

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE DE MAÎTRISE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

PAR

JULIE PROVENCHER, B. Sc. (Biologie médicale)

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE GÈNES CODANT POUR DES
FACTEURS DE VIRULENCE ET DES PROTÉINES ANTIGÉNIQUES CHEZ
LA BACTÉRIE *Actinobacillus pleuropneumoniae***

JUIN 2003

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

L'essentiel est invisible pour les yeux...

(Antoine de St-Exupéry, *Le petit Prince*)

REMERCIEMENTS

Mon goût pour la science et ma curiosité m'ont dirigée vers des études supérieures. Ce qui est certain, c'est que je n'aurais pu y arriver sans le soutien des gens qui m'entouraient. Ces individus, sans qui, ma maîtrise aurait été beaucoup plus fastidieuse et indiscutablement moins agréable, je vous les présente et les remercie tous infiniment :

Mon directeur de maîtrise, Dr Marc Sirois pour m'avoir permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire et d'acquérir de précieuses connaissances techniques et théoriques sur la génétique bactérienne moléculaire.

Le Fonds pour la Formation des Chercheurs et de l'Aide à la Recherche (FCAR) pour leur support financier, me permettant de me consacrer entièrement à mon travail en laboratoire ainsi qu'à la rédaction de mon mémoire.

Les différents membres du département de chimie-biologie que j'ai eu le plaisir à côtoyer. Toutes ces personnes ont été d'un grand support et d'une grande gentillesse, rendant mes années passées à la maîtrise des plus agréables et productives. Parmi celles-ci, je ne peux passer sous silence Micheline et Daniel avec lesquels j'ai eu maintes discussions animées.

Nancy Perreault, Luc Gagnon, Amélie Saint-Arneault et Vicky Beaudoin : Nancy, ma collègue et mon amie, pour nos années à la maîtrise remplies de rebondissements de toutes sortes ce qui nous a rapprochées beaucoup; Luc, stagiaire post-doctoral durant ma maîtrise et maintenant un ami, pour son aide précieuse en bio-informatique et son éternel optimisme; Amélie, mon initiatrice à la biologie moléculaire et également une amie, pour la « passation des pouvoirs » et ses judicieux conseils; Vicky, ma « chum », pour son amitié et son aide technique et théorique.

Ma mère, Claire Germain : Je profite de ces lignes pour te dire tout le respect et l'admiration que j'ai pour ce que tu as accompli et ce que tu accompliras sûrement dans

l'avenir. Tu es pour moi un modèle de générosité, de persévérance, de force et de souplesse. Merci d'être là pour moi.

Serge, mon conjoint, pour ce que tu es. Je t'aime.

RÉSUMÉ

Actinobacillus pleuropneumoniae est l'agent causal de la pleuropneumonie porcine, une maladie répandue à travers le monde et qui entraîne des pertes économiques considérables dans l'industrie. Actuellement, les vaccins disponibles ne sont pas efficaces afin de prévenir les infections causées par les multiples sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Cette problématique s'explique par la pathogénicité multifactorielle de cette bactérie. Il est donc évident qu'il faut acquérir plus de connaissances en ce qui concerne les facteurs de virulence et les protéines antigéniques d'*A. pleuropneumoniae* afin de fournir un plus grand éventail de protéines pour l'élaboration de traitements préventifs efficaces. Considérant que les protéines susceptibles d'induire une réponse immunitaire chez l'animal infecté sont des protéines exposées à la surface de la bactérie ou secrétées dans le milieu extérieur, nous avons donc utilisé un outil d'identification de ces protéines : la fusion de protéine avec la phosphatase alcaline. Nous avons construit une banque génomique d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 dans un plasmide contenant le gène tronqué de la phosphatase alcaline. Cette construction nous a permis d'identifier plusieurs séquences correspondant à des gènes codant pour des protéines exportées hors du cytoplasme. Par transfert immunologique (immunoblot), nous avons été en mesure d'identifier de nombreuses protéines antigéniques, potentiellement immunogènes, en plus de mettre en évidence des protéines qui pourraient être impliquées dans la virulence de la bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Mots clés : *Actinobacillus, pleuropneumoniae*, pleuropneumonie, facteurs de virulence, phosphatase alcaline, protéine sécrétée, immunogène, antigène,

IMPLICATION DE CHACUN DES AUTEURS DANS L'ARTICLE SCIENTIFIQUE

La banque génomique a été faite par Mme Amélie St-Arneault, étudiante à la maîtrise au laboratoire. Par la suite, j'ai pris en charge le projet. J'ai procédé à l'isolement de tous les clones et à la purification des plasmides recombinants dans le but de procéder au séquençage.

Les analyses bio-informatiques préliminaires des séquences obtenues ont été faites par M. Luc Gagnon, stagiaire post-doctoral au laboratoire. J'ai ensuite procédé à la mise à jour des analyses bio-informatiques, étant donnée l'avancement rapide des données génomiques disponibles pour plusieurs genres bactériens.

J'ai réalisé les expériences d'immunoblots ainsi que la revue de littérature afin d'évaluer l'importance de chacune des séquences pour des analyses ultérieures et en prévision de la rédaction de l'article présenté dans ce mémoire. J'ai d'ailleurs participé de façon active à la rédaction du présent manuscrit en fournissant les résultats nécessaires à la rédaction de l'article, la production des tableaux ainsi que la première ébauche de l'article.

Mme Nancy Perreault a contribué à ces travaux lors des isolements et tout au long du projet par de nombreuses discussions concernant la phosphatase alcaline. Dr Marc Beauregard nous a donné, dès le début et en cours de projet, des informations précieuses sur la sécrétion des protéines bactériennes.

Enfin, Dr Marc Sirois, directeur et superviseur des travaux a été responsable de la rédaction du manuscrit pour le soumettre à la revue « Molecular Biotechnology ».

