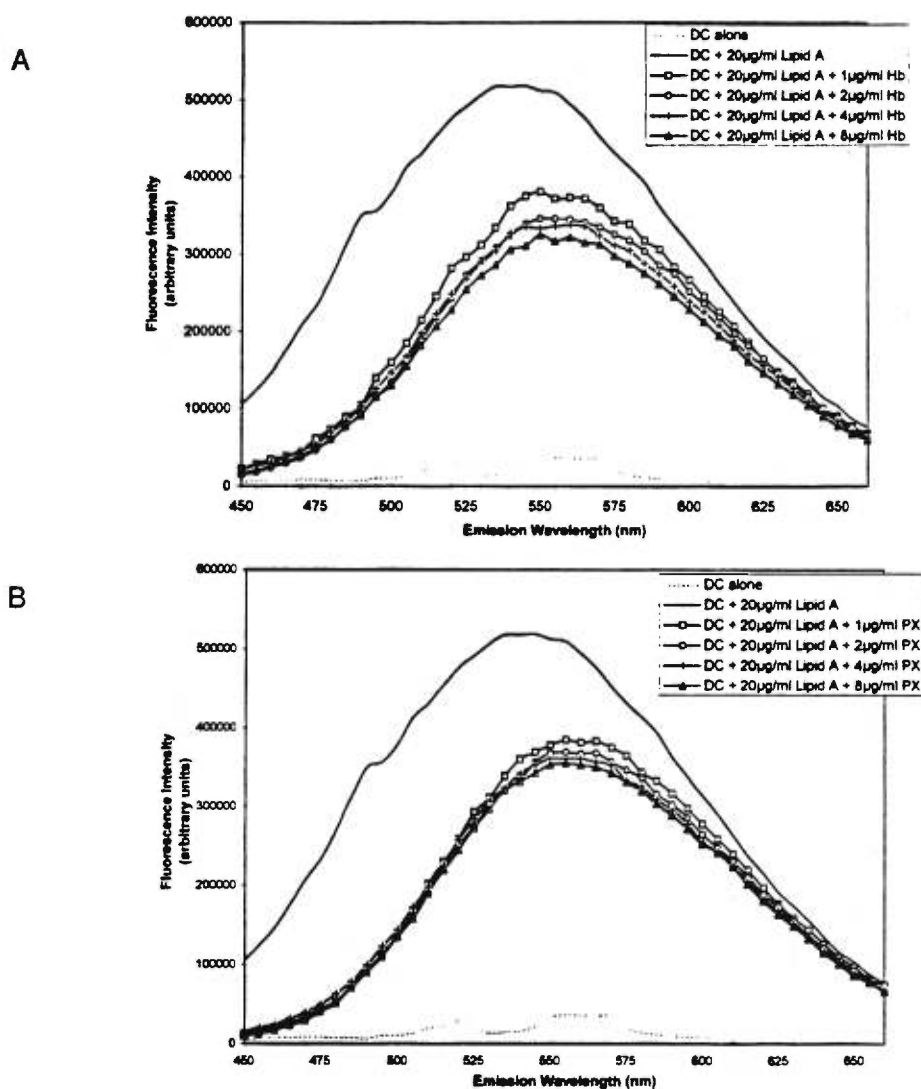


Fig. 6 Dansylcadaverine displacement assay: representative emission spectra. The maximum fluorescence of DC was achieved by using 20 µg/ml of *A. pleuropneumoniae* lipid A. The addition of different concentration of pig Hb (A) or polymyxin B (B) to the mixture of lipid A and DC resulted in an attenuation of fluorescence intensity which is indicative of the displacement of bound DC to lipid A by these compounds. DC alone (50 µM) was used as control.

aggregates or completely disaggregated into small particles. Similarly, disaggregation of enterobacterial LPS by human Hb visualized by electron microscopy has recently been reported by Roth.³⁰ We also observed disaggregation of *A. pleuropneumoniae* LPS with polymyxin B which confirmed previous results by Lopes et al.,³¹ who demonstrated that incubation of *E. coli* LPS with polymyxin resulted in LPS fragmentation. Additional evidence for a direct physical interaction between pig Hb and *A. pleuropneumoniae* LPS was demonstrated by a

shift in the sedimentation velocity of LPS-Hb complexes determined by sucrose density centrifugation. Whereas LPS alone sedimented in all fractions of the sucrose gradient, most of the LPS in Hb-LPS complexes had a sedimentation rate similar to that of Hb. These results are consistent with a process of LPS disaggregation and Hb-LPS complex formation demonstrated by Kaca et al.¹ for enterobacterial endotoxin and human Hb.

We previously observed that polymyxin B completely inhibited binding of pig Hb to *A. pleuropneumoniae* lipid A

and were possibly competing for binding sites.¹² In the present study polymyxin B and pig Hb were both able to displace dansylcadaverine, a fluorescent probe used for quantitating the interactions of various compounds with endotoxin lipid A.^{20,21}

Several studies have demonstrated that proteins such as melitin,³² lysozyme,^{33,34} synthetic peptides,³⁵ bactericidal/permeability-increasing protein,³⁶⁻³⁸ LPS-binding protein,^{39,40} glycopeptide antibiotics (mideplanin),⁴¹ granulocyte-derived peptide (rabbit cationic antimicrobial

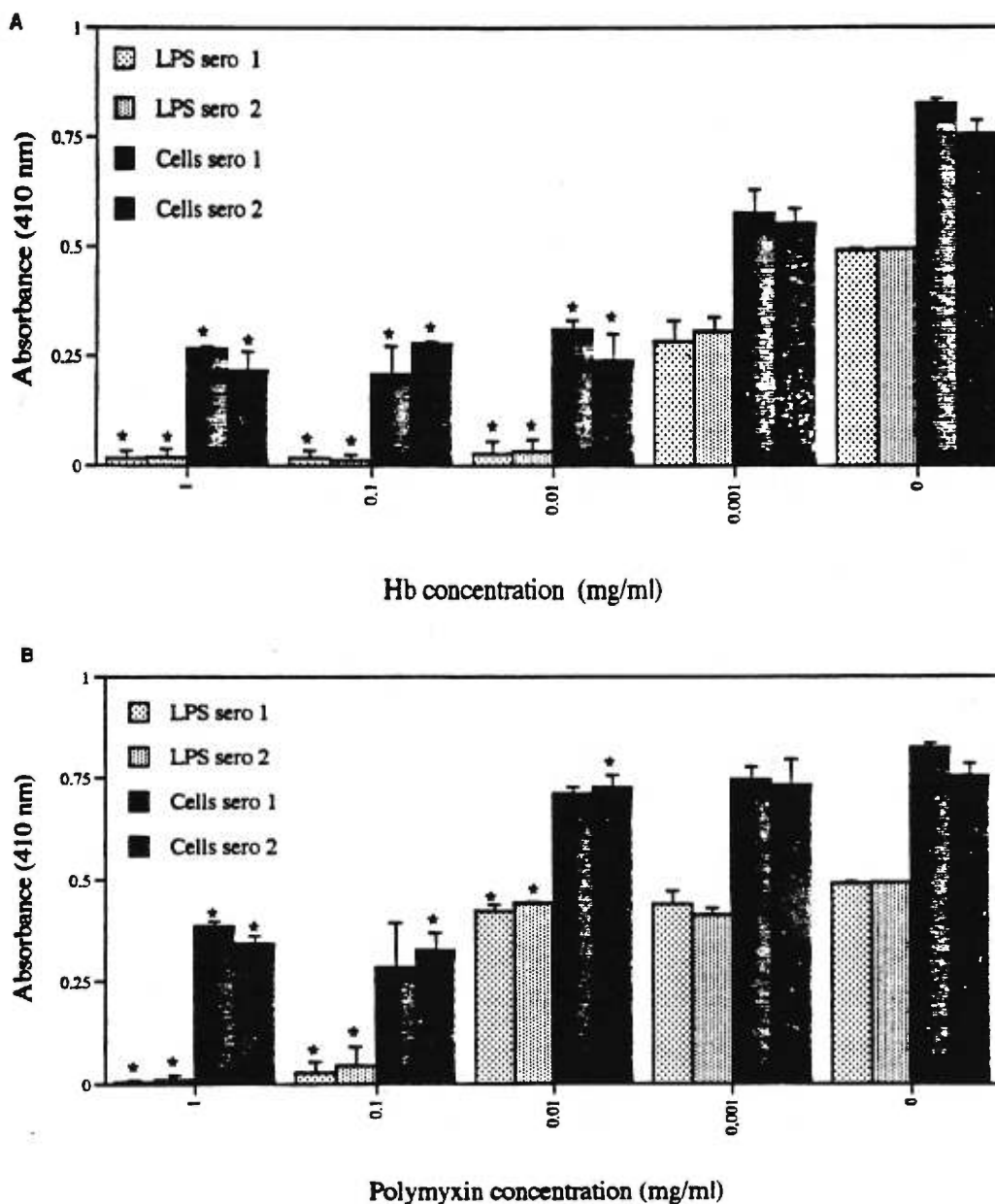


Fig. 7 Inhibition of extracted LPS or bacterial cells activation of cLAL by pig Hb or polymyxin B. A decrease was obtained in cLAL activation from the addition of 10-fold diluted pig Hb (starting concentration 1 mg/ml) (A) or polymyxin B (starting concentration 1 mg/ml) (B) to a constant concentration of extracted LPS from serotype 1 or serotype 2 (1 µg/ml) or bacterial cells of serotype 1 or serotype 2 (1 mg/ml). Two independent experiments were performed, * $P < 0.05$.

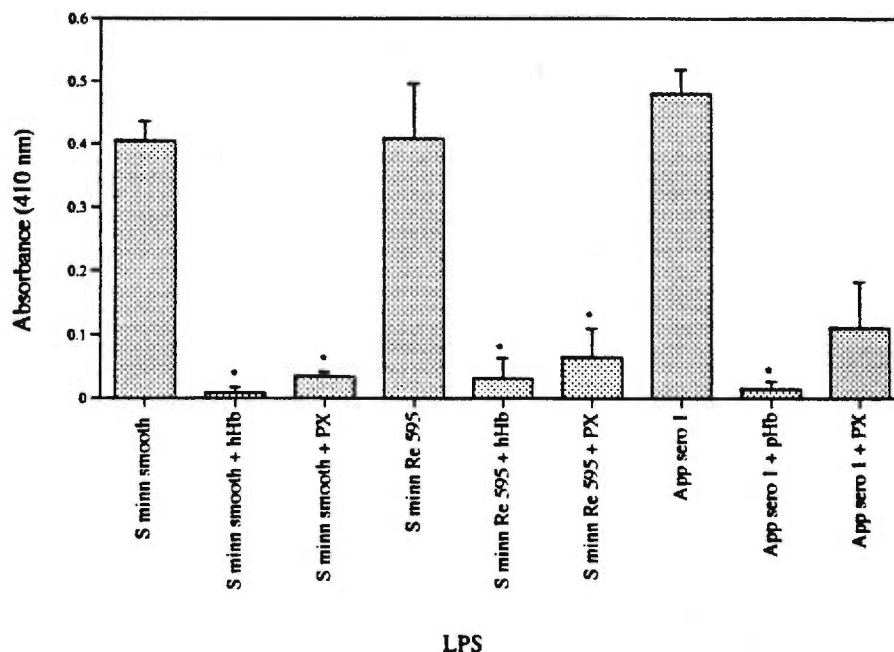


Fig. 8 Effect of pig Hb (pHb), human Hb (hHb), or polymyxin B (PX) on LPS biological activity of *S. minnesota* smooth or Re 595 or *A. pleuropneumoniae* serotype 1 in the cLAL test. The addition of pHb (1 mg/ml) or hHb (1 mg/ml) or PX (1 mg/ml) to extracted LPS (1 µg/ml) resulted in a significant decrease of cLAL activation, * $P < 0.05$.

protein)⁴² and the polypeptide polymyxin B,⁴³ bind LPS and decrease its biological activity. To determine whether pig Hb binding could alter some biological properties of *A. pleuropneumoniae* LPS, we used cLAL and gLAL tests.

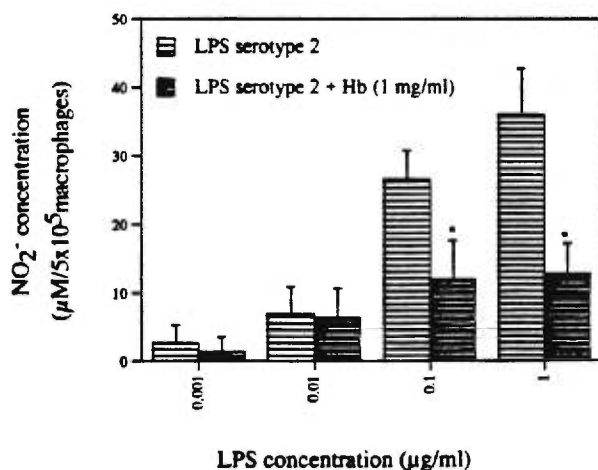


Fig. 9 Effect of pig Hb on LPS biological activity of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 in inducing NO₂⁻ production in J774 cells. The addition of a constant concentration of pig Hb (1 mg/ml) to 10-fold diluted extracted LPS (starting concentration 1 µg/ml) resulted in a significant decrease of NO₂⁻ production, * $P < 0.05$.

Interaction of LPS with pig Hb or with polymyxin B was associated with decreased biological activity of LPS in these tests. Considering that both, pig Hb and polymyxin B, bind to lipid A, as confirmed with the fluorescent probe displacement assay, and cause disaggregation of extracted LPS, it is not surprising that both substances have a similar effect on LAL activation. It is known that the spatial conformation of lipid A is an important determinant for its endotoxic activity.⁴⁴ A study by Shnyra et al.⁴⁵ has shown that the biological and endotoxic properties of LPS are significantly influenced by the physical state of its aggregates in aqueous solutions. These authors suggest that LPS must be in a highly aggregate state to be endotoxic.

Our data contrast however with the observation of Kaca et al.^{1,3} who showed that addition of human Hb to *Enterobacteriaceae* LPS enhanced LAL activation, and of Takayama et al.⁴⁶ who demonstrated that monomeric Re lipopolysaccharide from *E. coli* is more active than the aggregated form in the *Limulus* amoebocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. The reasons for this discrepancy are unclear. One possible explanation might involve the structure of *A. pleuropneumoniae* lipid A. Although lipid A of distinct bacterial origin share certain basic structural elements, they differ in some chemical features.⁴⁷

Variations in structure result from the type of hexosamine present, the degree of phosphorylation, and most notably, the nature, chain length, number, and location of acyl groups.⁴⁸ The composition of lipid A has been shown to be more conserved within a bacterial family.⁴⁹ Kaca et al.¹ used *Enterobacteriaceae* LPS and human Hb whereas we used *Pasteurellaceae* LPS and pig Hb. In addition, LAL test, reagents and the LPS extraction method were different. In view of the fact that some of our findings contrast with information existing in the current literature and in order to understand these potentially conflicting results, we performed cLAL using enterobacterial LPS and human Hb. In our hands, addition of human Hb to *Enterobacteriaceae* LPS decreased LAL activation. We believe that LAL tests and reagents used for the assay might explain, at least in part, the difference observed between results of the two groups.

We then selected another in vitro biological assay for LPS and evaluated whether the reactive nitrogen intermediates (RNI) production as measured by NO₂⁻ is modified by LPS-Hb complexes compared to LPS alone. Among the numerous secretory products of macrophages,⁵⁰ RNI is a group of inorganic compounds with a high degree of chemical reactivity.⁵¹ Macrophage-derived RNI are of interest because they play an important role in antimicrobial actions of activated macrophages. It is tempting to speculate that the inability of the LPS-Hb complexes to increase macrophage NO₂⁻-releasing capacity might be due to the LPS disaggregation by pig Hb or to the fact that Hb is binding to lipid A and is interfering with its recognition by cell receptors.

Our data indicate that binding of pig Hb, as well as polymyxin B, to extracted LPS of *A. pleuropneumoniae* causes fragmentation of LPS molecular aggregates and a marked reduction in their biological activity as determined by LAL activation and NO₂⁻ production by murine macrophages. Further studies are needed to determine whether Hb binding affects other biological properties of LPS and the virulence of *A. pleuropneumoniae*. Nevertheless, binding of pig Hb to the cell surface of *A. pleuropneumoniae* increased the amount of iron associated with the cells, and this might also influence virulence of *A. pleuropneumoniae*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (OGP0003428) to MJ. We are grateful to S. Sénéchal for performing flow cytometry and J.Y. Lapointe (Département de physique, Université de Montréal) for his expertise in spectrofluorometry. We thank R. Harris and T.J. Beveridge (Department of Microbiology, University of Guelph) for performing EDS analysis. We also acknowledge Claudine

Matte and Jean-François Marquis for their excellent technical assistance and stimulating discussion.

REFERENCES

1. Kaca W., Roth R.I., Levin J. Hemoglobin, a newly recognized lipopolysaccharide (LPS)-binding protein that enhances LPS biological activity. *J Biol Chem* 1994; **269**: 25078–25084.
2. Roth R.I., Kaca W., Levin J. Hemoglobin: a newly recognized binding protein for bacterial endotoxins (LPS). *Prog Clin Biol Res* 1994; **388**: 161–172.
3. Kaca W., Roth R.I., Ziolkowski A., Levin J. Human hemoglobin increases the biological activity of bacterial lipopolysaccharides in activation of *Limulus* amoebocyte lysate and stimulation of tissue factor production by endothelial cells in vitro. *J Endotoxin Res* 1994; **1**: 243–252.
4. Roth R.I. Hemoglobin enhances the production of tissue factor by endothelial cells in response to bacterial endotoxin. *Blood* 1994; **83**: 2860–2865.
5. Roth R.I., Levin J., Chapman K.W., Schmeizl M., Rickles F.R. Production of modified crosslinked cell-free hemoglobin for human use: the role of quantitative determination of endotoxin contamination. *Transfusion* 1993; **33**: 919–924.
6. Griffiths E., Cortes A., Gilbert N., Stevenson P., MacDonald S., Pepper D. Haemoglobin-based blood substitutes and sepsis. *Lancet* 1995; **345**: 158–160.
7. White C., Murray A., Smith D., Green J., Bolin R. Synergistic toxicity of endotoxin and hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1986; **108**: 132–137.
8. Inzana T.J. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathogen* 1991; **11**: 305–316.
9. 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**: 3523–3530.
10. Paradis S-E., Dubreuil D., Rioux S., Gortschalk M., Jacques M. High-molecular mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect Immun* 1994; **62**: 3311–3319.
11. Jacques M. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol* 1996; **4**: 408–410.
12. Bélanger M., Bégin C., Jacques M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun* 1995; **63**: 656–662.
13. Deneer H.G., Potter A.A. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 1989; **57**: 798–804.
14. Darveau R.P., Hancock E.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J Bacteriol* 1983; **155**: 831–838.
15. Sprott G.D., Koval S.F., Schnaitman C.A. Cell fractionation. In: Gerhardt P. eds *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1994; 72–103.
16. Schultze-Lam S., Harauz G., Beveridge T.J. Participation of a cyanobacterial S layer in fine-grain mineral formation. *J Bacteriol* 1992; **174**: 7971–7981.
17. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–685.
18. Tsai C.M., Frasch C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1982;