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	v
IMPLICATION DE CHACUN DES AUTEURS DANS L'ARTICLE SCIENTIFIQUE	vi
TABLES DES MATIÈRES	vii
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xii
 CHAPITRE I LA PLEUROPNEUMONIAE PORCINE	 1
INTRODUCTION	1
1.1 L'étiologie	1
1.2 La pathogenèse	2
1.3 L'épidémiologie	3
1.4 Le diagnostic	4
1.5 Les traitements	5
1.6 La prévention	5
 CHAPITRE II <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	 7
INTRODUCTION	7
2.1 L'évolution taxonomique	7
2.2 Les sérotypes et les biotypes	8
2.3 Les facteurs de virulence d' <i>A. pleuropneumoniae</i> et leur immunogénicité	9
2.3.1 La capsule	12
2.3.1.1 La biosynthèse des polysaccharides capsulaires	12
2.3.1.2 L'exportation des polysaccharides capsulaires	13
2.3.2 Les lipopolysaccharides	14
2.3.3 Les protéines sécrétées	16
2.3.3.1 Les exotoxines	16

2.3.3.1.1	L'organisation des différents gènes <i>apx</i>	17
2.3.3.1.2	Les toxines Apx : leurs rôles dans la virulence d' <i>A. pleuropneumoniae</i> ainsi que leur immunogénicité	19
2.3.3.2	Les protéases	20
2.3.4	Les protéines de la membrane externe	22
2.3.4.1	Les protéines de fixation à la transferrine	22
2.3.4.2	Protéine de la membrane externe, AopA	24
2.3.4.3	La protéine inductible au maltose	24
2.3.4.4	Les fimbriae	25
2.3.5	Les lipoprotéines	25
2.3.5.1	La lipoprotéine PalA	25
2.3.5.2	OmlA, une lipoprotéine de la membrane externe	26
2.3.5.3	La lipoprotéine ApaA	27
2.3.6	Les protéines cytoplasmiques	28
2.3.6.1	Les protéines pour la biosynthèse de la riboflavine	29
2.3.6.2	L'enzyme 3-déhydroquinase	29
2.3.6.3	L'hémoprotéine NADPH-sulfite réductase	30
2.3.6.4	La superoxyde dismutase	30
2.3.6.5	L'hydroperoxyde réductase	31
2.3.6.6	L'uréase	32
2.4	Conclusion	33
CHAPITRE III	LA PHOSPHATASE ALCALINE EN TANT QUE	
	GÈNE RAPPORTEUR	34
INTRODUCTION		34
3.1	La séquence d'exportation	34
3.2	La phosphatase alcaline	37
3.2.1	La fusion avec la phosphatase alcaline	38
3.2.2	L'utilisation de ' <i>phoA</i> chez différentes espèces bactériennes	41
3.2.2.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	42

3.2.2.2	<i>Treponema pallidum</i>	42
3.2.2.3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42
3.2.2.4	<i>Pasteurella multocida</i>	43
3.2.2.5	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	43
3.2.2.6	<i>Helicobacter pylori</i>	44
3.2.2.7	<i>Staphylococcus aureus</i>	44
3.2.2.8	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	45
3.3	Conclusion	45
CHAPITRE IV	PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	47
4.1	Problématique	47
4.2	Les hypothèses et objectifs de recherche	48
CHAPITRE V	IDENTIFICATION OF SECRETED PROTEINS OF THE SWINE PATHOGEN <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> USING GENE FUSION WITH ALKALINE PHOSPHATASE	49
5.1	ABSTRACT	50
5.2	INTRODUCTION	51
5.3	Materials and Methods	52
5.3.1	Bacterial strains, vectors and growth media	52
5.3.2	Construction of the genomic fusion library	52
5.3.3	Immunoscreening of PhoA positive clones	53
5.3.3.1	Purification of antiserum	53
5.3.3.2	Immunoblotting of the PhoA fusion clones	53
5.3.3.3	Sequencing and bioinformatic analysis	53
5.4	Results and Discussion	54
5.4.1	PhoA fusion proteins vs immunogenicity	54
5.4.2	General sequence analysis of PhoA positive clones	55
5.4.3	Analysis of particular sequences	56

5.4.3.1	Identification of putative lipoproteins	56
5.4.3.2	Identification of an outer membrane antigen	56
5.4.3.2.1	Identification of stationary phase survival protein	57
5.4.3.2.2	Identification of hypothetical protein	57
5.5	Conclusion	57
REFERENCES		59
 CHAPITRE VI CONCLUSION GÉNÉRALE		71
6.1	La technologie PhoA en relation avec les facteurs de virulence et les protéines immunogènes	71
6.2	Les analyses bio-informatiques	72
6.3	Des protéines potentiellement immunogènes	74
6.4	De nouveaux gènes.	75
 BIBLIOGRAPHIE		77

LISTE DES FIGURES

2.1	Organisation schématique des gènes de l'opéron <i>cps5ABCD</i> .	13
2.2	Organisation de l'opéron <i>cpxDCBA</i> chez <i>A. pleuropneumoniae</i> de sérotype 5a.	14
2.3	Schématisation d'un lipopolysaccharide.	15
2.4	Représentation schématique de l'opéron <i>apxICABD</i> chez la bactérie <i>A. pleuropneumoniae</i> de sérotype 1.	18
2.5	Représentation schématique de l'organisation des différents opérons des toxines Apx chez les différents sérotypes d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .	21
2.6	Organisation de l'opéron <i>exbBD-tbpBA</i> d' <i>A. pleuropneumoniae</i> de sérotype 5.	23
2.7	Schéma représentant l'opéron des gènes impliqués dans la biosynthèse de la riboflavine chez <i>A. pleuropneumoniae</i> de sérotype 5.	28
3.1	Représentation schématique d'une séquence d'exportation standard et d'une séquence d'exportation typique des lipoprotéines.	35
3.2	Illustration schématique du système de translocation par les protéines Sec.	36
3.3	Séquence en acides aminées de la phosphatase alcaline bactérienne.	37
3.4	Illustration en 3 dimensions de la phosphatase alcaline.	38
3.5	Schématisation du clonage dans un vecteur contenant le gène de la phosphatase alcaline.	40
3.6	Colonies bactériennes bleues dues à l'activité de la phosphatase alcaline sur le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate.	41
5.1	Result of a typical screening by immunoblot of the genomic library of <i>A. pleuropneumoniae</i> with antisera of convalescent pig.	66