- 119: 115-119.
19. 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**: 4350-4354.
 20. David S.A., Mathan V.I., Balaram P. Interactions of linear dicationic molecules with lipid A: structural requisites for optimal binding affinity. *J Endotoxin Res* 1995; **2**: 325-336.
 21. David S.A., Balasubramanian K.A., Mathan V.I., Balaram P. Analysis of the binding of polymyxin B to endotoxic lipid A and core glycolipid using a fluorescent displacement probe. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1165**: 147-152.
 22. Ding A.H., Nathan C., Stuehr D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1988; **141**: 2407-2412.
 23. Frey J., Bosse J.T., Chang Y.F. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolytins, pleurotoxin and their genes. *J Gen Microbiol* 1993; **139**: 1723-1728.
 24. Elkins C. Identification and purification of a conserved heme-regulated hemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun* 1995; **63**: 1241-1245.
 25. Frangipane M.E., Morton D.J., Wooten J.A., Pozsgay J.M., Stull T.L. Binding of human hemoglobin by *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Lett* 1994; **118**: 243-248.
 26. Lee B.C., Hill P. Identification of an outer-membrane haemoglobin-binding protein in *Neisseria meningitidis*. *J Gen Microbiol* 1992; **138**: 2647-2656.
 27. Kaca W., Roth R. Activation of complement by human hemoglobin and by mixtures of hemoglobin and bacterial endotoxin. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1245**: 49-56.
 28. Miörner H., Myhre E., Björck L., Kronvall G. Effect of specific binding of human albumin, fibrinogen, and immunoglobulin G on surface characteristics of bacterial strains as revealed by partition experiments in polymer phase systems. *Infect Immun* 1980; **29**: 879-885.
 29. Raamsdonk M., Mei H.C., Soet J.J., Busscher H.J., Graaff J. Effect of polyclonal and monoclonal antibodies on surface properties of *Streptococcus sobrinus*. *Infect Immun* 1995; **63**: 1698-1702.
 30. Roth R., Wong J., Hamilton R. Ultrastructural changes in bacterial lipopolysaccharide induced by human hemoglobin. *J Endotoxin Res* 1996; **3**: 361-366.
 31. Lopes J., Inniss W.E. Electron microscopy of effect of polymyxin on *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 1969; **100**: 1128-1130.
 32. David S.A., Mathan V.I., Balaram P. Interaction of melittin with endotoxin lipid A. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1123**: 269-274.
 33. Takada K., Ohno N., Yadomae T. Binding of lysozyme to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor production in vivo. *Infect Immun* 1994; **62**: 1171-1175.
 34. Ohno N., Morrison D.C. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. Binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J Biol Chem* 1989; **264**: 4434-4441.
 35. Rustici A., Velucci M., Faggioni R. et al. Molecular mapping and detoxification of the lipid A binding site by synthetic peptides. *Science* 1993; **259**: 361-365.
 36. Wilde C.G., Seilhamer J.J., McGrogan M., Ashton N., Marra M.N. Bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. *J Biol Chem* 1994; **269**: 17411-17416.
 37. Marra M.N., Wilde C.G., Collins M.S., Snable J.L., Scott R.W. The role of bactericidal/permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. *J Immunol* 1992; **148**: 532-537.
 38. Gray B.H., Haseman J.R. Bactericidal activity of synthetic peptides based on the structure of the 55-kilodalton bactericidal protein from human neutrophils. *Infect Immun* 1994; **62**: 2732-2739.
 39. Theofan G., Horwitz A.H., Williams R.E., Liu P.S., Chan I., Gazzano-Santoro H. An amino-terminal fragment of human lipopolysaccharide-binding protein retains lipid A binding but not CD14-stimulatory activity. *J Immunol* 1994; **152**: 3623-3629.
 40. Taylor A.H., Heavner G., Nedelman M. et al. Lipopolysaccharide (LPS) neutralizing peptides reveal a lipid A binding site of LPS binding protein. *J Biol Chem* 1995; **270**: 17934-17938.
 41. Matera G., Berlinghieri M.C., Barreca G., Foca A. In vitro effects of novel glycopeptide antibiotics on the reactivity of the lipopolysaccharide (LPS) of *S. minnesota* R595. *Microbiologica* 1995; **18**: 325-330.
 42. Larrick J.W., Hirata M., Zheng H. et al. A novel granulocyte-derived peptide with lipopolysaccharide-neutralizing activity. *J Immunol* 1994; **152**: 231-240.
 43. Morrison D.C., Jacobs D.M. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 1976; **13**: 813-818.
 44. Seydel U., Brandenburg K., Rietschel E.T. A case for an endotoxic conformation. In: Levin J., Van Deventer S.J.H., Van der Poll T., Sturk A. (eds) *Progress in Clinical and Biological Research. Bacterial endotoxins: Basic Science to Anti-sepsis Strategies*, vol 388. New York: Wiley-Liss, 1994; 17-30.
 45. Shnyra A., Hultenby K., Lindberg A. Role of the physical state of *Salmonella* lipopolysaccharide in expression of biological and endotoxic properties. *Infect Immun* 1993; **61**: 5351-5360.
 46. Takayama K., Mitchell D.H., Din Z.Z., Mukerjee P., Li C., Coleman D.L. Monomeric Re lipopolysaccharide from *Escherichia coli* is more active than the aggregated form in the *Limulus* amoebocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 1993; **269**: 2241-2244.
 47. Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U. et al. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology* 1993; **187**: 169-190.
 48. Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994; **8**: 217-225.
 49. Karibian D., Deprun C., Szabo L., Le Beyec Y., Caroff M. 252Cf-plasma desorption mass spectrometry applied to the analysis of endotoxin lipid A preparations. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 1991; **111**: 273-286.
 50. Nathan C.F. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; **79**: 319.
 51. Cotton F.A., Wilkinson G. *Advanced Inorganic Chemistry, A Comprehensive Text*. New York: Wiley-Interscience, 1980.

Article 2:

ARCHAMBAULT, Marie, Stéphane Rioux et Mario Jacques.

Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*
using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry.

FEMS Microbiology Letters 173: 17-25, 1999.



Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry

Marie Archambault, Stéphane Rioux, Mario Jacques *

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, and Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Qué. J2S 7C6, Canada

Received 2 November 1998; received in revised form 26 January 1999; accepted 27 January 1999

Abstract

In the present study, the hemoglobin (Hb)-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* was examined using fluorescein-labeled pig Hb and flow cytometry. Comparison of the Hb-binding activity of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 grown under iron-restricted conditions with cells grown under iron-sufficient conditions indicated that iron-restriction in *A. pleuropneumoniae* promotes the expression of Hb receptors, and that Hb-binding activity is, at least in part, iron-repressible. Hb-binding activity was also observed in representative strains of *A. pleuropneumoniae* belonging to serotypes 1 and 2. In addition, *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS or capsule isogenic mutants were tested in flow cytometry in order to understand the influence of surface polysaccharides on Hb-binding activity. Experiments with an acapsulated mutant indicated that surface molecules with Hb-binding activity are more exposed at the cell surface in the absence of capsular polysaccharides. However, the Hb-binding activity of LPS mutants analyzed in this study was unchanged compared to the parent strain. The outer membrane proteins profile of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 grown under iron-restricted or iron-sufficient conditions was also evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis. Iron-regulated outer membrane proteins were observed under iron-restricted growth conditions which suggests that one or more of these outer membrane proteins may play a role in the Hb-binding activity detected by flow cytometry. © 1999 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Flow cytometry; Pig hemoglobin; *Actinobacillus pleuropneumoniae*

1. Introduction

Iron is an essential nutrient for bacterial growth. In the host, extracellular iron is bound to the iron-binding glycoproteins lactoferrin and transferrin in

exocrine secretions and most of the intracellular iron is sequestered as heme-containing proteins, such as hemoglobin (Hb) [1]. This sequestration limits the availability of free iron to levels below that required to support microbial growth [1]. However, to survive in the host, bacterial pathogens have evolved different high-affinity iron-acquisition mechanisms designed to obtain iron. One such system comprises the elaboration of siderophores that chelate external

* Corresponding author. Tel.: +1 (450) 773-8521, ext. 8348; Fax: +1 (450) 778-8108; E-mail: jacqu@medvet.umontreal.ca

iron followed by binding to their cognate receptor and subsequent internalization. Another system utilizes a receptor-mediated mechanism to acquire iron from lactoferrin, transferrin or heme-containing proteins [1,2].

Actinobacillus pleuropneumoniae, a member of the Pasteurellaceae family, is the causative agent of porcine pleuropneumonia. Among the 12 serotypes recognized, serotype 1 is important in North America, while serotype 2 is dominant in many European countries [3]. Several bacterial components, including RTX toxins, lipopolysaccharides (LPS), capsular polysaccharides, outer membrane proteins (OMPs), and proteases appear to contribute to the disease process [4]. We and others demonstrated that *A. pleuropneumoniae* can utilize pig Hb as a sole source of iron for growth in vitro [5,6]. We recently reported the binding of pig Hb to *A. pleuropneumoniae* LPS [5,7] and hypothesized that LPS might perform a 'docking' function. We also suspect that surface proteins are then involved in the iron uptake from pig Hb.

Recent studies have examined different bacterial species for Hb-binding activity using dot blot assays and biotinylated-Hb [8,9] horseradish peroxidase-Hb conjugate [10] or ^{125}I -Hb [11,12]. Western blot assays using radioiodinated-Hb [13] or radioiodinated-heme:hemopectin [14] and spectrophotometrical method [15] were also used to determine the Hb-binding activity. We have previously visualized the binding of pig Hb to a limited number of cells of *A. pleuropneumoniae* using immunogold labeling and electron microscopy [5]. To the best of our knowledge, no study has used flow cytometry to evaluate the expression of Gram-negative bacterial surface molecules with Hb-binding activity. In the present study, fluorescein-labeled pig Hb was generated and used in flow cytometry to quantify the Hb-binding activity of *A. pleuropneumoniae*.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial isolates, isogenic mutants, and growth conditions

A. pleuropneumoniae reference strains of serotype 1 (strain 4074; semi-rough LPS profile) and serotype 2

(strain 4226; smooth LPS profile) were provided by A. Gunnarsson, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden. *A. pleuropneumoniae* field isolates of serotype 1 (FMV 87-682; semi-rough LPS profile) and serotype 2 (Q 87-981; rough LPS profile) were used in previous studies [5]. Bacteria were grown in brain heart infusion liquid medium (BHI; Difco, Detroit, MI) supplemented with 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of NAD. To obtain iron-restricted conditions, the culture medium was supplemented with 36 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of deferrated EDDHA (ethylenediamine di-*o*-hydroxyphenylacetic acid; Sigma, St. Louis, MO) [16]. Cultures were incubated at 37°C for 18–24 h in a 5% CO_2 atmosphere.

In some experiments, isogenic mutants of *A. pleuropneumoniae* obtained by mini-Tn10 transposon mutagenesis [17] were used in flow cytometry. A nalidixic acid-resistant mutant (4074 Nal^R) was isolated from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain 4074 and used as recipient strain for transposon mutagenesis, while *Escherichia coli* S17.1 λpir (pLOF/Km) was used as donor strain. Mutants 15.1 (rough LPS), 5.1 (LPS with a modified core-lipid A region showing a faster migration on Tricine-SDS-PAGE), and 33.2 (without capsule) were grown on BHI agar plates supplemented with 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of NAD, 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of nalidixic acid, and 75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of kanamycin. Plates were incubated at 37°C for 18–24 h in a 5% CO_2 atmosphere.

2.2. Labeling of pig Hb with fluorescein

Labeling of pig Hb with fluorescein was done using a FLUOS labeling kit according to the manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim, Laval, Qué., Canada). The molar ratio was set after standardization at 1:100, i.e. 1 molecule of Hb was mixed with 100 molecules of FLUOS. Briefly, pig Hb (1 mg; Sigma) was dissolved in 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4). A volume of 39.5 μl of a FLUOS solution (20 mg ml^{-1}) was added to the Hb solution (1 ml) and incubated in the dark for 2 h at room temperature with gentle agitation. Hb-FLUOS reaction mix was then applied to a Sephadex G-25 column and remaining, non-reacted FLUOS was separated by gel filtration. To assess host specificity, bovine Hb (Sigma) was also labeled according to this protocol.

2.3. Flow cytometry

Overnight bacterial cultures were washed and re-suspended in PBS to an A_{540} nm of 0.2, equivalent to approximately 10^8 CFU ml⁻¹. A volume of 1 ml of bacterial suspension was distributed in each Eppendorf microtest tubes which were then centrifuged at $10\,000\times g$ for 10 min. The pellets were resuspended in 450 μ l of PBS and incubated with 50 μ l of FLUOS-Hb (final dilution 1:10) for 60 min at 37°C. Cells were washed three times in 700 μ l of

PBS and centrifuged at $10\,000\times g$ for 10 min, then the pellets were fixed with 2% paraformaldehyde. Cells were kept in the dark at 4°C until analyzed by flow cytometry as previously described [18]. 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. Suspensions of cells of *A. pleuropneumoniae* that have not been incubated with FLUOS-Hb served as controls. Bacterial cells were

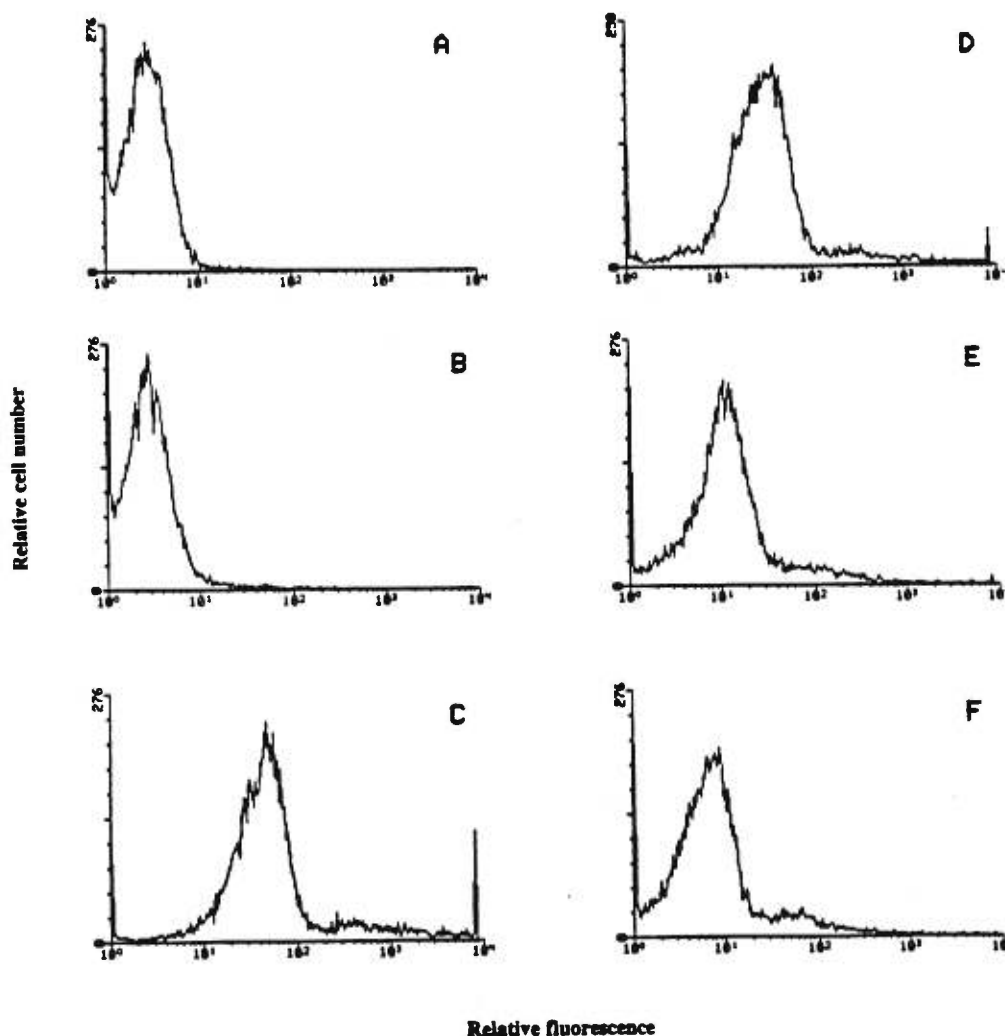


Fig. 1. Flow cytometry analysis of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain 4074. Bacterial cells were grown under iron-restricted conditions and incubated with 1:5 (C), 1:10 (D), 1:50 (E), or 1:100 (F) dilutions of FLUOS-Hb. Bacterial cells not incubated with FLUOS-Hb (A) or incubated with unlabeled pig Hb (B) served as controls.

also incubated with unlabeled pig Hb to determine whether Hb, by itself, possesses a fluorescent activity.

2.4. Preparation of outer membranes of *A. pleuropneumoniae*

Outer membranes from *A. pleuropneumoniae* reference strain of serotype 1 (strain 4074) grown under iron-sufficient or iron-restricted conditions were extracted and isolated by the method of Elkins [12] with some modifications. Briefly, whole *A. pleuropneumoniae* cells were disrupted with a French press. Intact cells and cell debris were removed by centrifugation at $12\,000\times g$ for 10 min at 4°C. The supernatant was then subjected to centrifugation at $100\,000\times g$ for 1 h at 4°C which yielded a total membrane pellet. The pellet was rinsed twice with water without disturbing the pellet and was solubilized with 1% Sarkosyl at room temperature for 1 h with rocking. The suspension was subjected to centrifugation at $100\,000\times g$ for 1 h at 4°C and the Sarkosyl-soluble cytoplasmic membrane supernatant was discarded. The Sarkosyl-insoluble pellet was re-suspended into 1% Sarkosyl and then centrifuged. The pellet containing outer membranes was stored at -20°C for further experiments.

2.5. Electrophoresis and Western blot analysis

Outer membrane proteins from *A. pleuropneumoniae* reference strain 4074 of serotype 1 grown under iron-sufficient or iron-restricted conditions were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The SDS-PAGE was conducted by the discontinuous buffer system of Laemmli, with a 4.5% polyacrylamide stacking gel and a 12.5% polyacrylamide running gel [7]. Samples were boiled for 10 min in solubilization buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, and 0.025% bromophenol blue). Prestained low molecular mass markers were obtained from Bio-Rad (Mississauga, Ont., Canada). Gels were run in a Mini-PROTEAN II vertical slab electrophoresis cell (Bio-Rad) and then stained with Coomassie brilliant blue R-250 or transferred to nitrocellulose membranes for Western immunoblotting as previously described [7]. The membranes were then incubated with antibodies from a pig experimentally in-

fectured with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 (kindly supplied by M. Gottschalk, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Canada).

2.6. Data analysis

Flow cytometry results were expressed as percentage of gated fluorescent events which is the percentage of fluorescent cells out of 10 000 cells. The mode is the point of maximum frequency; it represents the most elevated fluorescent intensity of the majority of cells. All experiments were performed at least twice and samples were always done in duplicate. The modes and the percentages of gated fluorescent events were expressed as mean \pm standard error (mean \pm S.E.). The significance was evaluated by the two-tailed paired two group Student's *t*-test with $n=4$. Results were considered significantly different if $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the Hb-binding activity of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 using FLUOS-Hb

Preliminary experiments to determine the appropriate FLUOS-Hb working dilution which allows optimal labeling of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 in flow cytometry were done using 1:5, 1:10, 1:50, and 1:100 dilutions (Fig. 1C–F). These histograms showed a progressive decrease in the fluorescence intensity of the bacterial cell population as the dilution of FLUOS-Hb was increased. When cells were grown under iron-restricted conditions to mimic host environment where iron availability is limited, and then incubated with the FLUOS-Hb dilutions mentioned above, $93.7 \pm 1.8\%$, $92.2 \pm 1.6\%$, $82.8 \pm 6.5\%$, and $69.2 \pm 12.1\%$ of the bacterial cell population was recorded as fluorescent events, respectively (Fig. 1C–F). Suspensions of cells of *A. pleuropneumoniae* that have not been incubated with FLUOS-Hb served as controls (Fig. 1A) and percentages of fluorescent events were always under 8%. Bacterial cells that were incubated with unlabeled pig Hb served also as controls throughout

the study and percentages of fluorescent events were also under 8% (Fig. 1B). Percentages of fluorescent events of *A. pleuropneumoniae* incubated with FLUOS-Hb dilutions mentioned above were significantly different ($P < 0.05$) from the control cells. Modes of *A. pleuropneumoniae* incubated with FLUOS-Hb dilutions 1:5 and 1:10 (Fig. 1C,D) were significantly different ($P < 0.05$) from the control cells (Fig. 1A,B). Subsequent experiments were performed with a FLUOS-Hb dilution of 1:10, a dilution giving an optimal cell labeling.