LISTE DES TABLEAUX

2.1 Les composantes cellulaires d' <i>A. pleuropneumoniae</i> , leurs rôles associés à la virulence ainsi que leur immunogénicité.	11
5.1 Clones sharing homology to known <i>Pasteurellaceae</i> proteins.	67
5.2 Clones sharing homology to non <i>Pasteurellaceae</i> proteins.	69
5.3 Predicted amino acid sequences of clones encoding unique proteins.	70

CHAPITRE I

LA PLEUROPNEUMONIE PORCINE

INTRODUCTION

Depuis le début des années 50, on rapporte dans l'industrie porcine une maladie hautement contagieuse : la pleuropneumonie (Taylor, 1999; Mittal *et al.*, 1992; Higgins *et al.*, 1982). Cette maladie est répertoriée à travers le monde et la bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae* en est l'agent responsable (Mittal *et al.*, 1992; Sebunya & Saunders, 1983; Shope, 1964). La pleuropneumonie se caractérise par une pneumonie hémorragique accompagnée d'une pleurésie nécrosante (Taylor, 1999; Shope, 1964). Elle entraîne des pertes économiques importantes dans les élevages intensifs et demeure une maladie difficile à traiter et à prévenir (Fenwick & Henry, 1994; Mittal *et al.*, 1992; Sebunya & Saunders, 1983). Par conséquent, il demeure d'actualité de mieux comprendre les nombreux aspects de la maladie.

Dans ce chapitre, il sera donc question de la pleuropneumonie porcine : son étiologie, sa pathogenèse, l'épidémiologie ainsi que les moyens de diagnostic et l'efficacité des traitements disponibles. Une meilleure conception de la pleuropneumonie porcine permettra ainsi de mieux cerner l'importance d'améliorer les traitements préventifs.

1.1 L'étiologie

On fait mention de la pleuropneumonie dans les élevages de porcs depuis les années 50 et le début des années 60 en Angleterre et aux États-Unis (Taylor, 1999; Mittal *et al.*, 1992; Higgins *et al.*, 1982). En Argentine, Shope (1964) identifie formellement un bacille Gram négatif comme étant la cause de la pleuropneumonie porcine et désigne la bactérie pathogène *Haemophilus pleuropneumoniae*. Au Canada, c'est à partir de 1971 que l'on rapporte des cas de pleuropneumonie porcine, plus particulièrement en Saskatchewan (Schieffer *et al.*, 1974). Au Québec, des pertes économiques imputables

à des infections par la bactérie *A. pleuropneumoniae* sont signalées depuis 1978 (Higgins *et al.*, 1982).

1.2 La pathogenèse

A. pleuropneumoniae se transmet par contact direct ou par aérosol via les voies respiratoires supérieures du porc (Taylor, 1999). Lorsque la bactérie est inhalée, elle colonise directement les poumons (Haesebrouck *et al.*, 1997). Dans ce processus, les lipopolysaccharides (LPS) membranaires d'*A. pleuropneumoniae* agissent en se liant aux récepteurs des « low-density lipoproteins » (LDL) des cellules eucaryotes (Paradis *et al.*, 1994; Van Lenten *et al.*, 1986). L'implication des protéines d'adhésion telles les fimbriae est admise, mais le processus n'est pas encore élucidé (Zhang *et al.*, 2000).

Suite à cette colonisation, il y aurait libération massive de toxines Apx (Apx : exotoxine de type RTX d'*A. pleuropneumoniae*) et concentration de celles-ci à la surface des cellules pulmonaires, ce qui constituerait une étape importante dans la pathogenèse (Haesebrouck *et al.*, 1997). Par ce processus, les toxines induisent la production de pores membranaires chez les cellules de l'hôte, en particulier les macrophages alvéolaires. En lysant ces macrophages, les toxines Apx compromettraient la réponse immunitaire de l'hôte et favoriseraient ainsi une meilleure survie de la bactérie (Le mécanisme exact est expliqué au chapitre 2.) (Lally, 1999; Maier *et al.*, 1996).

L'action des toxines sur les macrophages pourrait également jouer un rôle dans l'augmentation de la réaction inflammatoire (Welch *et al.*, 1995). Suite aux lésions subies par les macrophages, ceux-ci libèrent des cytokines inflammatoires. Ceci coïnciderait avec l'apparition des signes cliniques dus à l'inflammation. En effet, des études ont permis l'observation de lésions pulmonaires inflammatoires suite à l'infection par la bactérie pathogène *A. pleuropneumoniae*, et ce, après seulement 90 minutes suivant l'inoculation chez le porc (Dom *et al.*, 1994a et b).

1.3 L'épidémiologie

A. pleuropneumoniae est une bactérie pathogène du système respiratoire du porc. Elle se transmet par contact direct ou par aérosol (Taylor, 1999). La pleuropneumonie porcine atteint plus fréquemment les jeunes porcs de six à huit semaines. Malgré cela, les porcs de toutes les catégories d'âge peuvent être infectés (Taylor, 1999; Fenwick & Henry, 1994). La présence et l'intensité des signes cliniques de la maladie dépendent de l'âge de l'animal, l'état d'immunité et de l'état de stress de l'animal, de la densité de la population porcine, des conditions environnementales ainsi que de la charge bactérienne (Taylor, 1999; Haesebrouck *et al.*, 1997; Fenwick & Henry, 1994). Une exposition à une faible dose de l'agent infectieux peut entraîner l'apparition de la maladie sous sa forme sous-clinique et progresser vers la forme chronique. Par contre, l'exposition à une charge bactérienne beaucoup plus importante, c'est-à-dire une quantité initiale de bactérie lors de la transmission de l'agent pathogène, peut entraîner la mort en quelques heures (Taylor, 1999; Fenwick & Henry, 1994; Sebunya *et al.*, 1993).