Comparison of the Hb-binding activity of *A. pleu-*

ropneumoniae serotype 1 strain 4074 grown under iron-restricted conditions with cells grown under iron-sufficient conditions using FLUOS-Hb was studied to understand the implication of iron-repressible OMPs in the Hb-binding activity of this microorganism. The percentage of fluorescent events of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 grown under iron-restricted conditions (Fig. 2A, peak II; $92.2 \pm 1.6\%$) was significantly different ($P < 0.05$) from the percentage obtained when cells were grown under iron-sufficient conditions (Fig. 2B, peak II) where $78.2 \pm 4.5\%$ of the bacterial cell population

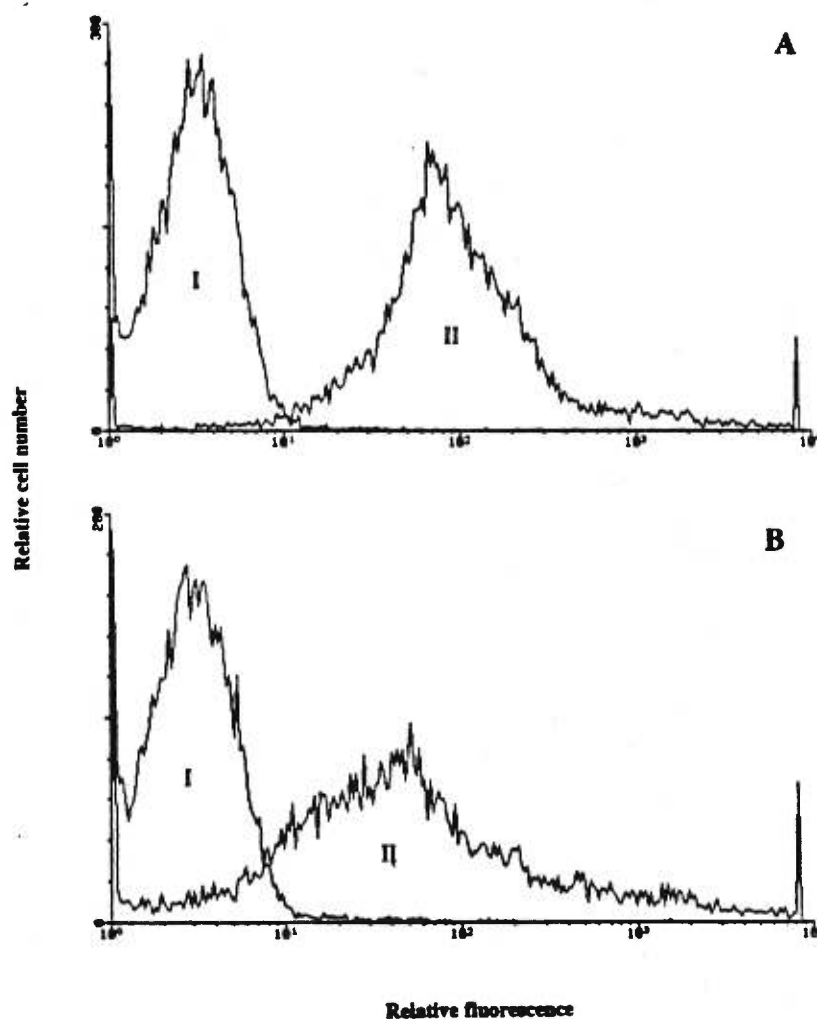


Fig. 2. Flow cytometry analysis of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain 4074. Cells were grown under iron-restricted (A, peak II) or iron-sufficient conditions (B, peak II) and incubated with a 1:10 dilution of FLUOS-Hb. Bacterial cells grown under iron-restricted (A, peak I) or iron-sufficient conditions (B, peak I) and not incubated with FLUOS-Hb served as controls.

was recorded as fluorescent events. Suspensions of cells of *A. pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions (Fig. 2A, peak I) or iron-sufficient conditions (Fig. 2B, peak I) and that have not been incubated with FLUOS-Hb served as controls and were significantly different ($P < 0.05$) from bacterial cells incubated with FLUOS-Hb. These results indicate that iron-restriction in *A. pleuropneumoniae* promotes the expression of Hb receptors, and that Hb-binding activity is, at least in part, iron-repressible. Although we previously reported that *A. pleuropneumoniae* lipid A was able to bind pig Hb [5,7], it is quite possible that in addition some OMPs might act as iron-repressible surface receptor(s) for Hb as hypothesized by Deneer and Potter [6] and ourselves [7]. We thus propose that the basic level of Hb-binding activity, observed under iron-sufficient conditions, would be mainly attributable to LPS and that the higher level of Hb-binding activity, observed under iron-restricted conditions, would correspond to LPS and iron-repressible OMPs.

To assess host specificity, we labeled bovine Hb with fluorescein and then examined the bovine Hb-binding activity of *A. pleuropneumoniae* using flow cytometry. The results obtained with fluorescein-labeled bovine Hb (data not shown) were not significantly different from the ones obtained with fluorescein-labeled pig Hb ($P > 0.05$). This is not surprising since studies in our laboratory have revealed that *A. pleuropneumoniae* strains 4074 and 4226 could obtain iron from Hb of either pig, sheep, human, goat, bovine, rabbit, or horse [5]. In addition, according to the literature, the binding specificity of Hb receptors displays none of the species bias evident in the bac-

terial transferrin receptors [19]. Although preferentially recognizing human Hb, the Hb receptor of *Haemophilus influenzae* readily binds non-human mammalian Hb as well as Hb complexed to haptoglobin [20]. This suggests that conserved amino acid residues in the globin chains surrounding the heme crevice may be involved in binding [1].

3.2. Presence of Hb-binding activity in other *A. pleuropneumoniae* isolates

Hb-binding activity was evaluated in representative isolates of *A. pleuropneumoniae* belonging to serotypes 1 and 2 (Table 1). *A. pleuropneumoniae* serotype 2 reference strain (4226) and field isolates of serotype 1 (FMV 87-682) and serotype 2 (Q 87-981) were also able to bind FLUOS-Hb. Percentages of fluorescent events and modes of these representative isolates incubated with FLUOS-Hb were significantly different ($P < 0.05$) from the control cells which were bacterial cells not incubated with FLUOS-Hb. These results demonstrate a functional conservation of Hb-binding activity among two clinical significant serotypes of *A. pleuropneumoniae*.

The percentages of gated fluorescent events of *A. pleuropneumoniae* serotype 2 reference strain (4226) were lower than the ones observed with the serotype 1 reference strain (4074) ($P = 0.02$) and with the field isolates of serotype 1 (FMV 87-682) ($P = 0.03$) and serotype 2 (Q 87-981) ($P = 0.03$) (Table 1). The reasons for this discrepancy are unclear at the moment. One possible explanation might involve the presence of a different type of LPS. The serotype 2 reference strain (4226) is the only one among the isolates

Table 1

Percentages of fluorescent events and modes recorded in flow cytometry analysis of *A. pleuropneumoniae* reference strains and field isolates grown under iron-restricted conditions and incubated with a 1:10 dilution of FLUOS-Hb

Reference strains or isolates	% of gated fluorescent events ^a		Modes ^a	
	Control cells ^d	Cells labeled with FLUOS-Hb	Control cells ^d	Cells labeled with FLUOS-Hb
Serotype 1 reference strain 4074	3.6 ± 2.2	92.2 ± 1.6 ^b	10.9 ± 1.1	2151 ± 2065 ^h
Field isolate of serotype 1 (FMV 87-682)	5.9 ± 3	97.8 ± 1.6 ^{b,c}	15.6 ± 0.6	4418 ± 2268 ^h
Serotype 2 reference strain 4226	2.7 ± 1.8	84.7 ± 3.4 ^b	16.2 ± 0.6	2134 ± 2071 ^h
Field isolate of serotype 2 (Q 87-981)	3.2 ± 0.5	96.7 ± 0.4 ^{b,c}	15.6 ± 0.6	6301 ± 2046 ^h

^aExpressed as mean ± S.E. ($n = 4$).

^b $P < 0.05$ compared to control cells.

^c $P < 0.05$ compared to the reference strain of the same serotype.

^dBacterial cells not incubated with FLUOS-Hb.

tested that has a smooth LPS profile. It is thus tempting to speculate that with a smooth LPS profile, Hb accessibility to the core-lipid A region is decreased and that a smooth LPS structure would also mask surface iron-regulated proteins which we suspect to be involved in the iron uptake.

The field isolates of serotype 1 (FMV 87-682) and serotype 2 (Q 87-981) had the highest modes (Table 1). This implies that the majority of these cells bound more FLUOS-Hb than the cells of *A. pleuropneumoniae* reference strains of serotype 1 (4074) and serotype 2 (4226). These differences were not significant ($P > 0.05$) as determined by the Student's *t*-test. However, field isolates of serotype 1 (FMV 87-682) and serotype 2 (Q 87-981) showed the highest percentages of fluorescent events which were significantly different ($P < 0.05$) from those obtained by the reference strains. Interestingly, these field isolates seemed to have a greater Hb-binding activity than the reference strains which have been maintained in culture collection for many years.

3.3. The Hb-binding activity of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 isogenic mutants

Hb-binding activity of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS or capsule mutants was tested in flow cytometry to evaluate the influence of surface polysaccharides on Hb-binding activity. *A. pleuropneumoniae* serotype 1 LPS or capsule mutants were also able to bind FLUOS-Hb and their percentages of fluorescent events and modes were significantly different ($P < 0.05$) from the control cells which were bacterial cells not incubated with FLUOS-Hb

(Table 2). A significant increase ($P = 0.01$) in the percentages of gated fluorescent events of capsule mutant 33.2 compared to the wild-type parent strain NaI^R was observed (Table 2). These results indicate that surface molecules with Hb-binding activity are more exposed at the cell surface in the absence of a capsular material layer. In addition, capsule mutant 33.2 (Table 2) had the highest mode, but this result was not significant ($P > 0.05$) when compared to the wild-type parent strain NaI^R.

The Hb-binding activity, expressed as the percentages of gated fluorescent events, of *A. pleuropneumoniae* LPS mutants 15.1 (rough LPS) and 5.1 (LPS with a modified core-lipid A region) grown under iron-restricted conditions were higher than the ones observed in the wild-type parent strain NaI^R (Table 2). However, these differences were not significant ($P > 0.05$). It appears that the differences between the semi-rough LPS profile of the wild-type parent strain NaI^R and the rough LPS profile of the mutant 15.1 did not allow a significant increase of the Hb accessibility to surface proteins and to the core-lipid A region of LPS. The mutation in the core region of mutant 5.1 did not either significantly modify the Hb accessibility to the core-lipid A region, which was shown to bind pig Hb [5,7], or to surface proteins.

3.4. Effects of iron restriction on the OMPs profile of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074

Effects of iron restriction on the OMPs profile of *A. pleuropneumoniae* have been documented (for example, see [6,21]). Major iron-regulated OMPs identified by Deneer and Potter [6] had relative molecular

Table 2
Percentages of fluorescent events and modes recorded in flow cytometry analysis of isogenic mutants of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 NaI^R grown under iron-restricted conditions and incubated with a 1:10 dilution of FLUOS-Hb

Parent strain and isogenic mutants	% of gated fluorescent events ^a		Modes ^a	
	Control cells ^d	Cells labeled with FLUOS-Hb	Control cells ^d	Cells labeled with FLUOS-Hb
Parent strain 4074 NaI ^R	7.3 ± 0.3	94.6 ± 2.5 ^b	16.8 ± 1.8	2593 ± 1949 ^b
Mutant 15.1 (rough LPS)	7.8 ± 0.2	97.6 ± 0.5 ^b	15.0 ± 0	2198 ± 2050 ^b
Mutant 5.1 (modified core-lipid A region)	7.4 ± 0.6	98.0 ± 0.6 ^b	15.3 ± 0.9	2369 ± 1993 ^b
Mutant 33.2 (without capsule)	7.8 ± 1.4	96.6 ± 2.4 ^{b,c}	16.2 ± 1.6	3731 ± 2002 ^b

^aExpressed as mean ± S.E. ($n=4$).

^b $P < 0.05$ compared to control cells.

^c $P = 0.01$ compared to parent strain.

^dBacterial cells not incubated with FLUOS-Hb.

sizes of 76 and 105 kDa. They suggested that these proteins might acquire complexed iron during growth in vivo. Polypeptides of 47, 54, 79 and between 96 and 102 kDa were identified in *A. pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions [21]. Two iron-regulated OMPs of ≈ 60 kDa (TfbA) and ≈ 100 kDa (TfbB) have been identified in *A. pleuropneumoniae* as transferrin binding proteins [22,23].

Outer membranes from *A. pleuropneumoniae* reference strain 4074 of serotype 1 grown under iron-sufficient or iron-restricted conditions were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 3A). Iron restriction induced by EDDHA resulted in the appearance of OMPs with a relative molecular mass between 81 and 102 kDa (Fig. 3A). Iron-regulated OMPs with a lower relative molecular mass between 32 and 46 kDa and around 60 kDa were also observed. In addition, an increase in the synthesis of a 75 kDa OMP was noticed when cells were grown under iron restriction. This protein might correspond to the 76-kDa protein identified by Deneer and Potter [6] and to the 79-kDa protein identified by Niven et al. [21]. It is likely that some of these OMPs play a role in the Hb-binding activity detected by flow cytometry. We suggest that one or more of these OMPs may serve as receptors for Hb and could be implicated in the iron transport into the cell like it has been proposed for other Pasteurellaceae [12]. Works are underway to characterize OMPs of *A. pleuropneumoniae* with Hb-binding activity.

Analysis of the serological response to outer membrane antigens during *A. pleuropneumoniae* infection in pigs has identified a number of OMPs that are only reactive with convalescent serum [24], including the 76- and 105-kDa iron-repressible proteins [6]. To assess the immunogenicity of the *A. pleuropneumoniae* iron-regulated OMPs, we performed Western blotting with OMPs from iron-starved cells of serotype 1. Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane and reacted with convalescent-phase antiserum from a pig experimentally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1. Four of the iron-regulated OMPs were immunogenic according to Western immunoblots (Fig. 3B). Two of them had a relative molecular mass between 81 and 105 kDa. The other two iron-regulated OMPs had a lower relative molecular mass between 35 and 81

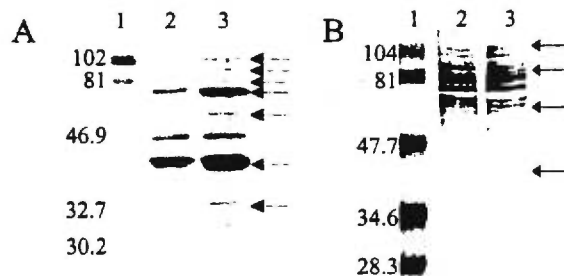


Fig. 3. Outer membrane proteins profile of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain 4074 grown under iron-restricted or iron-sufficient conditions. OMPs were separated on 12.5% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (A) or transferred to nitrocellulose membranes for Western immunoblotting (B). The membranes were then incubated with serum from a pig experimentally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1. Lane 1, molecular mass markers in kDa; lane 2, OMPs obtained from cells grown under iron-sufficient conditions; lane 3, OMPs obtained from cells grown under iron-restricted conditions. Arrows indicate the position of iron-regulated OMPs.

kDa, but the iron-regulated OMP of 75 kDa did not react with the convalescent-phase antiserum.

In the present study, we quantitated *A. pleuropneumoniae* Hb-binding activity using fluorescein-labeled pig Hb and flow cytometry. Flow cytometry is a powerful procedure that can measure several parameters on tens of thousands of individual cells within a few minutes. We demonstrated that in *A. pleuropneumoniae*, the Hb-binding activity is, at least in part, iron-repressible. We propose that the total Hb-binding activity observed in our study is attributable to both LPS and iron-repressible OMPs. We have developed a simple and rapid flow cytometric analysis that allows quantification of the expression of *A. pleuropneumoniae* surface molecules with Hb-binding activity using fluorescein-labeled pig Hb which can be adapted and advantageously used with Hb of different hosts and other bacterial species.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (OGP0003428) and from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR; 99-ER-0214). M.A. and S.R. are the recip-

ient of a studentship from FCAR. We are grateful to S. Sénéchal for his expertise in flow cytometry.

References

- [1] Lee, B.C. (1995) Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol. Microbiol.* 18, 383–390.
- [2] Otto, B.R., Verweij-van Vught, J.J. and MacLaren, D.M. (1992) Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 217–233.
- [3] Mittal, K.R. (1992) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* 32, 135–148.
- [4] 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.
- [5] Bélanger, M., Bégin, C. and Jacques, M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* 63, 656–662.
- [6] Deneer, H.G. and Potter, A.A. (1989) Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 57, 798–804.
- [7] 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.
- [8] Stojiljkovic, I., Larson, J., Hwa, V., Anic, S. and So, M. (1996) HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: Iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. *J. Bacteriol.* 178, 4670–4678.
- [9] Wong, J.C.Y., Holland, J.T.P., Smith, A. and Williams, P. (1994) Identification and characterization of an iron-regulated hemopexin receptor in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* 62, 48–59.
- [10] Fujimura, S., Shibata, Y., Hirai, K. and Nakamura, T. (1996) Binding of hemoglobin to the envelope of *Porphyromonas gingivalis* and isolation of the hemoglobin-binding protein. *Infect. Immun.* 64, 2339–2342.
- [11] Leung, K.P., Subramaniam, P.S., Okamoto, M., Fukushima, H. and Lai, C.H. (1998) The binding and utilization of hemoglobin by *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 162, 227–233.
- [12] Elkins, C. (1995) Identification and purification of a conserved heme-regulated hemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* 63, 1241–1245.
- [13] Stevens, M.K., Porcella, S., Klesney-Tait, J., Lumbley, S., Thomas, S.E., Norgard, M.V., Radolf, J.D. and Hansen, E.J. (1996) A hemoglobin-binding outer membrane protein is involved in virulence expression by *Haemophilus ducreyi* in an animal model. *Infect. Immun.* 64, 1724–1735.
- [14] Cope, L.D., Thomas, S.E., Latimer, J.L., Slaughter, C.A., Müller-Eberhard, U. and Hansen, E.J. (1994) The 100 kDa haem:haemopexin-binding protein of *Haemophilus influenzae*: structure and localization. *Mol. Microbiol.* 13, 863–873.
- [15] Cutler, W.C., Eke, P.I., Genco, C.A., Van Dyke, T.E. and Arnold, R.R. (1996) Hemin-induced modifications of the antigenicity and hemin-binding capacity of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 64, 2282–2287.
- [16] Diarra, M.S., Dolence, J.A., Dolence, E.K., Darwish, I., Miller, M.J., Malouin, F. and Jacques, M. (1996) Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 853–859.
- [17] Rioux, S., Harel, J., Dubreuil, J.D. and Jacques, M. (1997) Adherence of isogenic LPS and CPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells. In: 97th General Meeting of the American Society for Microbiology. Miami Beach, USA, p. 65 (Abstr. B-216).
- [18] Paradis, S.-E., 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.
- [19] Cornelissen, C.N. and Sparling, P.F. (1994) Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 14, 843–850.
- [20] Frangipane, M.E., Morton, D.J., Wooten, J.A., Pozsgay, J.M. and Stull, T.L. (1994) Binding of human hemoglobin by *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 243–248.
- [21] Niven, D.F., Donga, J. and Archibald, F.S. (1989) Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. *Mol. Microbiol.* 3, 1083–1089.
- [22] Gerlach, G.F., Anderson, C., Potter, A.A., Klashinsky, S. and Willson, P.J. (1992) Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 60, 892–898.
- [23] Gonzalez, G.C., Caamano, D.L. and Schryvers, A.B. (1990) Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 4, 1173–1179.
- [24] Rapp, V.J. and Ross, R.F. (1986) Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection. *Infect. Immun.* 54, 751–760.

Article 3:

ARCHAMBAULT, Marie, Clément Rioux, France Dumas, Pierre Thibault,
Christopher Elkins et Mario Jacques.

Identification of hemin- and hemoglobin-binding proteins of *Actinobacillus*
pleuropneumoniae serotype 1.

Identification of hemin- and hemoglobin-binding proteins of
Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1

Marie Archambault¹, Clément Rioux^{2, 6}, France Dumas³, Pierre Thibault⁴,
Christopher Elkins⁵ 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; ²Unité de Recherche en Vaccinologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Québec, Canada G1V 4G2; ³Biotechnology Research Institute, NRC, Montreal, Québec, Canada H4P 2R2; ⁴Institute for Biological Sciences, NRC, Ottawa, Canada K1A 0R6; ⁵University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA; ⁶Present address: Intellivax International Inc., Montréal, Québec, Canada H4P 2R2.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, OMP, hemoglobin-binding protein, hemin-binding protein

*Correspondence to: Mario Jacques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3 200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6; Tel: (450) 773-8521 ext. 8348; Fax: (450) 778-8108; E-mail: jacqum@medvet.umontreal.ca

ABSTRACT

The reference strains representing the twelve serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* were examined for their ability to utilize various iron-containing compounds as an iron source for growth. In a growth promotion assay, all the reference strains were able to use either porcine and bovine hemoglobin (Hb) or porcine and bovine hemin (Hm). Using an affinity purification procedure with Hm- or Hb-agarose, a major Hm- and Hb-binding outer membrane protein (OMP) of approximately 75 kDa was isolated from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 grown under iron-restricted conditions. Minor Hm- and Hb-binding OMPs with molecular masses of about 47 and 36 kDa were also identified. In addition, soluble Hm- and Hb-binding factors of approximately 70 and 104 kDa were detected in the culture supernatant. A survey of *A. pleuropneumoniae* revealed that all tested strains, except reference strain of serotypes 3, 6, 7, and 10, synthesized the 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP under iron-restricted conditions. The screening also demonstrated that the ability to express the minor 47-kDa Hm- and Hb-binding OMP was a conserved trait in all strains representing the twelve serotypes; the 36-kDa Hm- and Hb-binding OMP was isolated from all the reference strains, except reference strain 8329/85 representing serotype 12. Labeling of cells with [³H]palmitate indicated that the 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP was not a lipoprotein. However, the minors Hm- and Hb-binding OMPs could be lipoproteins since bands around molecular masses of 47 and 36 kDa were observed. Despite many attempts, it was not possible to determine the N-terminal amino acid sequence of the major 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP. In order to determine whether the major 75-kDa OMPs purified by either Hm-agarose or Hb-agarose were identical, these proteins were excised and digested in-gel with trypsin. Proteolytic fragments were then separated on a microbore HPLC column and fractions collected were analysed by mass spectrometry. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight (MALDI-TOF) analyzes revealed a number of common tryptic peptides between the Hb-agarose- and Hm-agarose-purified OMPs strongly suggesting that these peptides originate from the same protein. Taken together, our data suggest that *A. pleuropneumoniae* express Hm and Hb-binding proteins that could be implicated in the iron uptake from porcine Hb and Hm.