Les nombreux sérotypes (variation de l'espèce) d'*A. pleuropneumoniae* ajouteraient un caractère supplémentaires à considérer pour l'explication des variations dans les atteintes chez les porcs. Comme il sera décrit ultérieurement, *A. pleuropneumoniae* possède 15 sérotypes différents. Les sérotypes 1 et 5 apparaissent, en général, les plus virulents (Taylor, 1999; Frey, 1995).

La pleuropneumonie porcine est présente en Amérique du Nord, en Amérique du Sud, en Asie, en Europe ainsi qu'en Australie (Taylor, 1999). Les porcs, dans ces différentes régions du monde, sont infectés par des sérotypes différents. Par exemple, en Europe, le sérotype 2 prévaut sur les autres. En Australie, on retrouve principalement les sérotypes 1, 7 et 12 (Prideaux *et al.*, 1999). En Amérique du Nord, les sérotypes isolés le plus fréquemment des cas cliniques sont les sérotypes 1, 5 et 7 (Mittal *et al.*, 1998). Au Québec, le sérotype 1 prédomine jusqu'en 1983. Depuis, on retrouve majoritairement le sérotype 5 suivi du sérotype 7. Ceci est principalement imputable au traitement préventif (la vaccination) et à la prévention qui se concentraient sur le sérotype 1. Quant

au sérotype 7, son pourcentage annuel d'identification a augmenté de 8% à 32% durant la période couvrant les années 1990 à 1997 (Mittal *et al.*, 1998).

1.4 Le diagnostic

La transmission entre les différents élevages de porcs se produit principalement lors de l'introduction de nouveaux sujets (Taylor *et al.* 1999; Fenwick & Henry, 1994). Aussi, la majorité des troupeaux à travers le monde sont infectés de façon endémique (Fenwick & Henry, 1994). Considérant ces facteurs, il devient important de développer de bons outils diagnostiques.

Deux types de méthode sont utilisés afin de d'établir le diagnostic de la pleuropneumonie à *A. pleuropneumoniae*. L'analyse des signes cliniques est bien sûr considérée, mais il s'agit principalement des diagnostics microbiologiques et sérologiques (Haesebrouck, 1997; Fenwick & Henry, 1994).

La méthode microbiologique a pour but de démontrer la présence d'*A. pleuropneumoniae* chez les animaux atteints. Normalement, des prélèvements pulmonaires ou de sécrétions sont effectués sur des animaux dans de courts délais post-mortem et ensemencés sur un milieu gélosé enrichi de sang, en présence de *Staphylococcus aureus* qui sécrète le facteur de croissance essentiel à *A. pleuropneumoniae* : le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). L'observation de petites colonies, entourées d'une zone claire d'hémolyse, autour des colonies de *S. aureus* indique la présence de bactéries dépendant du NAD pour leur croissance. Cela indique donc la présence possible de la bactérie *A. pleuropneumoniae*. L'identification de routine se poursuit par le test de l'hémolyses de CAMP positif. L'observation de l'activité de l'uréase et de la fermentation du mannitol font également partie des tests de routine (Taylor, 1999; Haesebrouck *et al.*, 1997). La confirmation de l'identification se fait par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ou par la méthode sérologique (Taylor, 1999).

Certain des tests PCR ne sont pas spécifiques aux différents sérotypes (Gram *et al.*, 1996; Sirois *et al.*, 1991). En 2000, Gram *et al.* réussirent toutefois à mettre au point une PCR spécifique à des groupes de sérotypes : groupe I incluant les sérotypes 1, 9, 11 et 12; groupe II incluant les sérotypes 2 et 8; groupe III incluant les sérotypes 3, 6 et 7; groupe IV incluant le sérotype 4; groupe V incluant les sérotypes 5a, 5b et 10. L'utilisation d'une séquence qui permet l'identification d'une protéine de la membrane externe, soit OmlA, a permis de développer ce test diagnostique.

La méthode sérologique inclut les tests de fixation du complément et la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Taylor, 1999). Les tests ELISA sont basés sur la détection des antigènes membranaires et les LPS de chaque sérotype ou sur la détection des anticorps protecteurs dans le cas d'ELISA-indirect (Andreson *et al.* 2002; Klausen *et al.*, 2002; Nielsen, 1995; Bossé *et al.*, 1993, 1992; Trottier *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1991; Perry *et al.*, 1990). Les tests de fixation du complément permettent, quant à eux, la détection des anticorps dirigés contre les antigènes d'*A. pleuropneumoniae* (Lombin *et al.*, 1985; Mittal *et al.*, 1984). Ces deux méthodes de diagnostic sont spécifiques aux différents sérotypes.

1.5 Les traitements

Lors de la confirmation d'une infection par *A. pleuropneumoniae*, un antibiogramme est fortement recommandé, étant donné les résistances aux antibiotiques acquises au cours des années (Haesebrouck *et al.*, 1997). Les traitements disponibles actuellement ne permettent malheureusement pas de traiter la maladie, mais contribuent à diminuer le taux de mortalité. Toutefois, le taux de morbidité demeure élevé (Fenwick & Henry, 1994). Outre les pertes économiques dues aux mortalités, les traitements curatifs sont longs et coûteux. On observe chez les animaux convalescents une perte de croissance, une diminution de l'alimentation ainsi qu'une augmentation du rapport nourriture/gain de poids, ce qui prolonge la période d'engraissement de plusieurs jours, augmentant ainsi les coûts de production (Fenwick & Henry, 1994).

1.6 La prévention

Le contrôle des facteurs environnementaux est la première étape dans la prévention de la pleuropneumonie porcine: maintenir un taux d'humidité adéquat, une bonne ventilation des lieux et éviter l'introduction de sujets porteurs (Taylor, 1999; Haesebrouck *et al.*, 1997). Malheureusement, ces mesures ne sont pas suffisantes et les éleveurs doivent également procéder à la vaccination des porcs.