INTRODUCTION

Of the many complex interactions which occur between a pathogen and its host, one common essential component of the infectious process involves the multiplication of the invading microorganism within host tissues. Such growth is critical to the establishment of an infection and depends, in part, upon the ability of the pathogen to scavenge certain essential nutrients (37). Iron is essential for bacterial growth (23, 26, 35, 42). In the host, extracellular iron is bound to the iron-binding glycoproteins lactoferrin and transferrin in exocrine secretions, while most of the intracellular iron is sequestered as heme-containing proteins such as hemoglobin (Hb). This sequestration limits the availability of free iron to levels below that required to support microbial growth (23, 26, 42). However, to survive in the host, bacterial pathogens have evolved different high-affinity iron-acquisition mechanisms designed to obtain iron (37). One such system comprises the elaboration of siderophores that chelate external iron followed by binding to their cognate receptor and subsequent internalization. Another system utilises a receptor-mediated mechanism to acquire iron from lactoferrin, transferrin or heme-containing proteins (6, 23, 26, 34, 35). A large number of pathogenic bacterial species use heme compounds as a source of iron, and various outer membrane proteins have been isolated and characterized which proposed function is to bind heme to the bacterial cell surface (23, 34). In these systems the outer membrane receptor directly recognized the heme compounds. Another more complex way to obtain heme involves an extracellular protein, named hemophore, that binds heme and shuttles it back to a specific outer membrane receptor (15). This hemophore-dependent heme acquisition system has been detected in *Haemophilus influenzae* (5), *Serratia marcescens* (24) and *Escherichia coli* strain EB1 (33)

Actinobacillus pleuropneumoniae, a member of the *Pasteurellaceae* family, is the causative agent of porcine pleuropneumonia. Among the 12 serotypes recognized, serotypes 1, 5 and 7 are important in North America (29) while serotype 2 is predominant in many European countries (28). Several bacterial components, including RTX toxins (two of which exhibit hemolytic activity), lipopolysaccharides (LPS), capsular polysaccharides and outer membrane proteins (OMPs) appear to contribute to the disease process (16). Potential iron sources for *A. pleuropneumoniae* include porcine transferrin (32), exogenous siderophores (9) and heme compounds liberated from host cells (8). We and others demonstrated that *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 and 2 can utilize porcine Hb or hemin (Hm) as a sole source of iron for growth *in vitro* (4, 8). We recently reported the binding of porcine Hb to *A. pleuropneumoniae* LPS

(1, 4) and hypothesized that LPS might perform a "docking" function. We suspect that surface proteins are then involved in the iron uptake from porcine Hb. Comparison, using flow cytometry, of the Hb-binding activity of *A. pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions with cells grown under iron-sufficient conditions indicated that iron-restriction promoted the expression of Hb receptors, and that Hb-binding activity was, at least in part, iron-repressible (2)

The mechanism by which *A. pleuropneumoniae* utilize Hm- and Hb-iron sources as well as the protein components involved have so far not been identified. Such a system could serve as an important mechanism for the *in vivo* iron acquisition by *A. pleuropneumoniae*. The aim of the present study was to identify proteins of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 which express Hb- or Hm-binding activity.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates and growth conditions. *A. pleuropneumoniae* reference strains representing the twelve serotypes were used in the present study. Bacteria were grown in brain heart infusion liquid medium (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 5 μ g of NAD/ml. To obtain iron-restricted conditions for preparation of outer membranes, the culture medium was supplemented with 100 μ M of deferrated EDDHA (ethylenediamine di-o-hydroxyphenylacetic acid; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (9). Cultures were incubated at 37°C for 18-24 h in a 5% CO₂ atmosphere.

Growth promotion assay. The utilization of heme compounds by iron-restricted *A. pleuropneumoniae* was determined by a plate assay (4, 8) with some modifications. Briefly, fresh overnight cultures of the reference strains of *A. pleuropneumoniae* were resuspended at a concentration of approximately 10⁸ CFU/ml (A540 of 0.2) in phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4). Fifty microliters of the cells suspension were spread onto the surface of a BHI-NAD agar plate containing 200 μ M of deferrated EDDHA, a concentration that inhibits the growth of *A. pleuropneumoniae*. Sterile filter disks (Becton Dickinson, 6.25 mm in diameter) were then placed onto the agar plate and 10 μ l of porcine or bovine Hb (10 mg/ml, dissolved in PBS) or Hm (10 mg/ml, dissolved in 30% NH₄OH) were spotted onto the filter disks. Zones of growth around the disks were evaluated after incubation at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂ for 48 h. A solution of FeCl₃ (10 mg/ml, dissolved in PBS) and PBS buffer were used as controls.

Preparation of outer membranes. Outer membranes from *A. pleuropneumoniae* reference strain of serotype 1 (strain 4074) grown under iron-sufficient or iron-restricted conditions were extracted and isolated by the method of Elkins (10) with some modifications. Briefly, whole cells of *A. pleuropneumoniae* were disrupted with a French press. Intact cells and cell debris were removed by centrifugation at 12 000 X g for 10 min at 4°C. The supernatant was then subjected to centrifugation at 100 000 X g for 1 h at 4°C which yielded a total membrane pellet. The pellet was then solubilized with 1% Sarkosyl at room temperature for 1 h with rocking. The suspension was subjected to centrifugation at 100 000 X g for 1 h at 4°C and the Sarkosyl-soluble cytoplasmic membrane supernatant was discarded. The Sarkosyl-insoluble pellet was

resuspended into 1% Sarkosyl and then centrifuged. The pellet containing outer membranes was conserved at -20°C for further experiments.

Affinity purification with Hm- or Hb-agarose. Analytical purification was performed in microcentrifuge tubes as described by Elkins (10). Outer membranes were solubilized by using 1% Zwittergent 3.14 (Calbiochem, La Jolla, CA) in 50 mM Tris, 150 mM NaCl and 5 mM EDTA pH 7.5 with rocking at 37°C for 1 h. After centrifugation at 12 500 X g for 10 min, the soluble fraction containing OMPs was mixed with solid-phase bovine Hm- or bovine Hb-agarose (Sigma) and gently rocked for 1 h at room temperature. The agarose containing the ligand-receptor complex was washed in the above-mentioned buffer to remove nonspecifically bound proteins. The complexes were resuspended in Laemmli sample buffer for analytical SDS-PAGE or Far-Western blotting. Solubilized whole cells of *A. pleuropneumoniae* reference strains representing the twelve serotypes grown under iron-restricted conditions and proteins in concentrated lyophilized culture supernatants obtained from 250 ml of overnight culture of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 grown under iron-restricted conditions were also submitted to this affinity purification methodology using Hm- or Hb-agarose.

Electrophoresis. The SDS-PAGE was conducted by the discontinuous buffer system of Laemmli (21), with a 4.5% polyacrylamide stacking gel and a 12.5% polyacrylamide running gel (1). Samples were boiled for 10 min in solubilization buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, and 0.025% bromophenol blue). Prestained low molecular mass markers were obtained from Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). Gels were run in a Mini-PROTEAN II vertical slab electrophoresis cell (Bio-Rad) and then stained with Coomassie brilliant blue R-250 or transferred to nitrocellulose membranes for Far-Western blot.

Labeling of cells with [³H]palmitate. To exponentially growing cells of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 submitted to iron-restricted conditions or to iron-sufficient conditions, [³H]palmitate (5 mCi/ml) was added to a final concentration of 50 μCi/ml. Incubation was then continued for 2 h for culture under iron-sufficient conditions and 8 h for culture under iron-restricted conditions. Labeling was stopped by precipitation with trichloroacetic acid (10%, wt/vol) for 30 min on ice. Proteins were pelleted by centrifugation at 15 000 X g for 20 min, and the pellets were washed

twice with methanol to remove lipids. The dried pellets were resuspended in sample buffer and then analyzed by SDS-PAGE. The radiolabelled protein bands in the dried gel were detected by fluorography using EN³HANCE (Dupont, NEN Research Products) according to the manufacturer's instructions.

Labeling of porcine Hb with biotin or digoxigenin. Porcine Hb (Sigma) was biotinylated as described previously by Frangipane et al (11). Briefly, Hb (1 mg/ml) was dissolved in PBS and biotin-NHS (Sigma) was dissolved to a concentration of 1 mg/ml in dimethylformamide. To 5 ml of porcine Hb solution was added 430 μ l of the biotin-NHS solution, and following incubation for 2 h at room temperature, unbound biotin was removed by passage through a Sephadex G-25 column. Labeling of porcine Hb with digoxigenin (DIG-NHS) was done using a DIG labeling kit according to the manufacturer's instructions (Roche Biochemicals, Laval, Québec, Canada). The molar ratio was set after standardization at 1:10, i.e. 1 molecule of porcine Hb was mixed with 10 molecules of DIG-NHS. Briefly, porcine Hb (1 mg) was dissolved in 1 ml of PBS. A volume of 5.85 μ l of a DIG-NHS solution (20 mg/ml) was added to the Hb solution (1 ml) and incubated for 2 h at room temperature with gentle agitation. Porcine Hb-DIG-NHS reaction mix was then applied to a Sephadex G-25 column and remaining, non reacted DIG-NHS was separated by gel filtration.

Far-Western blot. Western blots were carried out as described by Towbin et al. (41). All incubations were followed by four 3-min washes with a Tris-saline buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4). The membranes were first incubated at room temperature for 1 h with 2% skim milk and then overnight at 4°C. The membranes were incubated with biotinylated porcine Hb or with digoxigenin-labeled porcine Hb and then incubated at room temperature for 1 h with an avidin peroxidase conjugate (Bio-Rad) or an anti-DIG peroxidase conjugate (Roche Biochemicals). Reactions were revealed by addition of 4-chloro-1-naphthol and hydrogen peroxide as chromogenic substrate.

N-terminal amino acid sequence determination. For N-terminal amino acid analysis, the major 75-kDa OMPs purified by either Hm- or Hb-agarose were separated by SDS-PAGE, electroblotted to a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad) and stained with Ponceau. The N-terminal amino acid sequence was determined by standard Edman degradation on a model ABI 477A microsequencer (Applied Biosystems, Foster City, California).

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Time-Of-Flight (MALDI-TOF). Protein bands from the major 75-kDa OMPs purified by either Hm- or Hb-agarose were cut out and submitted to "in gel" reduction (DTT) and alkylation (Iodoacetamide) of the disulfide groups prior to trypsin digestion (43, 44). The enzyme used was the modified sequencing grade trypsin (Promega). The peptides extracted from the gel were separated on a Brownlee HPLC microbore C18 column (OD-300, 7 μ , 2.1 X 30 mm, ABI) using an Applied Biosystems 130A Separation System. Peptides were eluted at 200 μ l/min with the following gradient program: 0-40 min (0-80% B) and 40-57 min (80-100% B). Solvent A being 0.1% TFA/H₂O and solvent B being 0.08% TFA in 70% acetonitrile/H₂O. The peptides were detected by their absorbance at 220 nm. Many fractions from samples of the 75-kDa OMPs purified by either Hm- or Hb-agarose were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometer. Fractions #11 and #16 from the 75-kDa OMP purified by Hb-agarose and #14 and #18 from the 75-kDa OMP purified by Hm-agarose were analyzed by MS-MS-Sequencing (more complete dissociation of the peptide ions with argon gas) and common sequences in both OMPs were confirmed by peptide sequencing on the Procise model 49 from Applied Biosystems.

RESULTS

Growth promotion assays. To determine whether *A. pleuropneumoniae* reference strains representing the twelve serotypes could utilize heme compounds as the sole source of iron, we carried out plate assays in which the abilities of various heme compounds to overcome EDDHA-induced iron restriction were evaluated. All the strains were able to use either porcine and bovine Hb-iron sources or porcine and bovine Hm-iron sources (Table 1). However, strain K17 of serotype 5a did not appear to use porcine or bovine Hb but was able to acquire iron from porcine and bovine Hm since growth around the disks was observed with these compounds. In contrast, strains 13039 of serotype 10 and 56153 of serotype 11 exhibited growth only with porcine and bovine Hb-iron sources. All the reference strains were able to use the control iron source FeCl₃.

Identification of Hm- and Hb-binding OMPs. To determine whether *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 expressed iron-regulated Hm- and Hb-binding OMPs, outer membranes were prepared from cells grown in both iron-sufficient and iron-restricted conditions. Solubilized outer membranes were then subjected to affinity purification with immobilized bovine Hm or Hb and similar OMP profiles were obtained regardless of the ligand used (Fig.1 lanes 2 to 5). This procedure yielded a major Hm- and Hb-binding OMP of approximately 75 kDa isolated from *A. pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions (Fig.1 lanes 4 and 5) and also under iron-sufficient conditions (Fig.1 lanes 2 and 3). The synthesis of the major 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP was increased under iron-restricted conditions (Fig.1 lanes 4 and 5). Minor Hm- and Hb-binding OMPs with molecular mass of about 47 and 36 kDa (Fig.1 lanes 2 to 5) were also isolated. Hm- and Hb-agarose alone were used as controls (not shown).

Presence of the major or minor Hm- and Hb-binding OMPs in *A. pleuropneumoniae* reference strains representing the twelve serotypes. Solubilized whole cells of *A. pleuropneumoniae* reference strains representing the twelve serotypes grown under iron-restricted conditions were submitted to the Hm- and Hb-agarose affinity purification procedure described under Materials and Methods. The survey of *A. pleuropneumoniae* reference strains revealed that all tested strains, except reference strain of serotypes 3, 6, 7, and 10, synthesized the 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP *in vitro* under iron-restricted conditions (Table 2). The screening also

demonstrated that the *in vitro* ability to express the 47-kDa Hm- and Hb-binding OMP was a conserved trait in all reference strains representing the twelve serotypes (Table 2). The 36-kDa Hm- and Hb-binding OMP was isolated from all the reference strains, except strain 8329/85 of serotype 12.

Detection of Hm- and Hb-binding proteins in culture supernatants.

Proteins in concentrated culture supernatants from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 were also submitted to the affinity purification procedure using Hm- or Hb-agarose to determine whether Hm- and Hb-binding proteins could be secreted in the environment. A soluble Hm- and Hb-binding factor of approximately 70 kDa was detected in the culture supernatant of *A. pleuropneumoniae* (Fig. 2, lanes 2 and 3) which migrated more rapidly than the major 75-kDa Hm- and Hb-binding OMPs (Fig. 2, lanes 4 and 5). A soluble Hm- and Hb-binding factor of approximately 104 kDa was also observed in smaller amount in the supernatant (Fig. 2, lanes 2 and 3).

Labeling of cells with [³H]palmitate. *A. pleuropneumoniae* was metabolically labeled with [³H]-palmitic acid to determine whether the 75-, 47- and 36-kDa Hm- and Hb-binding OMPs were lipoproteins. SDS-PAGE and fluorographic analysis of labeled *A. pleuropneumoniae* grown in the presence (Fig. 3, lane 3) and absence of deferrated EDDHA (Fig. 3, lane 2) indicated that the 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP was not a lipoprotein since no band could be observed between 68 and 97 kDa on the film (Fig. 3, lanes 2 and 3). When *A. pleuropneumoniae* was grown under iron-restricted conditions, three lipoproteins with molecular masses between 68 and 43 kDa and two lipoproteins with lower molecular masses between 43 and 29 kDa were observed (Fig. 3, lane 3). The minor 47- and 36-kDa Hm- and Hb-binding OMPs could be lipoproteins since bands around molecular masses of 47 and 36 kDa were observed on the radiographic film. Four bands below the 29-kDa marker were also observed and some of them might represent the LPS of *A. pleuropneumoniae* since the lipid A-core region of LPS is seen at the bottom of the gel.

Far-Western blot with biotinylated porcine Hb or with DIG-labeled porcine Hb.

Far-Western blot assays were carried out to determine whether OMPs purified by Hm-agarose could bind biotinylated Hb and therefore prove that OMPs purified by Hm-agarose are identical to those purified by Hb-agarose. A positive signal was obtained from the electroblotted 75-kDa Hm- and Hb-binding OMPs incubated with the biotinylated porcine Hb and avidin-horseradish peroxidase conjugate (Fig. 4A,

lanes 2 and 3). However, this reaction was due to nonspecific interaction of this protein with avidin-horseradish peroxidase conjugate (Fig. 4B, lanes 2 and 3) and did not represent specific binding by porcine Hb itself. We therefore performed Far-Western blotting using DIG-labeled porcine Hb, but our attempts to demonstrate direct binding of DIG-labeled porcine Hb by the 75-, 47-, and 36-kDa Hm- and Hb-binding OMPs transferred to nitrocellulose after SDS-PAGE were unsuccessful (data not shown).

N-terminal amino acid sequence determination of the major 75-kDa Hm- and Hb-binding OMPs. In order to determine whether the major 75-kDa OMPs purified by either Hm-agarose or Hb-agarose were identical, these proteins were submitted to N-terminal amino acid sequencing. The 75-kDa OMPs purified by either Hm- or Hb-agarose were separated by SDS-PAGE, electroblotted to a polyvinylidene difluoride membrane and stained with Ponceau. Despite many attempts and different treatments, the N-terminal amino acid sequence could not be determined by standard Edman degradation.

MALDI-TOF analysis of the major 75-kDa Hm- and Hb-binding OMPs. Since the N-terminal amino acid sequence seemed to be blocked, the major 75-kDa OMPs purified by either Hm-agarose or Hb-agarose were excised and digested in-gel with trypsin. Proteolytic fragments were separated on a microbore HPLC column and fractions were collected. Some of them were analysed by mass spectrometry. MALDI-TOF analyses revealed common tryptic peptides between the fractions from the Hb-agarose and Hm-agarose purified OMPs which strongly suggests that these peptides originate from the same protein (Table 3).

DISCUSSION

A. pleuropneumoniae is able to acquire iron from different sources such as porcine transferrin (12-14), exogenous siderophores (9), and Hm or Hb (4, 8). The mechanisms by which *A. pleuropneumoniae* utilize Hm- or Hb-iron sources as well as the protein components involved have so far received little attention. Such systems could serve as important mechanisms for the *in vivo* iron uptake by *A. pleuropneumoniae*. We previously described the binding of porcine Hb to *A. pleuropneumoniae* LPS (1, 4). More recently, using flow cytometry and fluorescein-labeled porcine Hb, we observed that iron-restriction promoted the expression of Hb receptors (2) which led us to suspect that surface proteins could be involved in the iron uptake from porcine Hb.

In the present study we report that all *A. pleuropneumoniae* reference strains were able to use either porcine Hb or porcine Hm. These results confirmed the previously published findings (4, 8) that most strains of *A. pleuropneumoniae* serotypes 1 and 2 could utilize Hm and Hb as a sole source of iron for growth. Interestingly, we observed the presence of a brown pigmentation in colonies growing around the disks containing porcine Hm or Hb. We believe that those brown colonies were caused by accumulation of Hm or Hb at the surface of the cell. In *Porphyromonas gingivalis* black pigmentation of colonies by heme accumulation is thought to be related to virulence (38).

The data presented here report for the first time Hm- and Hb-binding proteins of *A. pleuropneumoniae*. These proteins were affinity-purified with bovine Hm or Hb immobilized on agarose as the ligand. Minor Hm- and Hb-binding OMPs with molecular masses of about 47 and 36 kDa were identified. The survey of *A. pleuropneumoniae* reference strains revealed that all express the 47-kDa Hm- and Hb-binding OMP. The 36-kDa Hm- and Hb-binding OMP was isolated from all the reference strains, except strain 8329/85 of serotype 12. The expression of the 47-kDa Hm- and Hb-binding OMP in all reference strains of *A. pleuropneumoniae* and results of the growth promotion assay allow us to suspect an important role for this protein in the acquisition of heme from Hm and Hb.

Lipoproteins are commonly found in association with bacterial cell membranes (19). An increased number of bacterial lipoproteins have been identified in recent years, and several of them have been shown to possess metabolic and/or binding functions (17, 18, 25). For example, a heme-binding lipoprotein of 51 kDa of *Haemophilus influenzae* was identified (17) and a lipoprotein of 34.8 kDa which has been implicated

in the Hb-haptoglobin-utilization system of *N. meningitidis* was recently isolated (25). We decided therefore to label *A. pleuropneumoniae* lipoproteins. In our metabolic labeling assay with [³H]-palmitic acid, three lipoproteins with molecular masses between 68 and 43 kDa and two lipoproteins with lower molecular masses between 43 and 29 kDa were observed when cells were grown under iron-restricted conditions. The minor Hm- and Hb-binding OMPs could be lipoproteins since bands around molecular masses of 47 and 36 kDa were observed. The 36-kDa Hm- and Hb-binding OMP of *A. pleuropneumoniae* observed in this study might be related to the 40-kDa protective outer membrane lipoprotein (Om1A) from *A. pleuropneumoniae* previously described by Gerlach et al. (12). In addition, the 47-kDa Hm- and Hb-binding OMP of *A. pleuropneumoniae* identified in this study might be related to the AopA protein, a common 48-kDa OMP of *A. pleuropneumoniae* identified by Cruz et al. (7). Four bands below 29 kDa were also observed in this study and we suggest that some of them might be related to the LPS of *A. pleuropneumoniae*.

A major Hm- and Hb-binding OMP of 75 kDa was also identified in *A. pleuropneumoniae* and its expression was increased under iron-restricted conditions. A 76-kDa protein of *A. pleuropneumoniae* identified by Deneer and Potter (8) displayed an ability to bind Congo red and hemin, we suggest that this protein might be related to the major 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP identified in the present study. Interestingly, a TonB-dependent heme receptor of 75 kDa was recently identified in *Haemophilus ducreyi* (40). A survey of *A. pleuropneumoniae* reference strains revealed that all tested strains, except strains of serotypes 3, 6, 7, and 10, synthesized the 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP *in vitro* under iron-restricted conditions. Metabolic labeling with [³H]-palmitic acid of *A. pleuropneumoniae* grown in the presence and absence of EDDHA indicated that the major 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP was not a lipoprotein.

In the Far-Western blot assays, a positive signal was obtained from the electroblotted 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP incubated with the biotinylated porcine Hb and avidin-horseradish peroxidase conjugate. However, this reaction was due to nonspecific interaction of this protein with avidin-horseradish peroxidase conjugate and did not represent specific binding of porcine Hb itself, suggesting the presence of biotin in the 75-kDa Hm- and Hb-binding OMPs. Two biotinylated proteins of approximately 38 and 105 kDa have been described in *Pasteurella multocida* (36). These biotin-containing proteins were responsible for false-positive reactions in colony lift-hybridization assays based upon biotin-avidin detection system. The presence of biotinylated proteins in bacterial genera other than *Pasteurella* that can

interfere with Western blotting have also been described (3, 27). Interestingly, a 75-kDa protein of *A. pleuropneumoniae* described by Gerlach et al. (13) was shown to bind streptavidin-phosphatase alone in a transferrin Western blot-like assay and an avidin-binding protein of 70 kDa was identified in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* SUNY 465 (27). According to our results and to the literature, it is therefore tempting to speculate that the 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP of *A. pleuropneumoniae* described in this study could be analogous to the 75-kDa protein described by Gerlach et al. (13) and is a biotin-containing protein.

In view of the fact that false-positive signals were obtained using biotinylated porcine Hb, we decided to label porcine Hb with digoxigenin and repeat the experiment. No reactions were obtained with the 75-, 47- and 36-kDa Hm- and Hb-binding OMPs in a Far-Western blot using DIG-labeled porcine Hb. Interestingly, Stevens et al. (49) encounter the same problem since all their attempts to demonstrate direct binding of radiolabeled Hb by HupA, the Hb utilization protein A of *H. ducreyi*, transferred to nitrocellulose after SDS-PAGE were unsuccessful. It appears that Hb-binding activity of those microorganisms is lost during denaturation of the samples for SDS-PAGE.

The N-terminal amino acid sequence of the major 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP could not be determined by standard Edman degradation. Therefore, to determine whether the 75-kDa OMPs purified by either Hm-agarose or Hb-agarose were identical, these OMPs were excised and digested in-gel with trypsin. Proteolytic fragments were separated on a microbore HPLC column and fractions collected were analyzed by mass spectrometry. MALDI-TOF analyses revealed common tryptic peptides between fractions from the Hb-agarose- and Hm-agarose-purified OMPs strongly suggesting that these peptides originate from the same protein. A BLAST search of the GenBank database found no significant homologies with other bacterial proteins.

Proteins in concentrated culture supernatants from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 were submitted to the affinity purification procedure using Hm- or Hb-agarose to determine whether extracellular Hm- and Hb-binding proteins were present. A soluble Hm- and Hb-binding factor of approximately 70 kDa was detected in the culture supernatant of *A. pleuropneumoniae*. A soluble factor of approximately 104 kDa was also observed but in smaller amount in the supernatant. Interestingly, Negrete-Abascal et al. (30) have reported that culture supernatants of *A. pleuropneumoniae* displayed protease activities of different molecular weights: > 200, 200, 90, 80, 70, and 50 kDa. These proteases were able to degrade porcine IgA and

porcine, human, and bovine Hb. In addition, they suggested that proteolytic cleavage of Hb could be a mechanism for iron acquisition. The soluble 70-kDa Hm- and Hb-binding protein of *A. pleuropneumoniae* described in this study could be related to the extracellular protease of 70-kDa reported by Negrete-Abascal (30). It has been reported that *Vibrio vulnificus* utilizes different heme proteins as sole source of iron for growth using an extracellular protease and that protease-deficient mutants of *Vibrio vulnificus* could not utilize any heme proteins as iron source (31). In addition, a Hb protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1 was recently characterized and is part of a hemophore-dependent heme acquisition system (33). This protein named Hbp interacts with Hb, degrades it, and subsequently binds the released heme. This may suggest that proteolysis at the proximity of the outer membrane of *A. pleuropneumoniae* could be important for removal of the transported ligand (Hm) from the bound macromolecular ligand (Hb) to allow transport across the outer membrane.

How heme crosses the outer membrane of *A. pleuropneumoniae* is presently not known, although recent studies in *H. ducreyi* and *H. influenzae* have determined that this process is dependent on the activity of the TonB protein (20, 40). So far, only a strong indication of TonB-like polypeptides was seen in *A. pleuropneumoniae* for which proteins of 28 and 40-kDa were detected in the cell lysates by the MAb 4H4, a monoclonal antibody that was generated against gel-purified *E. coli* TonB fusion protein (22). Which of these two proteins represent TonB homolog remains for the moment unclear (22).

A model for Hb and Hm utilization is presented in Fig.5. In this model, extracellular Hm- and Hb-binding proteins identified in this study would catch heme and shuttle it back to specific outer membrane receptors. The finding of hemophore-dependent heme acquisition system in *H. influenzae* (5), *S. marcescens* (24) and *E. coli* strain EB1 (33) supports the existence of such systems in other bacteria. The Hm and Hb receptors identified in this study could then transport Hm into the periplasm by a TonB-dependent mechanism. Once in the periplasm, Hm would be transported into the cytoplasm by a Hm-specific periplasmic-protein dependent system. The finding of the hemin-specific periplasmic uptake system in *Yersinia enterocolitica* (39) supports the existence of such systems in other heme-utilizing microorganisms. In the cytoplasm, iron would be released from the porphyrin ring by the action of a heme oxygenase, an enzyme which cleaves the heme moiety (39).

Because the 75-, 47- and 36-kDa Hm- and Hb-binding OMPs identified in this study are found in outer membrane preparations, they are likely candidates for Hm and Hb receptors. They could conceivably constitute either three independent Hm and Hb

receptors or form only one heme receptor as both previously described for other bacteria (23). It is also tempting to speculate that the soluble Hm- and Hb-binding factors identified in this study might be part of a hemophore-dependent system. Although the specific isolation of these proteins by Hm- and Hb-agarose suggests an implication in a Hm- and Hb-receptor-mediated iron-acquisition process, the precise role of these components awaits definitive experiments with isogenic mutants in the genes coding for these proteins. The pathways by which *A. pleuropneumoniae* utilize Hm- and Hb-iron sources are of interest in an attempt to understand the role of surface molecules in pathogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (OGP0003428 to M.J.) and from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR; 99-ER-0214). M.A. is the recipient of a studentship from FCAR.

REFERENCES

1. **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.
2. **Archambault, M., Rioux, S. and Jacques, M.** 1999. Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**, 17-25.
3. **Au, L.-C., Lu, S.-F., The, G.-W. and Chen, Y.-L.** 1995. Utilization of patterns of biotinyl-polypeptides as a promising analytical target for bacterial identification. *Anal. Biochem.* **226**, 232-234.
4. **Bélanger, M., Bégin, C. and Jacques, M.** 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**, 656-662.
5. **Cope, L.D., Thomas, S.E., Latimer, J.L., Slaughter, C.A., Müller-Eberhard, U. and Hansen, E.J.** 1994. The 100 kDa haem:haemopexin-binding protein of *Haemophilus influenzae*: structure and localization. *Mol. Microbiol.* **13**, 863-873.
6. **Cornelissen, C.N. and Sparling, P.F.** 1994. Iron piracy : acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* **14**, 843-850.
7. **Cruz, W.T., Nedialkov, Y.A., Thacker, B.J. and Mulks, M.H.** 1996. Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**, 83-90.
8. **Deneer, H.G. and Potter, A.A.** 1989. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**, 798-804.
9. **Diarra, M.S., Dolence, J.A., Dolence, E.K., Darwish, I., Miller, M.J., Malouin, F. and Jacques, M.** 1996. Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 853-859.
10. **Elkins, C.** 1995. Identification and purification of a conserved heme-regulated hemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **63**, 1241-1245.

11. **Frangipane, M.E., Morton, D.J., Wooten, J.A., Pozsgay, J.M. and Stull, T.L.** 1994. Binding of human hemoglobin by *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 243-248.
12. **Gerlach, G.-F., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A., Potter, A.A. and Willson, P.J.** 1993. Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OMP1A) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* **61**, 565-572.
13. **Gerlach, G.F., Anderson, C., Potter, A.A., Klashinsky, S. and Willson, P.J.** 1992. Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **60**, 892-898.
14. **Gerlach, G.F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A.A. and Willson, P.J.** 1992. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infect. Immun.* **60**, 3253-3261.
15. **Ghigo, J.M., Létoffé, S. and Wandersman, C.** 1997. A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 3572-3579.
16. **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.
17. **Hanson, M.S. and Hansen, E.J.** 1991. Molecular cloning, partial purification, and characterization of a hemin-binding lipoprotein from *Haemophilus influenzae* type b. *Mol. Microbiol.* **5**, 267-278.
18. **Hayashi, S., Hara, H., Suzuki, H. and Hirota, Y.** 1988. Lipid modification of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 3. *J. Bacteriol.* **170**, 5392-5395.
19. **Ichihara, S., Hussain, M. and Mizushima, S.** 1981. Characterization of a new membrane lipoproteins and their precursors of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**, 3125-3129.
20. **Jarosik, G.P., Sanders, J.D., Cope, L.D., Muller-Eberhard, U. and Hansen, E.J.** 1994. A functional *tonB* gene is required for both utilization of haem and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type B. *Infect. Immun.* **62**, 2470-2477.
21. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.

22. **Larsen, R.A., Myers, P.S., Skare, J.T., Seachord, C.L., Darveau, R.P. and Postle, K.** 1996. Identification of TonB homologs in the family *Enterobacteriaceae* and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes. *J. Bacteriol.* **178**, 1363-1373.
23. **Lee, B.C.** 1995. Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol. Microbiol.* **18**, 383-390.
24. **Létoffé, S., Ghigo, J.M. and Wandersman, C.** 1994. Iron acquisition from heme and hemoglobin by *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9876-9880.
25. **Lewis, L.A., Gray, E., Wang, Y.P., Roe, B.A. and Dyer, D.W.** 1997. Molecular characterization of hpuAB, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **23**, 737-749.
26. **Litwin, C.M. and Calderwood, S.B.** 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 137-149.
27. **Mintz, K.P. and Fives-Taylor, P.M.** 1994. Identification of an immunoglobulin Fc receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **62**, 4500-4505.
28. **Mittal, K.R.** 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* **32**, 135-148.
29. **Mittal, K.R., Bourdon, S. and Higgins, R.** 1998. Évolution de la distribution des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* provenant de porcs malades au Québec. *Méd. Vét. Québec* **28**, 91-92.
30. **Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R., Serrano, J.J., Garcia, C. and de la Garza, M.** 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.* **58**, 83-86.
31. **Nishina, Y., Miyoshi, S., Nagase, A. and Shinoda, S.** 1992. Significant role of an exocellular protease in utilization of heme by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **60**, 2128-2132.
32. **Niven, D.F., Donga, J. and Archibald, F.S.** 1989. Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. *Mol. Microbiol.* **3**, 1083-1089.

33. **Otto, B.R., Van Dooren, S.J.M., Nuijens, J.H., Luirink, J. and Oudega, B.** 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *J. Exp. Med.* **188**, 1091-1103.
34. **Otto, B.R., Verweij-van Vught, J.J. and MacLaren, D.M.** 1992. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 217-233.
35. **Payne, S.M.** 1988. Iron and virulence in the family *Enterobacteriaceae*. *Crit. Rev. Microbiol.* **16**, 81-111.
36. **Register, K.B.** 1998. Biotinylated proteins of *Pasteurellamultocida* and *Pasteurella haemolytica* cause false-positive reactions with biotinylated probes in colony lift-hybridization assays. *Anal. Biochem.* **257**, 230-233.
37. **Salyers, A.A. and Whitt, D.D.** 1994. Virulence factors that promote colonization. In: *Bacterial pathogenesis, a molecular approach*, pp. 30-46, ASM Press, Washington, D.C.
38. **Shah, H.N., Seddon, S.V. and Gharbia, S.E.** 1989. Studies on the virulence properties and metabolism of pleiotropic mutants of *Porphyromonas gingivalis* (*Bacteroides gingivalis*) W50. *Oral Microbiol. Immunol.* **4**, 19-23.
39. **Stojiljkovic, I. and Hantke, K.** 1994. Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **13**, 719-732.
40. **Thomas, C.E., Olsen, B. and Elkins, C.** 1998. Cloning and characterization of *dhA*, a locus encoding a TonB-dependent heme receptor from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **66**, 4254-4262.
41. **Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350-4354.
42. **Weinberg, E.D.** 1984. Iron withholding: Defense against infection and neoplasia. *Physiol. Rev.* **64**, 65-102.
43. **William, K.R., LoPresti, M. and Stone, K.** 1997. Internal protein sequencing of SDS-PAGE separated proteins: Optimization of an in gel digest protocol. In: *Techniques VIII*, pp. 79-90, Academic Press, San Diego.
44. **Williams, K., Hellman, U., Kobayashi, R., Lane, W., Mische, S. and Speicher, D.** 1997. Internal protein sequencing of SDS-PAGE separated proteins: A collaborative ABRF study. In: *Techniques VIII*, pp. 99-109, Academic Press, San Diego.

TABLE 1. Ability of *A. pleuropneumoniae* reference strains representing the twelve serotypes to use Hm and Hb as iron sources in a growth promotion assay.

Reference strain (serotype)	Diameters (in mm) of zone of growth obtained with different iron sources				
	porcine Hb	porcine Hm	bovine Hb	bovine Hm	FeCl ₃
4074 (1)	17	17	15	17	10
4226 (2)	17	15	14	16	11
1421 (3)	15	12	10	15	10
1462 (4)	15	15	16	16	11
K17 (5)	-	17	-	18	10
Femo (6)	18	17	16	16	9
WF.83 (7)	17	13	14	13	10
405 (8)	13	16	12	17	10
13261 (9)	15	15	14	15	10
13039 (10)	13	-	9	-	9
56153 (11)	16	-	13	-	10
8329/85 (12)	15	13	12	14	9

- No bacterial growth

TABLE 2. Presence of Hb- and Hm-binding OMPs in *A. pleuropneumoniae* reference strains representing the twelve serotypes.

Hm- and Hb-binding OMPs (kDa)	Serotypes of <i>A. pleuropneumoniae</i>		
	1, 2, 4, 5, 8, 9, and 11	3, 6, 7, and 10	12
75	+	-	+
47	+	+	+
36	+	+	-

TABLE 3. Common tryptic peptides between the 75-kDa OMPs purified by either Hb-agarose or Hm-agarose obtained by Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight (MALDI-TOF).

Mass of common tryptic peptides (Da)	Sequence (Edman)
1077.4	LVEVGF EWK
1079.4	_*
1213.4	XXVFHLLGTDK
1322.4	YDYYDLNDK
1471.6	[AL]LLASANTXXXR
1836.6	XXXDVDGGSVSXXXR

*May not be a peptide

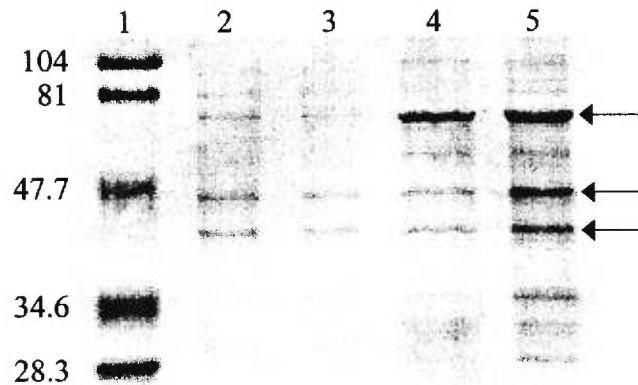


Figure 1. Identification of Hm- and Hb-binding OMPs of *A. pleuropneumoniae* using affinity chromatography. A SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue is shown. Molecular mass markers in kDa (lane 1); Hb-agarose (lane 2) or Hm-agarose (lane 3) affinity-purified OMPs from *A. pleuropneumoniae* grown under iron-sufficient conditions; Hb-agarose (lane 4) or Hm-agarose (lane 5) affinity-purified OMPs from *A. pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions. Arrows indicate the position of the 75-, 47- and 36-kDa Hm- and Hb-binding OMPs.

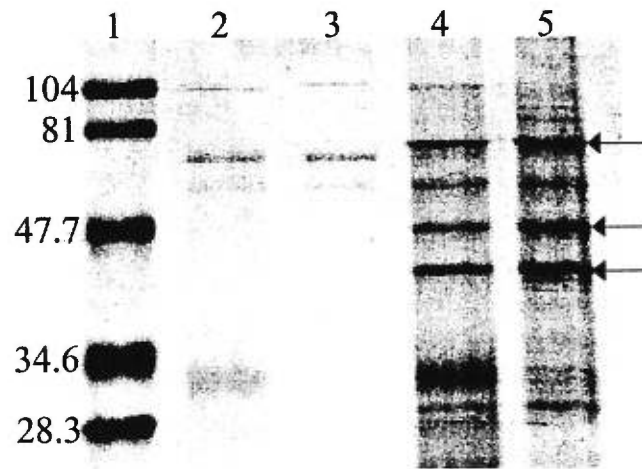


Figure 2. Detection of Hm- and Hb-binding proteins in culture supernatants. A SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue is shown. Molecular mass markers in kDa (lane 1). Proteins located in concentrated culture supernatants of *A. pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions and purified by affinity with Hb-agarose (lane 2) or with Hm-agarose (lane 3). OMPs from *A. pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions and affinity purified by Hb-agarose (lane 4) or Hm-agarose (lane 5). Arrows indicate the position of the 75-, 47- and 36-kDa Hm- and Hb-binding OMPs.

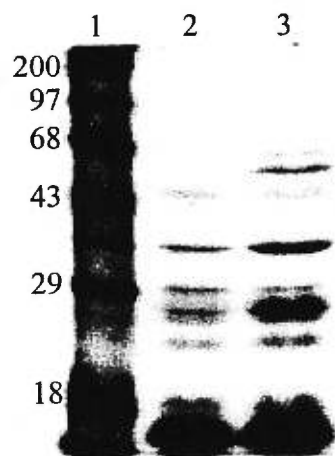


Figure 3. Labeling of *A. pleuropneumoniae* with [³H]palmitate. Fluorographic analysis of *A. pleuropneumoniae* metabolically labeled with [³H]palmitic acid. Molecular mass markers in kDa (lane 1); *A. pleuropneumoniae* grown under iron-sufficient conditions (lane 2) or iron-restricted conditions (lane 3).

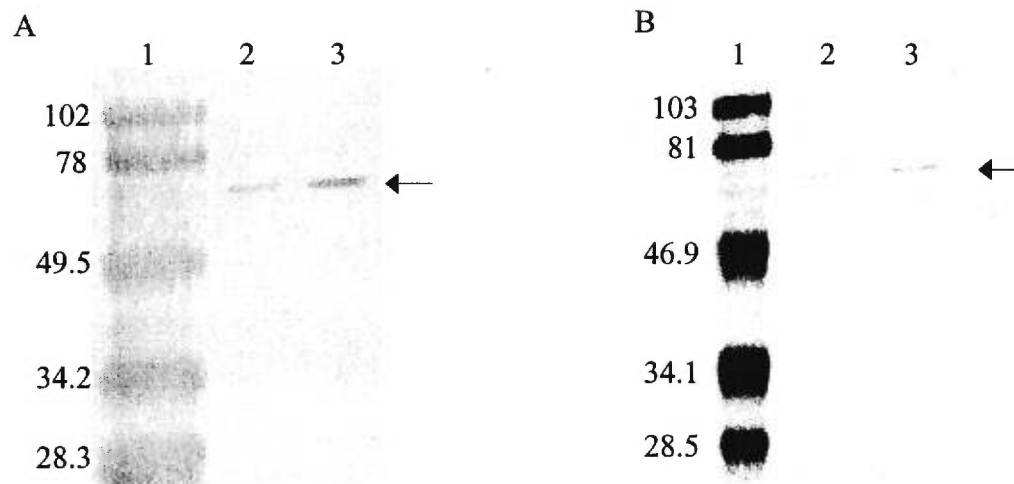


Figure 4. Far-Western blot with biotinylated porcine Hb and avidin-horseradish peroxidase conjugate. Hm- and Hb-binding OMPs were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and incubated with biotinylated porcine Hb and an avidin-horseradish peroxidase conjugate (A) or directly with avidin-horseradish peroxidase conjugate as control (B). Molecular mass markers in kDa (lane 1); OMPs from *A. pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions and affinity-purified by Hb-agarose (lane 2) or Hm-agarose (lane 3). The arrow indicates the position of the 75-kDa Hm- and Hb-binding OMP.