Plusieurs vaccins sont déjà sur le marché et peuvent être classés en deux catégories : les vaccins de bactéries tuées ou encore les vaccins faits à partir de protéines spécifiques d'*A. pleuropneumoniae* (Taylor, 1999). Contrairement à l'immunité acquise naturellement, les vaccins ne procurent pas une immunité croisée, c'est-à-dire une immunité contre des infections causées par l'ensemble des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (Nielsen, 1984). Les vaccins disponibles présentement permettent de réduire l'intensité des signes cliniques et le taux de mortalité mais ne protègent pas contre l'infection (Taylor, 1999; Chiers *et al.* 1998; Fenwick & Henry, 1994). Les vaccins faits à partir de bactéries tuées induisent une réponse immunitaire vis-à-vis divers constituants bactériens, mais pas contre les toxines Apx. Ils confèrent une immunité séro-spécifique avec parfois, une immunité croisée avec des sérotypes partageant des antigènes de la membrane externe et/ou capsulaire (Nielsen, 1985 et 1984). Cette difficulté d'obtenir un vaccin conférant une immunité croisée est attribuable à l'existence de nombreux facteurs de virulence et des protéines immunogènes qui peuvent varier d'un sérotype à l'autre (Cruz *et al.*, 1996).

CHAPITRE II

Actinobacillus pleuropneumoniae

INTRODUCTION

Depuis les années 50, les connaissances sur la bactérie *A. pleuropneumoniae* ont grandement évolué. La bactérie a été classée dans le groupe de bactéries du genre *Haemophilus* et a été reclassée par la suite dans le groupe des bactéries du genre *Actinobacillus*. Jusqu'à maintenant, 15 sérotypes ont été identifiés. Les recherches permettent également de comprendre de façon plus précise par quels procédés la bactérie responsable de la pleuropneumonie porcine est en mesure de coloniser les poumons des porcs et de persister dans cet environnement. C'est donc dans cette optique que ce chapitre sera amorcé : il sera question de l'évolution de la classification d'*A. pleuropneumoniae* et des différences majeures entre les nombreux sérotypes en relation avec les facteurs de virulence et les protéines antigéniques d'*A. pleuropneumoniae*.

2.1 L'évolution taxonomique

A. pleuropneumoniae fait partie de la famille des *Pasteurellaceae* (Pohl *et al.*, 1983). Dès les premières mentions de la bactérie, dans les années 50, celle-ci est classée dans le groupe des bactéries du genre *Haemophilus* et porte le nom d'*H. parahaemolyticus* (Killian, 1976). Cette classification est basée sur les caractéristiques propres à ce genre : bacille Gram négatif, non mobile, capsulé et dépendant du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) pour sa croissance (Sebunya *et al.*, 1983; Biberstein *et al.*, 1977; Killian, 1976). En 1964, Shope propose le synonyme *Haemophilus pleuropneumoniae*, suite à l'identification formelle de cette bactérie comme étant la cause de la pleuropneumonie porcine. Enfin, en 1983, Pohl *et al.* proposent le transfert d'*H. pleuropneumoniae* au genre *Actinobacillus*. Cette proposition est principalement basée

sur l'homologie de la composition en guanine-cytosine (G-C) d'*H. pleuropneumoniae* et des bactéries du genre *Actinobacillus*. En effet, le pourcentage des résidus G-C chez *H. pleuropneumoniae* (43,2%) démontre une plus grande similarité avec les bactéries du genre *Actinobacillus*, comme *A. lignieresii*, (44%), qu'avec *H. influenzae* (38,5%). Cette différence est également confirmée par les résultats de divers tests biochimiques, de même que par l'aspect phénotypique (Pohl *et al.*, 1983). Le nom d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* est donc proposé et accepté.

2.2 Les sérotypes et les biotypes

Il existe au sein de l'espèce *A. pleuropneumoniae* plusieurs sérotypes. C'est-à-dire des différences au niveau de la génétique qui entraîne une variation dans la virulence des différents sérotypes selon l'expression des différentes protéines. De 1971 à 1986, 12 sérotypes sont identifiés sur la base de la diversité des polysaccharides capsulaires et dans certains cas, des lipopolysaccharides (pour une revue, voir Taylor, 1999). En 1986, Nielsen démontre la présence de deux sous-sérotypes chez le sérotype 5 : 5a et 5b. Cette distinction repose sur la différence des polysaccharides capsulaires. Le sérotype 1 est également subdivisé en deux sous-sérotypes, 1a et 1b, basé sur les différences antigéniques des lipopolysaccharides (Jolie *et al.*, 1994 et 1995).

En 1997, deux nouveaux sérotypes, 13 et 14, sont proposés suite à l'étude des nouvelles souches du biotype 2 isolés en 1989 (Nielsen *et al.*, 1997, Fodor *et al.*, 1989). Toutefois, des études supplémentaires devraient être réalisées afin de mieux analyser les caractéristiques antigéniques des isolats du biotype 2 dans le but de mieux les définir (Nielsen *et al.*, 1997). Quant au sérotype 15, il avait été classé à tort dans le sérotype 12, d'après les divers isolats provenant d'Australie (Blackall *et al.*, 1999). En 2002, il y a rectification et la souche de référence HS143 est classée dans un nouveau sérotype car le profil des toxines sécrétées par la bactérie ne correspond pas au profil du sérotype 12 (Figure 2.4). De plus, les anticorps produits par un porc convalescent permettent de faire la distinction entre ce sérotype et les autres (Blackall *et al.*, 2002).

Les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* se divisent en deux groupes distincts, le biovar 1 et le biovar 2. Le biovar 1 regroupe les bactéries dépendantes du NAD pour leur croissance. Ce groupe comprend les sérotypes 1 à 12 (incluant 5a et 5b) et le sérotype 15. Les souches de référence pour ces quatorze sérotypes sont respectivement Shope 4074, S-1536, S1421, M62, K17, L-20, Femo, WF83, 405, CVI13261, D13039, 56153 et 8329 et HS143 (les sérotypes 1a et 1b n'ont pas encore de souches de référence distinctes et les deux souches de référence pour le sérotype 5a et 5b sont K17 et L20) (Blackall, 2002; Mittal *et al.*, 1992). Le biovar 2 regroupe les sérotypes non dépendant du NAD pour leur croissance (Niven & Lévesque, 1988; Pohl *et al.*, 1983; Matthews & Pattison, 1961). Les sérotypes 13 et 14 sont les deux sérotypes connus du biotype 2 et ont comme souches de référence respectivement N-273 et 3906 (Nielsen *et al.*, 1997; Fodor *et al.*, 1989).