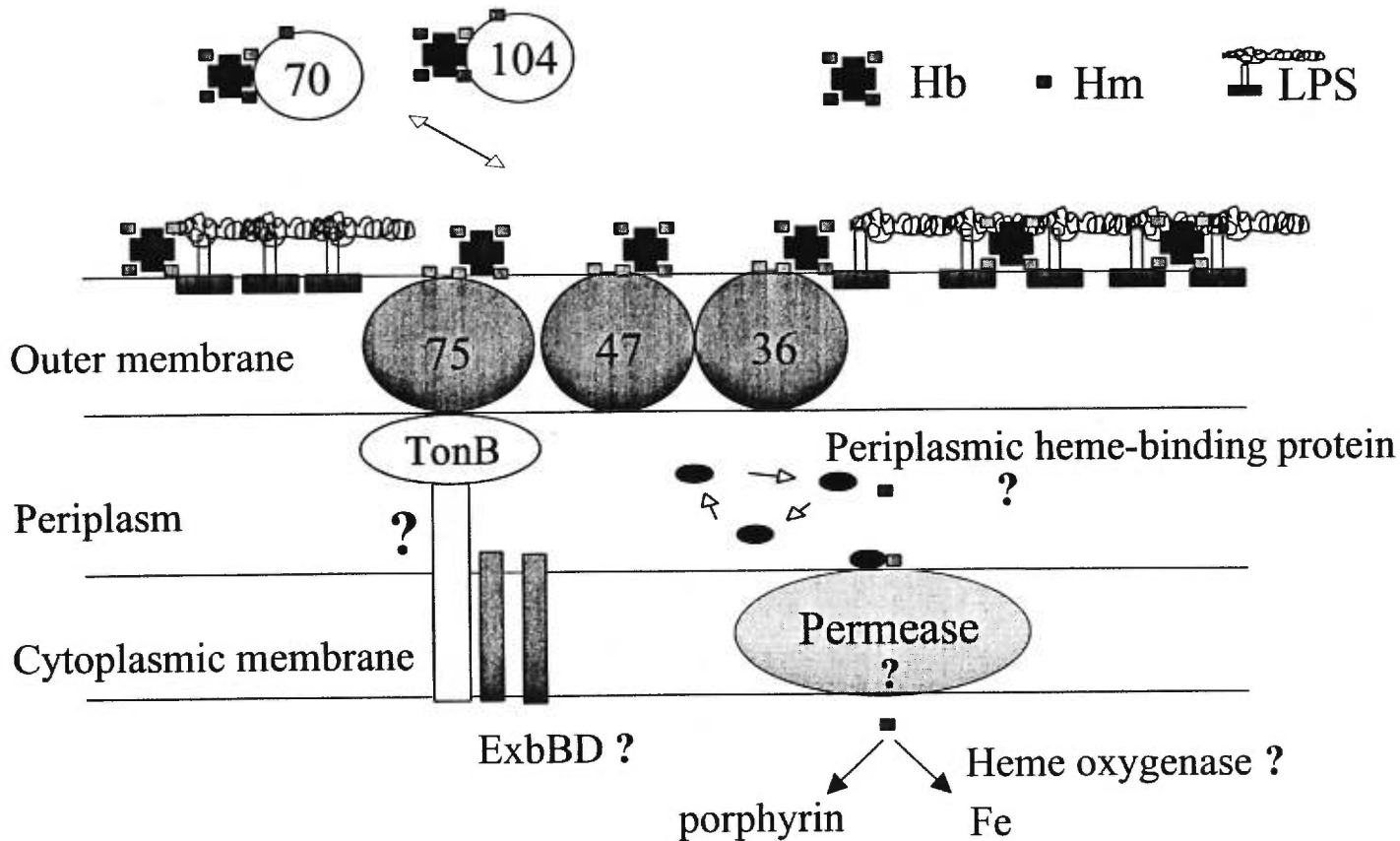


Figure 5. A hypothetical model for the utilization of Hb and/or Hm by *A. pleuropneumoniae*. Extracellular Hm- and Hb-binding proteins would catch heme and shuttle it back to specific outer membrane receptors. Hm and/or Hb-bound Hm would be internalized into the periplasm through the outer membrane receptors by the action of TonB-ExbBD machinery. Hm would be transported into the cytoplasm by the action of the Hm-specific protein-dependent uptake system which involves periplasmic Hm-binding protein, cytoplasmic membrane permease and ATPase. Iron would be released from the porphyrin ring by the action of cytoplasmically located heme oxygenase. Periplasmic and cytoplasmic components of the *A. pleuropneumoniae* Hm and Hb utilization system are not yet identified.

IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

La liaison de l'hémoglobine porcine au LPS d'*A. pleuropneumoniae* a été récemment démontrée (7). Il a également été mis en évidence que certaines souches des sérotypes 1 et 2 d'*A. pleuropneumoniae* pouvaient utiliser l'hémoglobine comme seule source de fer pour sa croissance (7). La liaison entre le LPS et l'hémine ou l'hémoglobine a été également rapportée chez d'autres bactéries (73, 74, 103, 104, 175, 176). De plus, des protéines liant l'hème, l'hémine ou l'hémoglobine ont été mises en évidence chez différentes bactéries (120). Nous avons alors émis l'hypothèse qu'il existe un système de récepteurs constitué de LPS et de protéines à la surface d'*A. pleuropneumoniae* qui serait impliqué dans la liaison de l'hémoglobine porcine.

L'objectif du présent travail était donc de caractériser les molécules impliquées dans la liaison de l'hémoglobine porcine chez *A. pleuropneumoniae*. Nous avons étudié en détail l'effet de la liaison de l'hémoglobine porcine sur les propriétés biologiques et physiques du LPS d'*A. pleuropneumoniae*. Nous avons alors observé la liaison de l'hémoglobine porcine à la surface de la cellule entière d'*A. pleuropneumoniae*. Nous avons également déterminé que cette liaison ne modifiait pas l'accessibilité des anticorps aux antigènes de surface O et K. Nous avons précédemment démontré que des résidus de lipide A sont accessibles à la surface d'*A. pleuropneumoniae*, principalement autour des vésicules de la membrane externe de la bactérie (7). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'hémoglobine n'interfère pas avec l'accessibilité des anticorps aux antigènes de surface O et K.

Nous avons confirmé dans cette étude le précédent résultat à savoir que la liaison de l'hémoglobine porcine est attribuable au lipide A de la molécule de LPS. La liaison du lipide A à l'hémoglobine ou à l'hémine a été rapportée chez *Porphyromonas gingivalis* et chez certaines entérobactéries (73, 176). Des chercheurs ont démontré que le LPS d'*Actinobacillus actinomycetemcomitans* pouvait lier l'hémoglobine humaine (74) mais cette interaction ne semblait pas impliquer la région du lipide A de la molécule de LPS. Nos analyses ont également mis en évidence que l'hémoglobine porcine fragmentait le LPS et diminuait ainsi sa vélocité de sédimentation sur un gradient de sucrose. Ces résultats ont été rapportés pour l'hémoglobine humaine et le LPS d'entérobactéries (103, 173, 175, 176).

Nous avons ensuite déterminé que l'hémoglobine diminuait l'activité biologique du LPS et qu'elle réduisait également son habileté à stimuler la production d'oxide nitrique par les macrophages murins. Par contre, la liaison de l'hémoglobine humaine a

été associée à une augmentation de l'activité biologique du LPS de certaines entérobactéries (103, 104, 175, 176). Ces derniers résultats sont contradictoires à ceux que nous avons obtenu et pourraient possiblement s'expliquer par le fait que la composition du lipide A diffère parmi les bactéries à Gram négatif (107) et que le test LAL et la méthode d'extraction du LPS étaient différents. En effet, le type d'hexosamine, le degré de phosphorylation, et la longueur des chaînes d'acides gras diffèrent entre le lipide A de différentes familles bactériennes (107). Le LPS peut être purifié par différentes méthodes et il peut même être acheté commercialement (31). De plus, certains chercheurs produisent leur test LAL alors que d'autres utilisent un test LAL commercial. Étant donné que nos résultats ne concordaient pas avec ceux existant dans la littérature nous avons effectué notre test LAL avec de l'hémoglobine humaine et du LPS d'entérobactéries. Dans notre essai, l'hémoglobine humaine a diminué l'activité biologique du LPS des entérobactéries. Nous pensons que le test LAL et les réactifs utilisés seraient responsables, du moins en partie, des résultats différents obtenus par les deux groupes de recherche. Il est intéressant de noter que la liaison du fer au LPS a entraîné une diminution de l'activité biologique du LPS et une diminution de stimulation de l'activité procoagulante des cellules endothéliales (180). De plus, il a été rapporté que le LPS pré-incubé en présence de fer était moins létal *in vivo* (97, 162).

Notre étude nous a permis d'élaborer une méthodologie en cytométrie en flux permettant de quantifier la liaison de l'hémoglobine porcine à la surface d'*A. pleuropneumoniae*. Nous avons quantifié l'activité liant l'hémoglobine chez des souches représentatives d'*A. pleuropneumoniae* appartenant aux sérotypes 1 et 2. Nous nous sommes alors demandé le rôle que pouvait jouer les polysaccharides de surface dans l'activité liant l'hémoglobine. Des mutants isogéniques LPS et un mutant acapsulé d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 ont été testés par cytométrie en flux. L'activité liant l'hémoglobine des mutants LPS analysés dans cette étude était semblable à celle de la souche mère. Ces résultats semblent indiquer que les mutations dans la région du noyau oligosaccharidique ou de l'antigène O n'affecte pas ou peu l'activité liant l'hémoglobine qui implique d'ailleurs le lipide A. Les expériences menées avec le mutant acapsulé ont indiqué que les molécules de surface possédant une activité liant l'hémoglobine étaient plus exposées à la surface cellulaire en absence du polysaccharide capsulaire. Le matériel capsulaire semble donc masquer des composantes importantes de la membrane externe qui sont impliquées dans l'activité liant l'hémoglobine.

Nous avons de plus démontré que la restriction en fer augmentait l'expression des récepteurs d'hémoglobine. Ces résultats impliquent que l'activité liant l'hémoglobine est, du moins en partie, répressible par le fer. Ces données nous indiquaient que des protéines de la membrane externe (OMPs) régulées par le fer pouvaient possiblement être impliquées dans l'activité liant l'hémoglobine. C'est d'ailleurs pourquoi le profil des protéines de la membrane externe d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 obtenu dans des conditions de croissance suffisantes ou restreintes en fer a été évalué sur gel de polyacrylamide. Plusieurs OMPs régulées par le fer ont été observées suggérant qu'une ou plusieurs de ces OMPs pourraient jouer un rôle dans l'activité liant l'hémoglobine détectée par cytométrie en flux. Des OMPs régulées par le fer chez *A. pleuropneumoniae* ont déjà été rapportées par d'autres chercheurs (34, 64, 67, 152).

Nous voulions ensuite déterminer l'habileté des souches de référence représentant les 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* à utiliser différentes sources de fer pour leur croissance. Toutes les souches ont utilisé soit l'hémoglobine et/ou l'hémine porcine indiquant ainsi qu'un système d'acquisition du fer provenant de l'hémoglobine et/ou de l'hémine est présent chez toutes ces souches. Cette acquisition ne semble pas spécifique d'espèce étant donné que les souches d'*A. pleuropneumoniae* ont utilisé également l'hémoglobine ou l'hémine bovine comme seule source de fer pour croître. L'utilisation de l'hémine ou de l'hémoglobine comme source de fer pour la croissance avait déjà été rapportée chez des isolats des sérotypes 1 et 2 (7, 34). Étant donné que toutes les souches ont réussi à utiliser soit l'hémoglobine et/ou l'hémine porcine et que tous les isolats testés en cytométrie en flux étaient capables de lier l'hémoglobine à leur surface et que, de plus, cette activité liant l'hémoglobine était en partie répressible par le fer, nous avons alors pensé qu'après la liaison de l'hémoglobine aux LPS, d'autres molécules, dont possiblement des protéines de la membrane externe, pouvaient être impliquées dans l'acquisition du fer. Plusieurs protéines de la membrane externe dont la fonction serait de permettre l'acquisition du fer provenant des composés hème ont été récemment décrites chez différentes bactéries (120).

Afin d'identifier des récepteurs protéiques impliqués dans la liaison à l'hémine et/ou à l'hémoglobine porcine, nous avons utilisé la chromatographie d'affinité où les protéines bactériennes étaient immobilisées à l'aide d'hémine- ou d'hémoglobine-agarose. En utilisant cette procédure une OMP majeure de 75 kDa liant l'hémine et

l'hémoglobine a été isolée chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 souche 4074 après croissance dans des conditions de restriction en fer. Des OMPs mineures de 47 et 36 kDa liant l'hémine ou l'hémoglobine ont été également identifiées. Une étude portant sur les souches de référence des 12 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* après croissance dans des conditions de restrictions en fer a révélé que toutes les souches synthétisaient au moins une de ces OMPs liant l'hémine et l'hémoglobine. Nous avons également identifié une protéine extracellulaire de 70 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine chez *A. pleuropneumoniae*.

Les OMPs majeures de 75 kDa purifiées par hémine-agarose ou hémoglobine-agarose ont été analysées par un spectromètre de masse couplé à un HPLC et à un séquenceur Edman. Ces analyses ont révélé des peptides communs entre l'OMP purifiée par hémine-agarose et l'OMP purifiée par hémoglobine-agarose. Ces résultats suggèrent fortement que ces peptides proviendraient de la même OMP. Malgré plusieurs essais, il n'a pas été possible de déterminer la séquence N-terminale en acides aminés de l'OMP majeure de 75 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'OMP majeure de 75 kDa et les OMPs mineures de 36 et 47 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine chez *A. pleuropneumoniae* pourraient être impliquées dans le système d'acquisition en fer provenant de l'hémine ou de l'hémoglobine porcine. L'accumulation de l'hémoglobine à la surface de la cellule bactérienne via son LPS pourrait agir comme un réservoir externe de storage de cette molécule. On peut également supposer que la liaison d'une molécule de l'hôte (l'hémoglobine) à la surface bactérienne pourrait être un mécanisme permettant à la bactérie d'échapper au système immunitaire. Il existe différents mécanismes bactériens permettant d'échapper au système immunitaire. L'un d'entre eux est le recouvrement de molécules de l'hôte à la surface de la bactérie. En se recouvrant d'hémoglobine, *A. pleuropneumoniae* pourrait cacher ses antigènes de surface et alors échapper au système de reconnaissance de l'hôte. Les macrophages, et autres cellules présentatrices d'antigènes, ne pourraient donc pas reconnaître cet élément étranger de sorte que la présentation de l'antigène au système immunitaire ne serait pas effectuée. Cette étape de reconnaissance et de présentation de l'antigène est essentielle à l'initiation de la réponse immune (182).

Le fer libre chez l'hôte se retrouve à des niveaux en-dessous de ceux requis pour supporter la croissance microbienne (18, 222). Afin de survivre chez l'hôte, les

bactéries pathogènes ont développé différents mécanismes de haute affinité pour acquérir le fer (182). Un de ces systèmes consiste en l'élaboration de protéines de surface permettant d'acquérir le fer provenant directement de l'hème, de l'hémine ou de l'hémoglobine (120). Un autre système dénommé hémophile-dépendant consiste en la sécrétion de protéines bactériennes capables de lier les molécules d'hème ou d'hémoglobine de l'environnement et de les transporter ensuite aux récepteurs bactériens de surface liant l'hème ou l'hémoglobine (66). Pendant l'infection, les cellules d'*A. pleuropneumoniae* produisent des exotoxines. Deux de ces toxines sont connues pour avoir une activité hémolytique, ce qui provoque un relâchement de l'hémoglobine des globules rouges. *A. pleuropneumoniae* pourrait alors acquérir le fer *in vivo* en liant l'hémoglobine disponible à son LPS puis à ses protéines liant l'hémine ou l'hémoglobine. Nous ne savons pas pour l'instant si ce double système de liaison à l'hémoglobine fonctionne dépendamment ou indépendamment l'un de l'autre. Leur rôle semble par contre complémentaire en ce sens que la liaison de l'hémoglobine porcine au LPS représente selon nous une étape de liaison permettant l'accumulation de l'hémoglobine porcine à la surface du micro-organisme. L'OMP majeure et les OMPs mineures liant l'hémine et l'hémoglobine identifiées dans ce travail seraient quant à elles impliquées dans l'acquisition du fer provenant de l'hémoglobine porcine. Nous avons également identifié une protéine extracellulaire de 70 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine chez *A. pleuropneumoniae*, ce qui suggère l'existence d'un système hémophile-dépendant chez ce micro-organisme. Les études recueillies dans cette thèse démontrent pour la première fois qu'*A. pleuropneumoniae* possède des récepteurs protéiques liant l'hémine et l'hémoglobine. Des travaux supplémentaires sont requis afin d'identifier les autres protéines impliquées dans l'internalisation subséquente du fer ainsi que dans son transport du périplasme au cytoplasme.

V. CONCLUSION GÉNÉRALE

Les travaux décrits dans cette thèse ont permis d'augmenter nos connaissances sur les molécules impliquées dans la liaison de l'hémoglobine porcine chez *A. pleuropneumoniae*. Nous avons tout d'abord décrit les effets de la liaison de l'hémoglobine porcine sur les propriétés biologiques et physiques du LPS d'*A. pleuropneumoniae*. Les effets de l'hémoglobine porcine sur le LPS d'*A. pleuropneumoniae* n'avaient d'ailleurs jamais été rapportés.

Lors de cette étude, nous avons élaboré une méthodologie nous permettant de quantifier la liaison de l'hémoglobine porcine à la surface d'*A. pleuropneumoniae*. Nous avons démontré que la restriction en fer augmentait l'expression des récepteurs d'hémoglobine impliquant ainsi que l'activité liant l'hémoglobine était, en partie, répressible par le fer. Cette méthodologie pourrait être avantageusement utilisée pour déterminer l'activité liant l'hémoglobine chez d'autres micro-organismes.

Au cours du présent travail, nous avons également démontré pour la première fois qu'*A. pleuropneumoniae* exprime des protéines liant l'hémine et l'hémoglobine. En utilisant une procédure de purification par affinité à l'aide d'hémine-agarose ou d'hémoglobine-agarose, une OMP majeure de 75 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine a été isolée chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 souche 4074 après croissance dans des conditions de restriction en fer. Des OMPs mineures de 47 et 36 kDa liant l'hémine ou l'hémoglobine ont été également identifiées. L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'OMP majeure de 75 kDa et les OMPs mineures de 36 et 47 kDa liant l'hémine et l'hémoglobine chez *A. pleuropneumoniae* pourraient être impliquées dans le système d'acquisition en fer provenant de l'hémine ou de l'hémoglobine porcine.

Ces travaux ouvrent la voie à de futures recherches sur le système d'acquisition du fer provenant de l'hémoglobine chez *A. pleuropneumoniae*. La mutation, par transposition ou échange allélique, de chacune de ces protéines liant l'hémine et l'hémoglobine serait une approche permettant de déterminer leur rôle dans l'acquisition du fer.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. **Adhikari, P., Kirby, S.D., Nowalk, A.J., Veraldi, K.L., Schryvers, A.B. and Mietzner, T.A.** 1995. Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport operon. *J. Biol. Chem.* **270**, 25142-25149.
2. **Altman, E., Griffith, D.W. and Perry, M.B.** 1990. Structural studies of the O-chains of the lipopolysaccharide produced by strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Cell. Biol.* **68**, 1268-1271.
3. **Amano, A., Kuboniwa, M., Kataoka, K., Tazaki, K., Inoshita, E., Nagata, H., Tamagawa, H. and Shizukuishi, S.** 1995. Binding of hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**, 63-67.
4. **Appelmelk, B.J., An, Y.Q., Geerts, M., Thijs, B.G., de Boer, H.A., MacLaren, D.M., de Graaff, J. and Nuijens, J.H.** 1994. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun.* **62**, 2628-2632.
5. **Bada Alamedji, R. and Dubreuil, J.D.** 1993. Comparaison de deux antigènes de nature polysaccharidique pour le diagnostic sérologique par ELISA de la pleuropneumonie porcine (sérotipe 5). *J. Vet. Med.* **B40**, 253-260.
6. **Baig, B., Wachsmuth, I.K. and Morris, G.K.** 1986. Utilization of exogenous siderophores by *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 431.
7. **Bélangier, M., Bégin, C. and Jacques, M.** 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**, 656-662.
8. **Bélangier, 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.
9. **Benyon, L.M., Griffith, D.W., Richards, J.C. and Perry, M.B.** 1992. Characterization of the lipopolysaccharide O antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 9, 11 and 1. *J. Bacteriol.* **174**, 5324-5331.
10. **Berish, S.A., Subbarao, S., Chen, C.Y., Tress, D.L. and Morse, S.A.** 1993. Identification and cloning of a fur homolog from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **61**, 4599-4606.
11. **Bertram, T.A.** 1988. Pathobiology of acute pulmonary lesions in swine infected with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* **29**, 574-577.
12. **Blanchard, P.C., Walker, R.L. and Gardner, I.** 1993. Pleuropneumonia in swine associated with a urease-negative variant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**, 279-282.
13. **Bossé, J.T. and MacInnes, J.I.** 1997. Genetic and biochemical analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease. *Infect. Immun.* **65**, 4389-4394.

14. **Bramanti, T.E. and Holt, S.C.** 1992. Effect of porphyrins and host iron transport proteins on outer membrane protein expression in *Porphyromonas gingivalis*: identification of a novel 26 kDa hemin-repressible surface protein. *Microb. Pathogen.* **13**, 61-73.
15. **Bramanti, T.E. and Holt, S.C.** 1993. Hemin uptake in *Porphyromonas gingivalis*: OMP26 is a hemin-binding surface protein. *J. Bacteriol.* **175**, 7413-7420.
16. **Brown, S.B., Shillock, M. and Jones, P.** 1976. Equilibrium and kinetic studies on the aggregation of porphyrins in aqueous solution. *Biochem. J.* **153**, 279-285.
17. **Bullen, J.J.** 1981. The significance of iron in infection. *Rev. Infec. Dis.* **3**, 1127-1138.
18. **Byers, B.R.** 1987. Pathogenic iron acquisition. *Life Chem. Rep.* **4**, 143-159.
19. **Byrd, W. and Kadis, S.** 1989. Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect. Immun.* **57**, 3901-3906.
20. **Chen, C.J., Elkins, C. and Sparling, P.F.** 1998. Phase variation of hemoglobin utilization in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **66**, 987-993.
21. **Chen, C.J., Sparling, F., Lewis, L.A., Dyer, D.W. and Elkins, C.** 1996. Identification and purification of a hemoglobin-binding outer membrane protein from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **64**, 5008-5014.
22. **Coote, J.G.** 1992. Structural and functional relationships among RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **88**, 137-162.
23. **Cope, L.D., Thomas, S.E., Latimer, J.L., Slaughter, C.A., Müller-Eberhard, U. and Hansen, E.J.** 1994. The 100 kDa haem:haemopexin-binding protein of *Haemophilus influenzae*: structure and localization. *Mol. Microbiol.* **13**, 863-873.
24. **Cope, L.D., Yogev, R., Muller-Eberhard, U. and Hansen, E.J.** 1995. A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemopexin by *Haemophilus influenzae* type b. *J. Bacteriol.* **177**, 2644-2653.
25. **Cornelissen, C.N. and Sparling, P.F.** 1994. Iron piracy : acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* **14**, 843-850.
26. **Coulton, J.W. and Pang, J.C.S.** 1983. Transport of hemin by *Haemophilus influenzae* type b. *Curr. Microbiol.* **9**, 93-98.
27. **Cruijsen, T.L., Van, L.L., Dekker, N.T., Schoevers, E.J. and Verheijden, J.H.** 1992. Phagocytosis and killing of *Actinobacillus*

pleuropneumoniae by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect. Immun.* **60**, 4867-71.

28. **Cruz, W.T., Nedialkov, Y.A., Thacker, B.J. and Mulks, M.H.** 1996. Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**, 83-90.
29. **Cullen, J.M. and Rycroft, A.N.** 1994. Phagocytosis by pig alveolar macrophages of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 mutant strains defective in haemolysin II (ApxII) and pleurotoxin (ApxIII). *Microbiology* **140**, 237-244.
30. **Dajani, A.S., Asmar, B.I. and Thirumoorthi, M.C.** 1979. Systemic *Haemophilus influenzae* disease: an overview. *J. Pediatr.* **94**, 355-364.
31. **Darveau, R.P. and Hancock, E.W.** 1983. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J. Bacteriol.* **155**, 831-838.
32. **Daskaleros, P.A., Stoebner, J.A. and Payne, S.M.** 1991. Iron uptake in *Plesiomonas shigelloides*: cloning of the genes for the heme-iron uptake system. *Infect. Immun.* **59**, 2706-2711.
33. **Delepelaire, P. and Wandersman, C.** 1998. The SecB chaperone is involved in the secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein through an ABC transporter. *EMBO J* **17**, 936-944.
34. **Deneer, H.G. and Potter, A.A.** 1989. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**, 798-804.
35. **Devenish, J., Rosendal, S. and Boss, J.T.** 1990. Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kDa hemolysin in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **58**, 3829-3832.
36. **Diarra, M.S., Dolence, J.A., Dolence, E.K., Darwish, I., Miller, M.J., Malouin, F. and Jacques, M.** 1996. Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 853-859.
37. **Dom, P. and Haesebrouck, F.** 1992. Comparative virulence of NAD-dependent and NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *J. Vet. Med.* **B39**, 303-306.
38. **Dunten, P. and Mowbray, S.L.** 1995. Modeling of the structure of the *Haemophilus influenzae* heme-binding protein suggests a mode of heme interaction. *Protein Science* **4**, 2335-2340.
39. **Elkins, C.** 1995. Identification and purification of a conserved heme-regulated hemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **63**, 1241-1245.

40. **Elkins, C., Chen, C.J. and Thomas, C.E.** 1995. Characterization of the HgbA locus encoding a hemoglobin receptor from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **63**, 2194-200.
41. **Fedorka-Cray, P.J., Anderson, G.A., Cray, W.C., Gray, J.T. and Breisch, S.A.** 1993. *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Part 1. History, epidemiology, serotyping, and treatment. *Compend. Contin. Edu. Pract. Vet.* **15**, 1447-1455.
42. **Fedorka-Cray, P.J., Huether, M.J., Stine, D.L. and Anderson, G.A.** 1990. Efficacy of a cell extract from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 1 against disease in swine. *Infect. Immun.* **58**, 358-365.
43. **Fenwick, B.W.** 1990. Virulence attributes of the lipopolysaccharides of the HAP group organisms. *Can. J. Vet. Res.* **54**, 528-532.
44. **Fenwick, B.W. and Osburn, B.I.** 1986. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect. Immun.* **54**, 575-582.
45. **Fenwick, B.W., Osburn, B.I. and Olander, H.J.** 1986. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 1433-1441.
46. **Feola, M., Simoni, J., Canizaro, P.C., Tran, R. and Raschbaum, G.** 1988. Toxicity of polymerized hemoglobin solutions. *Surg. Gynecol. Obstet.* **166**, 211-.
47. **Finkelstein, R.A., Sciortino, C.V. and McIntosh, M.A.** 1983. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infec. Dis.* **5**, S759-S777.
48. **Fouz, B., Mazoy, R., Vazquez, F., Lemos, M.L. and Amaro, C.** 1997. Isolation of a hemin and hemoglobin binding outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serogroup E). *FEMS Microbiol. Lett.* **156**, 187-191.
49. **Frangipane, M.E., Morton, D.J., Wooten, J.A., Pozsgay, J.M. and Stull, T.L.** 1994. Binding of human hemoglobin by *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 243-248.
50. **Frey, J., Beck, M., Stucki, U. and Nicolet, J.** 1993. Analysis of hemolysins operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* **123**, 51-58.
51. **Frey, J., Beck, M., Vandenbosch, J.F., Segers, R.P.A.M. and Nicolet, J.** 1995. Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Mol. and Cell Probes* **9**, 277-282.
52. **Frey, J., Bosse, J.T., Chang, Y.F., Cullen, J.M., Fenwick, B., Gerlach, G.F., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T.J., Jansen, R. and et, a.l.** 1993. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-

toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.* 1723-1728.

53. **Frey, J., Kuhn, R., MacInnes, J. and Nicolet, J.** 1997. Characterization of a novel RTX determinant in *Actinobacillus pleuropneumoniae* which is not expressed under culture conditions. In: Abstracts of the eighth European workshop conference on bacterial protein toxins, Kloster Banz, Staffelstein, Allemagne, p. (Abstr.)
54. **Frey, J., Kuhnert, P., Villiger, L. and Nicolet, J.** 1996. Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of pal lipoproteins. *Research in Microbiology* **147**, 351-361.
55. **Frey, J. and Nicolet, J.** 1991. Immunological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin 1. *Vet. Microbiol.* **28**, 61-73.
56. **Frey, J. and Nicolet, J.** 1988. Purification and partial characterization of a hemolysin produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* type strain 4074. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**, 41-46.
57. **Frey, J., Van Den Bosh, H., Segers, R. and Nicolet, J.** 1992. Identification of a second hemolysin (HlyII) in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**, 1671-1676.
58. **Fujimura, S., Shibata, Y., Hirai, K. and Nakamura, T.** 1996. Binding of hemoglobin to the envelope of *Porphyromonas gingivalis* and isolation of the hemoglobin-binding protein. *Infect. Immun.* **64**, 2339-2342.
59. **Gagne, A., Lacouture, S., Broes, A., D'Allaire, S. and Gottschalk, M.** 1998. Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 251-4.
60. **Galbraith, R.A. and McElrath, M.J.** 1988. Heme binding to *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **29**, 47-54.
61. **Galbraith, R.A., Sassa, S. and Kappas, A.** 1985. Heme binding to murine erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* **260**, 12198-12202.
62. **Genco, C.A., Odusanya, B.M. and Brown, G.** 1994. Binding and accumulation of hemin in *Porphyromonas gingivalis* are induced by hemin. *Infect. Immun.* **62**, 2885-2892.
63. **Gerlach, G.-F., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A., Potter, A.A. and Willson, P.J.** 1993. Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OMP1A) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* **61**, 565-572.
64. **Gerlach, G.F., Anderson, C., Potter, A.A., Klashinsky, S. and Willson, P.J.** 1992. Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **60**, 892-898.

65. **Gerlach, G.F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A.A. and Willson, P.J.** 1992. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infect. Immun.* **60**, 3253-3261.
66. **Ghigo, J.M., Létoffé, S. and Wandersman, C.** 1997. A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 3572-3579.
67. **Gonzalez, G.C., Caamano, D.L. and Schryvers, A.B.** 1990. Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **4**, 1173-1179.
68. **Gonzalez, G.C., Yu, R.H., Rosteck, P.R. and Schryvers, A.B.** 1995. Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. *Microbiology* **141**, 2405-2416.
69. **Gottschalk, M., Altman, E., Charland, N., Delasalle, F. and Dubreuil, J.D.** 1994. Evaluation of a saline boiled extract, capsular polysaccharides and long-chain lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 as antigens for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* **42**, 91-104.
70. **Gottschalk, M., Altman, E., Lacouture, S., Delasalle, F. and Dubreuil, J.D.** 1997. Serodiagnosis of swine pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 7 and 4 using long-chain lipopolysaccharides. *Can. J. Vet. Res.* **61**, 62-65.
71. **Gottschalk, M., Delasalle, F., Radacovici, S. and Dubreuil, J.D.** 1994. Evaluation of long chain lipopolysaccharides (lc-lps) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* **38**, 315-327.
72. **Grasbeck, R., Kouvonen, I., Lundberg, M. and Tenhunen, R.** 1979. An intestinal receptor for heme. *Scand. J. Hematol.* **23**, 5-9.
73. **Grenier, D.** 1991. Hemin-binding property of *Porphyromonas gingivalis* outer membranes. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 45-50.
74. **Grenier, D., Leduc, A. and Mayrand, D.** 1997. Interaction between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharides and human hemoglobin. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**, 77-81.
75. **Griffiths, E., Cortes, A., Gilbert, N., Stevenson, P., MacDonald, S. and Pepper, D.** 1995. Haemoglobin-based blood substitutes and sepsis. *Lancet* **345**, 158-160.
76. **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.
77. **Haga, Y., Ogino, S., Ohashi, S., Ajito, T., Hashimoto, K. and Sawada, T.** 1997. Protective efficacy of an affinity-purified hemolysin

- vaccine against experimental swine pleuropneumonia. J. Vet. Med. Sci. **59**, 115-120.
78. **Hanson, M.S. and Hansen, E.J.** 1991. Molecular cloning, partial purification, and characterization of a heme-binding lipoprotein from *Haemophilus influenzae* type b. Mol. Microbiol. **5**, 267-278.
79. **Hanson, M.S., Pelzel, S.E., Latimer, J.L., Muller-Eberhard, U. and Hansen, E.J.** 1992. Identification of a genetic locus of *Haemophilus influenzae* type b necessary for the binding and utilization of haem bound to human haemopexin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 1973-1977.
80. **Hanson, M.S., Slaughter, C. and Hansen, E.J.** 1992b. The HbpA gene of *Haemophilus influenzae* type b encodes a heme-binding lipoprotein conserved among heme-dependent *Haemophilus* species. Infect. Immun. **60**, 2257-2266.
81. **Hau, T., Hoffman, R. and Simmons, R.L.** 1978. Mechanisms of the adjuvant effect of hemoglobin in experimental peritonitis. I. In vivo inhibition of peritoneal leukocytosis. Surgery **83**, 223-229.
82. **Hau, T., Nelson, R.D., Fiegel, V.D., Levenson, R. and Simmons, R.L.** 1977. Mechanisms of the adjuvant effect of hemoglobin in experimental peritonitis. II. Influence of hemoglobin on human leukocytes chemotaxism *in vitro*. J. Surg. Res. **22**, 174-180.
83. **Henderson, D.P. and Payne, S.M.** 1994. Characterization of the *Vibrio cholerae* outer membrane heme transport protein HutA: sequence of the gene, regulation of the expression, and homology to the family of TonB-dependent proteins. J. Bacteriol. **176**, 3269-3277.
84. **Henderson, D.P. and Payne, S.M.** 1993. Cloning and characterization of the *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin. Mol. Microbiol. **7**, 461-469.
85. **Hershko, C.** 1975. The fate of circulating hemoglobin. Br. J. Haematol. **29**, 199.
86. **Higgins, R., Larivière, S., Mittal, K.R., Martineau, G.-P., Rousseau, R. and Cameron, J.** 1985. Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can. Vet. J. **26**, 86-89.
87. **Holt, S.C.** 1996. Isolation and characterization of a heme-binding cell envelope protein from *Porphyromonas gingivalis*. Microb. Pathogen. **21**, 65-70.
88. **Inzana, T.J.** 1990. Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. Can. J. Vet. Res. **54**, 522-527.
89. **Inzana, T.J.** 1995. Simplified procedure for preparation of sensitized latex particles to detect capsular polysaccharides - application to typing and diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Clin. Microbiol. **33**, 2297-2303.

90. **Inzana, T.J.** 1991. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microb. Pathogen. **11**, 305-316.
91. **Inzana, T.J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski, R.P. and Anderson, P.** 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. Infect. Immun. **56**, 1880-1889.
92. **Inzana, T.J. and Mathison, B.** 1987. Type-specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. Infect. Immun. **55**, 1580-1587.
93. **Inzana, T.J., Todd, J. and Veit, H.P.** 1993. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. Infect. Immun. **61**, 1682-1686.
94. **Ishii, H., Fukuyasu, T., Iyobe, S. and Hashimoto, H.** 1993. Characterization of newly isolated plasmids from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res. **54**, 701-708.
95. **Jacques, M.** 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. Trends Microbiol. **4**, 408-410.
96. **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.
97. **Janoff, A. and Zweifach, W.** 1960. Inactivation of bacterial exotoxins and endotoxin by iron. J. Exp. Med. **112**, 23-34.
98. **Jarosik, G.P. and Hansen, E.J.** 1995. Cloning and sequencing of the *Haemophilus influenzae* exbB and exbD genes. Gene **152**, 89-92.
99. **Jarosik, G.P., Sanders, J.D., Cope, L.D., Muller-Eberhard, U. and Hansen, E.J.** 1994. A functional *tonB* gene is required for both utilization of haem and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type B. Infect. Immun. **62**, 2470-2477.
100. **Jensen, A.E. and Bertram, T.A.** 1986. Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. Infect. Immun. **51**, 419-424.
101. **Jin, H., Ren, Z., Pozsgay, J.M., Elkins, C., Whitby, P.W., Morton, D.J. and Stull, T.L.** 1996. Cloning of a DNA fragment encoding a heme-repressible hemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. **64**, 3134-3141.
102. **Kaca, W. and Roth, R.** 1995. Activation of complement by human hemoglobin and by mixtures of hemoglobin and bacterial endotoxin. Biochim. Biophys. Acta **1245**, 49-56.
103. **Kaca, W., Roth, R.I. and Levin, J.** 1994. Hemoglobin, a newly recognized lipopolysaccharide (LPS)-binding protein that enhances LPS biological activity. J. Biol. Chem. **269**, 25078-25084.

104. **Kaca, W., Roth, R.I., Ziolkowski, A. and Levin, J.** 1994. Human hemoglobin increases the biological activity of bacterial lipopolysaccharides in activation of *Limulus* amoebocyte lysate and stimulation of tissue factor production by endothelial cells in vitro. *J. Endotoxin Res.* **1**, 243-252.
105. **Kamp, E.M., Popma, J.K., Anakotta, J. and Smits, M.A.** 1991. Identification of a hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **59**, 3079-3085.
106. **Kamp, E.M., Stockhofe, Z.N., van, L.L. and Smits, M.A.** 1997. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect. Immun.* **65**, 4350-4.
107. **Karibian, D., Deprun, C., Szabo, L., Le Beyee, Y. and Caroff, M.** 1991. 252Cf-plasma desorption mass spectrometry applied to the analysis of endotoxin lipid A preparations. *Int J Mass Spectrom Ion Process* **111**, 273-286.
108. **Karkhoff-Schweizer, R.R., Schryvers, A.B. and Schweizer, H.P.** 1994. Cloning and sequence analysis of the *fur* gene encoding an iron-regulatory protein of *Neisseria meningitidis*. *Gene* **141**, 139-140.
109. **Kim, Y.M., Yamazaki, I. and Piette, L.H.** 1994. The effect of haemoglobin, hematin and iron on neutrophil inactivation in superoxide generating systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **309**, 308-314.
110. **Kirby, S.D., Ogunnariwo, J.A. and Schryvers, A.B.** 1995. Receptor-mediated iron acquisition from transferrin in the *Pasteurellaceae*. In: *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*, pp. 115-127, Plenum Press, New York.
111. **Koebnik, R., Baumler, A.J., Heesemann, J., Braun, V. and Hantke, K.** 1993. The TonB protein of *Yersinia enterocolitica* and its interactions with TonB-box proteins. *Mol. Gen. Genet.* **237**, 152-160.
112. **Kroll, J.S., Langford, P.R. and Loynds, B.M.** 1991. Copper-zinc superoxide dismutase of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Bacteriol.* **173**, 7449-7457.
113. **Kroll, J.S., Langford, P.R., Wilks, K.E. and Keil, A.D.** 1995. Bacterial [Cu, Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! *Microbiology* **141**, 2271-2279.
114. **Lacouture, S., Mittal, K.R., Jacques, M. and Gottschalk, M.** 1997. Serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the use of monoclonal antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.* **9**, 337-41.
115. **Lagergard, T., Purven, M. and Frisk, A.** 1993. Evidence of *Haemophilus ducreyi* adherence to and cytotoxin destruction of human epithelial cells. *Microb. Pathogen.* **14**, 417-431.

116. **Lallier, R., Le Blanc, L., Morrissette, F. and Higgins, R.** 1987. Detection of a permeability factor produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Curr. Microbiol.* **15**, 141-144.
117. **Lee, B.C.** 1994. Isolation and characterization of the haemin-binding proteins from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* **140**, 1473-1480.
118. **Lee, B.C.** 1992. Isolation of an outer membrane hemin-binding protein of *Haemophilus influenzae* Type b. *Infect. Immun.* **60**, 810-816.
119. **Lee, B.C.** 1992. Isolation of haemin-binding proteins of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Med. Microbiol.* **36**, 121-127.
120. **Lee, B.C.** 1995. Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol. Microbiol.* **18**, 383-390.
121. **Lee, B.C. and Hill, P.** 1992. Identification of an outer-membrane haemoglobin-binding protein in *Neisseria meningitidis*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2647-2656.
122. **Lee, B.C. and Levesque, S.** 1997. A monoclonal antibody directed against the 97-kilodalton gonococcal hemin binding protein inhibits hemin utilization by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **65**, 2970-2974.
123. **Létoffé, S., Ghigo, J.M. and Wandersman, C.** 1994. Iron acquisition from heme and hemoglobin by *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9876-9880.
124. **Létoffé, S., Ghigo, J.M. and Wandersman, C.** 1994. Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter. *J. Bacteriol.* **176**, 5372-5377.
125. **Leung, K.P., Subramaniam, P.S., Okamoto, M., Fukushima, H. and Lai, C.H.** 1998. The binding and utilization of hemoglobin by *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 227-233.
126. **Lewis, L.A., Gray, E., Wang, Y.P., Roe, B.A. and Dyer, D.W.** 1997. Molecular characterization of hpuAB, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **23**, 737-749.
127. **Litwin, C.M. and Calderwood, S.B.** 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**, 137-149.
128. **Marks, D.H., Cooper, T., Makovec, T., Okerberg, C. and Lollini, L.O.** 1989. Effect of polymyxin B on hemoglobin-mediated hepatotoxicity. *Mil. Med.* **154**, 180-184.
129. **Mazoy, R. and Lemos, M.L.** 1996. Identification of heme-binding proteins in the cell membranes of *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**, 265-270.