2.3 Les facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae* et leur immunogénicité

Un facteur de virulence est une protéine ou, une composante d'un organisme permettant le développement de la maladie. Ainsi, un facteur de virulence d'une bactérie participe à la pathogenèse de la maladie. Tandis qu'un immunogène est une composante cellulaire permettant la stimulation efficace du système immunitaire de l'animal atteint soit, la production d'anticorps protecteurs.

Durant l'établissement de la pleuropneumonie dans les poumons de porc, plusieurs composantes cellulaires sont considérées comme facteurs de virulence : les protéines impliquées dans les lésions tissulaires chez le porc ainsi que les protéines qui permettent à la bactérie *A. pleuropneumoniae* de survivre dans l'environnement pulmonaire (Tableau 2.1). Ce sont donc, en majorité, les protéines à la surface de la bactérie ou les protéines sécrétées qui ont un rôle à jouer dans l'induction et le développement de la maladie, tel que mentionné à la section 1.2. Ainsi, les LPS, la capsule et les exotoxines sont les facteurs de virulence les plus connus et qui expliquent le mieux les atteintes physiologiques chez l'animal. Ce sont trois composantes de la bactérie *A. pleuropneumoniae* en contact avec l'extérieur donc les plus susceptibles d'être

reconnues par le système immunitaire du porc et ainsi, induire une réponse humorale. En effet, l'organisme reconnaît les bactéries pathogènes par les composantes externes et non par les protéines du cytoplasme, hors d'atteinte des cellules du système immunitaire qui sont responsables de la reconnaissance des molécules étrangères.

D'un point de vue immunogène, ce ne sont pas tous les facteurs de virulence qui sont de bons candidats pour une utilisation dans la composition de vaccin contre *A. pleuropneumoniae*. L'existence des nombreux sérotypes au sein de cette espèce bactérienne demande une sélection particulière des protéines antigéniques. En effet, selon Cruz *et al*, (1996), pour qu'un antigène ait le potentiel d'induire une protection croisée contre les différents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*, il doit répondre à certains critères :

1. Être présent chez toutes les souches d'*A. pleuropneumoniae* sans égard pour le sérotype;
2. Provoquer la production d'anticorps chez le porc lors d'infection naturelle, indiquant ainsi que la protéine est bien produite au cours de l'infection chez l'hôte;
3. Être exposé à la surface de la bactérie afin d'être une cible facile pour les anticorps et les cellules phagocytaires.

La section qui suit se veut donc une analyse exhaustive des différents facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae*. Ceux-ci seront présentés, tant par leur importance dans l'établissement de la maladie que par leur caractère antigénique. Les caractéristiques des gènes codant pour ces protéines seront également exposées ainsi que la présence des différents gènes parmi les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Certaines protéines décrites n'ont pas encore été définies clairement comme étant des facteurs de virulence car leur rôle est encore incompris, mais seront quand même traitées étant donné leur caractère antigénique ainsi que leur virulence potentielle chez *A. pleuropneumoniae*.

TABLEAU 2.1

Les composantes cellulaires d'*A. pleuropneumoniae*, leurs rôles associés à la virulence ainsi que leur immunogénicité.

Composantes cellulaires		Rôles dans la virulence	I	Références
Capsule		Antiphagocytaire, empêche l'activation du complément, adhérence cellulaire	+	Ward <i>et al.</i> , 1998; Ward & Inzana, 1994; Inzana <i>et al.</i> , 1988
LPS		Adhésion cellulaire, stimule la production de cytokines inflammatoires	+	Paradis <i>et al.</i> , 1994 et 1999; Bélanger <i>et al.</i> , 1990 et 1994; Udèze <i>et al.</i> , 1987
Exotoxines Apx		Lyse cellulaire, stimule la production de cytokines inflammatoires	+	Prideaux <i>et al.</i> , 1999; Haesebrouck <i>et al.</i> , 1997; Maier <i>et al.</i> , 1996; Inzana <i>et al.</i> , 1991;
OMP	Tbp1 et Tbp2	Liaison à la transferrine du porc (source de fer)	+	Baltes <i>et al.</i> , 2001; Haesebrouck <i>et al.</i> , 1997; Deneer & Potter, 1989a
	AopA	Inconnu	+	Cruz <i>et al.</i> , 1996
	Inductible par le maltose	Séquestration du maltose exogène (source de nutriment)	?	Deneer & Potter, 1989b
	Fimbriae	Adhésion cellulaire	?	Zhang <i>et al.</i> , 2000; Pijoan & Trigo, 1990
	Lipoprotéine		+	Frey <i>et al.</i> , 1996
	PalA	Inconnu	+	Ito <i>et al.</i> , 1998; Bunka <i>et al.</i> , 1995; Gerlach <i>et al.</i> , 1993
	OmlA	Inconnu	+	
ApaA		Acquisition de nutriments essentiels à la bactérie	+	Martins & Mulks, 1999
RibA		Synthèse de la flavine, essentielle à la virulence	?	Fuller <i>et al.</i> , 1996; Fuller & Mulks, 1995
AroQ		Synthèse des composés aromatiques, essentielle à la virulence	?	Ingham <i>et al.</i> , 2002; Lalonde <i>et al.</i> , 1994
CysI		Synthèse des molécules de cystéine	+	Willson <i>et al.</i> , 2002
Protéases		Dégrade les IgA, l'actine et l'hémoglobine	?	Garcia-Cuellar <i>et al.</i> , 2000; Negrete-Abascal <i>et al.</i> , 2000; Negrete-Abascale, 1998
SOD		Protection contre les radicaux libres exogènes	?	Forest <i>et al.</i> , 2000; Langford <i>et al.</i> , 1996
Hydroperoxyde réductase		Protection contre les hydroperoxydes	?	Shea & Mulks, 2002
Uréase		Inconnu, essentielle à la virulence	?	Bossé <i>et al.</i> , 2000, 1997; Tascon <i>et al.</i> , 1997

Note : + : Stimule la production d'anticorps chez un modèle animal. ; ? : La capacité de stimuler la production d'anticorps n'est pas connue.