130. **Mazoy, R., Vazquez, F. and Lemos, M.L.** 1996. Isolation of heme-binding proteins from *Vibrio anguillarum* using affinity chromatography. FEMS Microbiol. Lett. **141**, 19-23.
131. **Mittal, K.R.** 1990. Cross-reactions between *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 and 9. J. Clin. Microbiol. **28**, 535-539.
132. **Mittal, K.R.** 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. Vet. Microbiol. **32**, 135-148.
133. **Mittal, K.R., Bourdon, S. and Higgins, R.** 1998. Évolution de la distribution des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* provenant de porcs malades au Québec. Méd. Vét. Québec **28**, 91-92.
134. **Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivière, S.** 1987. An evaluation of agglutination and coagglutination techniques for serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates. Am. J. Vet. Res. **48**, 219-226.
135. **Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivière, S.** 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. J. Clin. Microbiol. **15**, 1019-1023.
136. **Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivière, S.** 1983. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. J. Clin. Microbiol. **18**, 1351-1354.
137. **Mittal, K.R., Higgins, R. and Larivière, S.** 1988. Quantitation of serotype specific and cross reacting group specific antigens by coagglutination and immunodiffusion tests for differentiating *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains belonging to cross reacting serotypes three, six and eight. J. Clin. Microbiol. **26**, 985-989.
138. **Mittal, K.R., Higgins, R., Larivière, S. and Leblanc, D.** 1984. A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Am. J. Vet. Res. **45**, 715-719.
139. **Morton, D.J., Musser, J.M. and Stull, T.L.** 1993. Expression of the *Haemophilus influenzae* transferrin receptor is repressible by hemin but not elemental iron alone. Infect. Immun. **61**, 4033-4037.
140. **Muller-Eberhard, U. and Morgan, W.T.** 1975. Porphyrin-binding proteins in serum. Ann. N.Y. Acad. Sci. **244**, 624.
141. **Muller-Eberhard, U. and Nikkila, H.** 1989. Transport of tetrapyrroles by proteins. Semin. Hematol. **26**, 86-104.
142. **Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R., Serrano, J.J., Garcia, C. and de la Garza, M.** 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. Can. J. Vet. Res. **58**, 83-86.

143. **Neilands, J.B.** 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**, 285.
144. **Neilands, J.B.** 1981. Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 715.
145. **Nicolet, J.** 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Diseases of swine, pp. 401-408, Iowa State University Press, Ames, IA.
146. **Nielsen, R.** 1995. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 2 in porcine colostrum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay specific for serotype 2. *Vet. Microbiol.* **43**, 277-281.
147. **Nielsen, R.** 1985b. *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) serotypes 8, 3, and 6. Serological response and cross immunity in pigs. *Nord. Vet. Med.* **37**, 217-227.
148. **Nielsen, R.** 1984. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype-cross protection experiments. *Nord. Vet. Med.* **36**, 221-234.
149. **Nielsen, R.** 1988. Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* **29**, 580-582.
150. **Nielsen, R.** 1985a. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 9. *Acta Vet. Scand.* **26**, 501-512.
151. **Nikaido, H. and Vaara, M.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**, 1-32.
152. **Niven, D.F., Donga, J. and Archibald, F.S.** 1989. Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. *Mol. Microbiol.* **3**, 1083-1089.
153. **O'Connell, W.A., Hickey, E.K. and Cianciotto, N.P.** 1996. A *Legionella pneumophila* gene that promotes hemin binding. *Infect. Immun.* **64**, 842-848.
154. **Otto, B.R., Van Dooren, S.J.M., Nuijens, J.H., Luirink, J. and Oudega, B.** 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *J. Exp. Med.* **188**, 1091-1103.
155. **Otto, B.R., Verweij-van Vught, J.J. and MacLaren, D.M.** 1992. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 217-233.
156. **Palmer, K.L., Grass, S. and Munson, R.S.** 1994. Identification of a hemolytic activity elaborated by *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **62**, 3041-3043.
157. **Paradis, S.-E., 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.
158. **Payne, S.M.** 1988. Iron and virulence in the family *Enterobacteriaceae*. Crit. Rev. Microbiol. **16**, 81-111.
159. **Perry, M.B., Altman, E., Brisson, J.-R., Beynon, L.M. and Richards, J.C.** 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. Serodiagn. Immunother. Infect. Dis. **4**, 299-308.
160. **Piccini, C.D., Barbe, F.M. and Legnanifajardo, C.L.** 1998. Identification of iron-regulated outer membrane proteins in uropathogenic *Proteus mirabilis* and its relationship with heme uptake. FEMS Microbiol. Lett. **166**, 243-248.
161. **Pickett, C.L., Auffenberg, T., Pesci, E.C., Sheen, V.L. and Jusuf, S.S.** 1992. Iron acquisition and hemolysin production by *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. **60**, 3872-3877.
162. **Prigal, S.J., Herp, A. and Gerstein, J.** 1973. The detoxification of lipopolysaccharides derived from bacterial endotoxins by ferric chloride. J. Reticuloendothelial Soc. **14**, 250-257.
163. **Raamsdonk, M., Mei, H.C., Soet, J.J., Busscher, H.J. and Graaff, J.** 1995. Effect of polyclonal and monoclonal antibodies on surface properties of *Streptococcus sobrinus*. Infect. Immun. **63**, 1698-1702.
164. **Radacovici, S., Lallier, R., Larivière, S. and Dubreuil, J.D.** 1992. Biochemical characterization of an antigen saline extract of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 and identification of a serotype-specific antigen for ELISA serodiagnosis. Vet. Microbiol. **30**, 369-385.
165. **Rapp, V.J., Munson, R.S. and Ross, R.F.** 1986. Outer membrane protein profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Infect. Immun. **52**, 414-420.
166. **Rapp, V.J. and Ross, R.F.** 1986. Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection. Infect. Immun. **54**, 751-760.
167. **Reidl, J. and Mekananos, J.J.** 1996. Lipoprotein E(P4) is essential for heme uptake by *Haemophilus influenzae*. J. Exp. Med. **183**, 621-629.
168. **Ren, Z., Jin, H.F., Morton, D.J. and Stull, T.L.** 1998. Hgpb, a gene encoding a second *Haemophilus influenzae* hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding protein. Infect. Immun. **66**, 4733-4741.
169. **Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zahringer, U., Seydel, U., Padova, F.D., Schreier, M. and Brade, H.** 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J. **8**, 217-225.

170. **Rioux, S., Dubreuil, D., Begin, C., Laferriere, C., Martin, D. and Jacques, M.** 1997. Evaluation of protective efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 lipopolysaccharide-protein conjugate in mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 63-74.
171. **Rioux, S., Girard, C., Dubreuil, J.D. and Jacques, M.** 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.
172. **Rosendal, S. and MacInnes, J.I.** 1990. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* **51**, 711-717.
173. **Roth, R., Wong, J. and Hamilton, R.** 1996. Ultrastructural changes in bacterial lipopolysaccharide induced by human hemoglobin. *J. Endotoxin Res.* **3**, 361-366.
174. **Roth, R.I.** 1994. Hemoglobin enhances the production of tissue factor by endothelial cells in response to bacterial endotoxin. *Blood* **83**, 2860-2865.
175. **Roth, R.I. and Kaca, W.** 1994. Toxicity of hemoglobin solutions: hemoglobin is a lipopolysaccharide (LPS) binding protein which enhances LPS biological activity. *Artificial Cells, Blood Substitutes, & Immobilization Biotechnology* **22**, 387-98.
176. **Roth, R.I., Kaca, W. and Levin, J.** 1994. Hemoglobin: a newly recognized binding protein for bacterial endotoxins (LPS). *Prog. Clin. Biol. Res.* **388**, 161-172.
177. **Roth, R.I., Levin, F.C. and Levin, J.** 1993. Distribution of bacterial endotoxin in human and rabbit blood and effects of stroma-free hemoglobin. *Infect. Immun.* **61**, 3209-15.
178. **Roth, R.I. and Levin, J.** 1994. Measurement of endotoxin levels in hemoglobin preparations. [Review]. *Methods Enzymol.* **231**, 75-91.
179. **Roth, R.I., Levin, J., Chapman, K.W., Schmeizl, M. and Rickles, F.R.** 1993. Production of modified crosslinked cell-free hemoglobin for human use: the role of quantitative determination of endotoxin contamination. *Transfusion* **33**, 919-924.
180. **Roth, R.I., Panter, S.S., Zegna, A.I., Arellano, F.A. and Levin, J.** 1997. Effects of iron on bacterial endotoxin. *J. Endotoxin Res.* **4**, 273-278.
181. **Rycroft, A. and Cullen, J.M.** 1990. Complement resistance in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection of swine. *Am. J. Vet. Res.* **51**, 1449-1453.
182. **Salyers, A.A. and Whitt, D.D.** 1994. Virulence factors that promote colonization. In: *Bacterial pathogenesis, a molecular approach*, pp. 30-46, ASM Press, Washington, D.C.

183. **Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T.J., MacInnes, J.I., Segers, R.P. and Frey, J.** 1999. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **145** (Pt 8), 2105-2116.
184. **Schryvers, A.B. and Morris, L.J.** 1988. Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **56**, 1144.
185. **Schultz, R.A.** 1989. *Haemophilus pleuropneumoniae*: Prevalence, serotypes, and serology. *Compend. Contin. Edu. Pract. Vet.* **11**, 367-374.
186. **Sebunya, T.D.K., Saunders, J.R. and Osborne, A.D.** 1982. Characteristics of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates and some epidemiological findings on porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* in Saskatchewan. *Can. Vet. J.* **23**, 224-228.
187. **Sebunya, T.N.K., Saunders, J.R. and Osborne, A.D.** 1983. A model aerosol exposure system for induction of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.* **47**, 48-53.
188. **Sebunya, T.N.K. and Saunders, J.K.** 1983. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: A review. *J.A.V.M.A.* **182**, 1331-1337.
189. **Sebunya, T.N.K., Saunders, J.R. and Osborne, A.D.** 1983. Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs. *Can. J. Comp. Med.* **47**, 54-56.
190. **Simonson, C., Brener, D. and Devoe, I.W.** 1982. Expression of a high-affinity mechanism for acquisition of transferrin iron by *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **36**, 107.
191. **Simpson, L.M. and Olivier, J.D.** 1993. Regulation of proteolytic activity of *Vibrio vulnificus* by iron-containing compounds. *Microb. Pathogen.* **14**, 249-252.
192. **Smalley, J.W., Birss, A.J., Mckee, A.S. and Marsh, P.D.** 1998. Hemin regulation of hemoglobin binding by *Porphyromonas gingivalis*. *Current Microbiology* **36**, 102-106.
193. **Smith, A. and Ledford, B.E.** 1988. Expression of the haemopexin-transport system in cultured mouse hepatoma cells. *Biochem. J.* **256**, 941-950.
194. **Smith, A. and Morgan, W.T.** 1984. Hemopexin-mediated heme uptake by liver. *J. Biol. Chem.* **259**, 12049-12053.
195. **Smith, M.L., Paul, J., Ohlsson, P.I., Hjortsberg, K. and Paul, K.G.** 1991. Heme-protein fission under non-denaturing conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 882-886.
196. **Stenbaek, E.I., Delasalle, F. and Gottschalk, M.** 1997. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 using an inhibition enzyme immunoassay. *Can. J. Vet. Res.* **61**, 1-7.

197. **Stevens, M.K., Porcella, S., Klesney-Tait, J., Lumbley, S., Thomas, S.E., Norgard, M.V., Radolf, J.D. and Hansen, E.J.** 1996. A hemoglobin-binding outer membrane protein is involved in virulence expression by *Haemophilus ducreyi* in an animal model. *Infect. Immun.* **64**, 1724-1735.
198. **Stoebner, J.A. and Payne, S.M.** 1988. Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **56**, 2891-2895.
199. **Stojiljkovic, I. and Hantke, K.** 1992. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria. *EMBO J* **11**, 4359-4367.
200. **Stojiljkovic, I. and Hantke, K.** 1994. Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **13**, 719-732.
201. **Stojiljkovic, I., Hwa, V., de Saint Martin, L., O'Gaora, P., Nassif, X., Heffron, F. and So, M.** 1995. The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol. Microbiol.* **15**, 531-541.
202. **Stojiljkovic, I., Larson, J., Hwa, V., Anic, S. and So, M.** 1996. HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: Iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. *J. Bacteriol.* **178**, 4670-4678.
203. **Strutzberg, K., Vonolleschik, L., Franz, B., Pyne, C., Schmidt, M.A. and Gerlach, G.F.** 1995. Mapping of functional regions on the transferrin-binding protein (tfba) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**, 3846-3850.
204. **Stugard, C.E., Daskaleros, P.A. and Payne, S.M.** 1989. A 101-kilodalton heme-binding protein associated with congo red binding and virulence of *Shigella flexneri* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* **57**, 3534-3539.
205. **Tai, S.S., Wang, T.R. and Lee, C.J.** 1997. Characterization of hemin binding activity of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1083-1087.
206. **Tascón, C.R., Vázquez, B.J., 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**, 53-7.
207. **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*. *Microbiologica* **12**, 171-184.

208. **Taylor, D.J.** 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Diseases of Swine, pp. 343-354, Iowa State University Press, Ames.
209. **Thacker, B.J., Mulks, M.H. and Jolie, R.A.V.** 1992. Development of improved *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines. Proc. IPVS **193**,
210. **Thomas, C.E., Olsen, B. and Elkins, C.** 1998. Cloning and characterization of *tdhA*, a locus encoding a TonB-dependent heme receptor from *Haemophilus ducreyi*. Infect. Immun. **66**, 4254-4262.
211. **Thomas, C.E. and Sparling, P.F.** 1994. Identification and cloning of a *fur* homolog from *Neisseria meningitidis*. Mol. Microbiol. **11**, 725-737.
212. **Thwaites, R.N. and Kadis, S.** 1991. Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane proteins and enhancement of phagocytosis by antibodies to the proteins. Infect. Immun. **59**, 544-9.
213. **Torres, A.G. and Payne, S.M.** 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. Mol. Microbiol. **23**, 825-833.
214. **Udeze, F.A., Latimer, K.S. and Kadis, S.** 1987. Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res. **48**, 768-773.
215. **Utrera, V. and Pijoan, C.** 1991. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. Vet. Rec. **128**, 357-358.
216. **Valks, M.M.H., Nell, T. and Van Den Bosch, J.E.** 1996. A clinical field trial in finishing pigs to evaluate the efficacy of a new APP subunit vaccine. Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc. **14**, 208.
217. **Vincent, S.H.** 1989. Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids. Semin. Hematol. **26**, 105-113.
218. **Ward, C.K. and Inzana, T.J.** 1997. Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. Infect. Immun. **65**, 2491-6.
219. **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.
220. **Ward, C.K., Lawrence, M.L., Veit, H.P. and Inzana, T.J.** 1998. Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. Infect. Immun. **66**, 3326-36.
221. **Weinberg, E.D.** 1978. Iron and Infection. Microbiol. Rev. **42**, 45-66.

222. **Weinberg, E.D.** 1984. Iron withholding: Defense against infection and neoplasia. *Physiol. Rev.* **64**, 65-102.
223. **Welch, R.A.** 1991. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**, 521-528.
224. **Whitby, P.W., Sim, K.E., Morton, D.J., Patel, J.A. and Stull, T.L.** 1997. Transcription of genes encoding iron and heme acquisition proteins of *Haemophilus influenzae* during acute otitis media. *Infect. Immun.* **65**, 4696-4700.
225. **White, C., Murray, A., Smith, D., Green, J. and Bolin, R.** 1986. Synergistic toxicity of endotoxin and hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* **108**, 132-137.
226. **Wong, J.C.Y., Holland, J., T., P., Smith, A. and Williams, P.** 1994. Identification and characterization of an iron-regulated hemopexin receptor in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **62**, 48-59.
227. **Yamamoto, K.** 1998. Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* **273**, 21225-21231.
228. **Yamamoto, S., Hara, Y., Tomochika, K. and Shinoda, S.** 1995. Utilization of hemin and hemoglobin as iron sources by *Vibrio parahaemolyticus* and identification of an iron-repressible hemin-binding protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 195-200.

VII. ANNEXES

Annexe 1

Article

Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors

Sonia-Élaine Paradis, J. Daniel Dubreuil, Marcelo Gottschalk,
Marie Archambault and Mario Jacques

Dans ce travail, j'ai effectué l'extraction des macrophages des poumons de porcs et j'ai participé à la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

Actinobacillus pleuropneumoniae is the causative agent of porcine fibrinohemorrhagic necrotizing pleuropneumonia. We have previously identified the lipopolysaccharides (LPS) as the major adhesin of *A. pleuropneumoniae* involved in adherence to porcine respiratory tract cells. In the present study, adherence of *A. pleuropneumoniae* to porcine tracheal frozen sections was inhibited by homologous monovalent Fab fragments produced from monoclonal antibodies 5.1 G8F10 and 102-G02 directed, respectively, against the *A. pleuropneumoniae* serotype 1 or serotype 2 O-antigens. These results confirm the important role played by LPS in adherence of *A. pleuropneumoniae* and suggest that these adhesins might represent good vaccine candidates. We also investigated the presence of *A. pleuropneumoniae* receptors in tracheal cell preparations from piglets of four different breeds. Using Far-Western binding assays, we identified proteins recognized by whole cells of *A. pleuropneumoniae* reference strains for serotypes 1 and 2, and local isolates belonging to the same serotypes, and also recognized by extracted LPS from both reference strains. We confirmed the proteinaceous nature of these LPS-binding molecules by their staining with Coomassie brilliant blue, sensitivity to proteinase K digestion, resistance to sodium m-periodate oxidation, and their inability to stain with glycoprotein specific reagents. Four low molecular mass bands (14-17 kDa) seemed to correspond to histones. We also identified proteins at Mr 38 500 that could represent putative receptors for *A. pleuropneumoniae* LPS in swine respiratory tract cells.

Key words: *A. pleuropneumoniae*, lipopolysaccharides, adherence, respiratory tract, tracheal cells, macrophages, receptors

Annexe 2

Liste des communications

ARCHAMBAULT Marie, France Dumas, Pierre Thibault, Christopher Elkins and Mario Jacques. Identification of a 75 kDa iron-regulated hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Communication at the Canadian Society of Microbiology meeting (CSM), Montreal, Canada, June 1999.

ARCHAMBAULT Marie, France Dumas, Pierre Thibault, Christopher Elkins and Mario Jacques. Evaluation by flow cytometry of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and characterization of a 75 kDa iron-regulated hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein. Communication at the American Society for Microbiology (ASM). Chicago, USA, May 1999.

Jacques Mario, Stéphane Rioux, **Marie ARCHAMBAULT**, Bernadette Foiry, Catherine Galarnau et N.Y. Luki. Evaluation of Tiamulin and Econor's effect on growth and production of virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*. Communication at the 15th congress of International Porcine Veterinary Society, England, July 1998.

ARCHAMBAULT Marie, Christopher Elkins et Mario Jacques. Identification and purification of a 76 kDa iron-regulated hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Oral communication at the Canadian Society of Microbiology meeting (CSM). Guelph, Canada, June 1998.

ARCHAMBAULT Marie and Mario Jacques. Identification de protéines liant l'hémoglobine et régulées par le fer chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Communication au 14^{ième} congrès de l'Association des Microbiologistes du Québec (AMQ). Hotel du Parc, Montréal, October 1997.

ARCHAMBAULT Marie, Martin Olivier and Mario Jacques. Binding of pig hemoglobin modifies some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide. Oral communication at the Canadian Society of Microbiology meeting (CSM), Québec, Canada, May 1997.

Paradis S.-É., Daniel Dubreuil, Caroline Bégin, **Marie ARCHAMBAULT** et Mario Jacques. Adherence inhibition potential of monoclonal antibodies directed against the O-antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells and

preliminary characterization of the LPS receptors. Communication at the Canadian Society of Microbiology meeting (CSM), Québec, Canada, May 1997.

ARCHAMBAULT Marie, Bernadette Foiry, Moussa Diarra, Sonia-Élaine Paradis and Mario Jacques. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. Communication at the HAP meeting (*Haemophilus, Actinobacillus, Pasteurellaceae*) International Conference. Acapulco, Mexique, October 1996.

ARCHAMBAULT Marie, Bernadette Foiry, Moussa Diarra, Sonia-Élaine Paradis and Mario Jacques. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. Communication at the 13th congress of the Association des Microbiologistes du Québec (AMQ). Institut Armand Frappier (IAF), october 1996.

ARCHAMBAULT Marie, Bernadette Foiry and Mario Jacques. Effects of pig hemoglobin on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. Communication at the 96th congress of the American Society for Microbiology (ASM). New Orleans, Louisiana, May 1996.

ARCHAMBAULT Marie, Bernadette Foiry and Mario Jacques. Liaison de l'hémoglobine de porc aux lipopolysaccharides d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. Communication at the 64th congress of the Association canadienne-française pour l'avancement des sciences (Acfas). Université McGill, May 1996.

ARCHAMBAULT Marie, Bernadette Foiry and Mario Jacques. Effets de la liaison de l'hémoglobine aux lipopolysaccharides d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. Communication at the 12th congress of the Association des Microbiologistes du Québec (AMQ). Université de Sherbrooke, November 1995.