I : Antigène reconnu par les anticorps de sérum de porc convalescent. Les différents termes utilisés pour désigner les protéines se retrouvent dans le texte et sont expliqués individuellement.

2.3.1 La capsule

La capsule d'*A. pleuropneumoniae* est composée de polysaccharides qui forment une couche fluide et protectrice autour de la bactérie. Chez *A. pleuropneumoniae*, elle joue un rôle important dans la protection contre la phagocytose et elle participe à l'adhérence de la bactérie aux tissus de l'hôte (Ward & Inzana, 1994; Inzana *et al.*, 1988).

Lors de la formation de la capsule, deux étapes sont essentielles : l'assemblage et l'exportation des polysaccharides capsulaires vers l'extérieur de la bactérie. Deux régions possédant plusieurs gènes qui participent à la biosynthèse et à l'exportation des polysaccharides capsulaires d'*A. pleuropneumoniae* sont identifiées chez le sérotype 5a : *cps5ABCD* et *cpxDCBA* (Ward *et al.*, 1998, Ward & Inzana, 1997).

2.3.1.1 La biosynthèse des polysaccharides capsulaires

Ward *et al.* en 1998, identifient et caractérisent quatre gènes, qui appartiennent au même opéron et qui codent pour les protéines qui participent à la biosynthèse des polysaccharides capsulaires : *cps5A*, *cps5B*, *cps5C* et *cps5D* (Figure 2.1).

La présence de deux régions promotrices, indiquées par deux séquences consensus d'*Escherichia coli* à -10 (TATAAT) et à -35 (TTGACA) en amont de l'ATG de départ des gènes *cps5A* et *cps5D*, suggère deux possibilités lors de la transcription de l'opéron : un ARNm contenant le transcrit des quatre gènes de l'opéron et un ARNm où l'on retrouve seulement le transcrit du gène *cps5D* (Ward *et al.*, 1998)

Le rôle exact de chacune des protéines pour lesquelles codent ces gènes n'est pas encore connu. Toutefois, leur rôle au niveau de la virulence d'*A. pleuropneumoniae* semble être important. En effet, une souche mutante d'*A. pleuropneumoniae* qui n'exprime pas le produit des gènes *cps5ABC* ne fabrique pas de polysaccharides capsulaires; cette bactérie mutante inoculée chez le porc s'est avérée incapable d'induire la maladie. Ce

résultat démontre bien le caractère essentiel de ces trois protéines dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae* (Ward *et al.*, 1998).

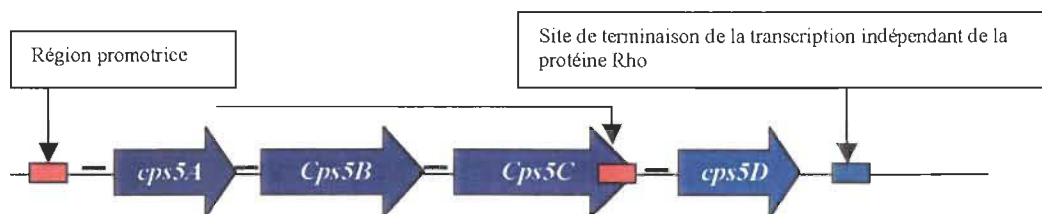


FIGURE 2.1. Organisation schématique des gènes de l'opéron *cps5ABCD*. Le sens des flèches indique le sens de la transcription des 4 gènes. Une région promotrice se trouve en amont des gènes *cps5A* alors qu'une deuxième région promotrice est située en amont du gène *cps5D*. Une séquence consensus Shine–Dalgarno se retrouve 13 pb en amont de chaque codon de départ : la position de la séquence consensus est indiquée par la courte ligne supplémentaire. Un palindrome se trouve en aval du gène *cps5D* et est caractéristique d'un site de terminaison de la transcription indépendant de la protéine Rho (adaptée de Ward *et al.*, 1998).

2.3.1.2. L'exportation des polysaccharides capsulaires

Une fois la synthèse des polysaccharides achevée, d'autres protéines entrent en jeu afin de les transporter vers l'extérieur de la bactérie pour former la capsule. Quatre gènes qui codent pour ces protéines sont identifiés (Ward & Inzana, 1997). Ces gènes, tout comme ceux qui participent à la biosynthèse des polysaccharides capsulaires, se retrouvent dans un même opéron (Figure 2.2).

Les séquences d'acides aminés déduites à partir de la séquence nucléotidique de chaque gène permettent de présumer la formation d'un transporteur de type ABC par les protéines CpxCBA. C'est-à-dire un transporteur membranaire formé par 3 protéines et qui utilise l'ATP (adénosine triphosphate) comme source d'énergie. Ces protéines permettraient donc de déplacer les polysaccharides capsulaires à travers la membrane cytoplasmique. La protéine CpxD semble être une protéine intégrale de la membrane externe et servirait au transport des polysaccharides capsulaires à travers la membrane externe.

Les gènes impliqués dans l'exportation des polysaccharides capsulaires se retrouvent chez les sérotypes 1, 2, 5a, 7 et 9. La présence de cet opéron chez les autres sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* n'a pas été vérifiée (Ward & Inzana, 1997).

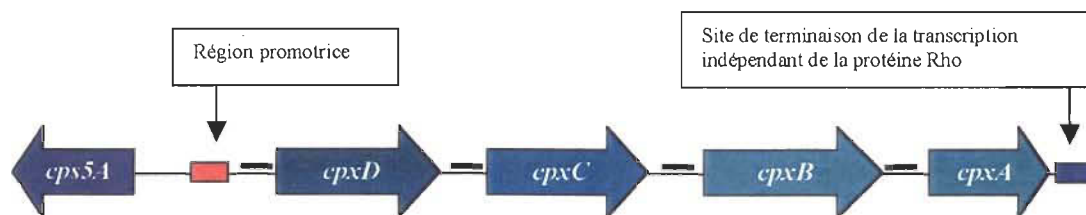


FIGURE 2.2 Organisation de l'opéron *cpxDCBA* chez *A. pleuropneumoniae* de sérotype 5a. Le sens des flèches indique le sens de la transcription des quatre gènes. L'opéron se situe en amont du gène *cps5A*. Une région promotrice caractérisée par deux séquences consensus à -10 (TATAAT) et -35 (TTGACA) se trouve en amont de l'ATG de départ du gène *cpxD*. Chaque codon de départ est précédé d'une séquence consensus Shine-Dalgarno : la position de la séquence consensus est indiquée par la courte ligne supplémentaire. Enfin, un palindrome (boîte bleue) est situé en aval du codon stop du gène *cpxA* et agirait comme site d'arrêt de la transcription indépendant de la protéine Rho (adapté de Ward & Inzana, 1997).

L'importance de la capsule dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae* a fait l'objet de plusieurs études. Entre autres, Rioux *et al.* (2000) démontrent qu'une mutation empêchant l'expression du gène *cpxC* de l'opéron *cpxDCBA* chez *A. pleuropneumoniae* des sérotypes 1 et 5a entraîne la formation de bactéries non capsulées et, conséquemment, moins virulentes chez le porc. Cette étude vient confirmer des résultats similaires obtenus par Ward *et al.* en 1998, mais également par d'autres équipes de recherche (Ward & Inzana, 1994; Rosandal & MacInness, 1990).

2.3.2 Les lipopolysaccharides

On retrouve les lipopolysaccharides (LPS) dans la membrane externe des bactéries Gram négatives. Chez *A. pleuropneumoniae*, comme chez les autres bactéries Gram négatives, les LPS sont composés de trois différentes parties (Figure 2.3).

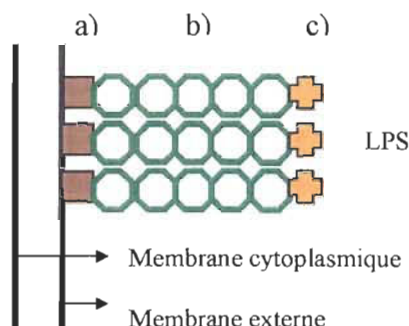


FIGURE 2.3 Schématisation d'un lipopolysaccharide a) le lipide A, ancré à la membrane externe et nommé endotoxine; b) le polysaccharide central et c) l'antigène O, un polysaccharide se trouvant à l'extrémité du LPS (adaptée de Rioux *et al.*, 1997b).

Suite à l'introduction de la bactérie pathogène au sein de l'hôte, l'une des premières étapes de l'infection est l'adhésion bactérienne. Il est démontré par Bélanger *et al.* (1990 et 1994), ainsi que par Paradis *et al.* (1994 et 1999a), que les LPS sont essentiels à l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules épithéliales de la trachée. Un autre rôle possible des LPS est illustré par Bélanger *et al.* (1995) lorsqu'ils établissent qu'*A. pleuropneumoniae* est en mesure d'utiliser l'hémoglobine de l'hôte pour sa croissance via les LPS. En effet, les LPS lient l'hémoglobine afin de permettre à la bactérie d'utiliser le fer résultant de la lyse des érythrocytes par les toxines à effet hémolytiques. Udèze *et al.* (1987) démontrent également que, lors d'une infection à *A. pleuropneumoniae*, les LPS sont responsables de dommages tels l'œdème et l'infiltration de neutrophiles au niveau des tissus pulmonaires.

Les LPS ont aussi la capacité de stimuler le système immunitaire du porc afin d'induire la production d'anticorps. Cependant, des essais de protection induite chez la souris à l'aide d'anticorps dirigés contre les LPS d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 5, démontrent que ce type de protection n'est pas efficace (Inzana *et al.*, 1988). Ces résultats sont confirmés par Rioux *et al.* (1997a). Ces derniers rapportent qu'effectivement, les LPS induisent la production d'anticorps chez l'hôte. Par contre, la protection acquise à l'aide de ces mêmes anticorps confère une défense dite séro-

spécifique, c'est-à-dire une protection contre des infections subséquentes causées par le sérotype auquel appartenait les LPS. En ce qui a trait à la caractérisation des gènes codant pour les protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport des LPS chez *A. pleuropneumoniae*, aucune donnée n'est encore disponible.

2.3.3 Les protéines sécrétées

2.3.3.1 Les exotoxines

Quatre différentes exotoxines sont produites par *A. pleuropneumoniae* (Schaller *et al.*, 1999; Frey *et al.*, 1993). Elles font partie de la famille des toxines dites « RTX toxins ». Ces toxines produites par plusieurs bactéries Gram négatives ont en commun une séquence répétée riche en glycine à leur extrémité C-terminale, d'où leur nom RTX, pour « Repeat in Toxin » (Lally *et al.*, 1999, Tascon *et al.*, 1996). Les toxines RTX ont la particularité d'être sécrétées dans l'organisme hôte. De cette façon, elles peuvent atteindre les cellules cibles, s'insérer dans la membrane, et ainsi former un canal membranaire perméable à certains ions, causant alors des dommages tissulaires (Lally, 1999; Maier *et al.*, 1996). Chez *A. pleuropneumoniae*, les toxines RTX portent les noms ApxI, ApxII, ApxIII et ApxIV, pour « *A. pleuropneumoniae* RTX-toxin » (Schaller *et al.*, 1999; Frey *et al.*, 1993). Ces exotoxines sont d'une grande importance car elles sont essentielles à la virulence de la bactérie (Maier *et al.*, 1996; Frey, 1995).

ApxI est une protéine de 105 kilodaltons (kDa) sécrétée par les sérotypes 1, 5, 9, 10, 11 et 14 (Blackall *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 1994b; Kamp *et al.*, 1991; Frey & Nicolet, 1990). Elle est fortement hémolytique et fortement cytolytique pour les macrophages alvéolaires et les neutrophiles (Kamp *et al.*, 1991).

ApxII est modérément hémolytique et cytotoxique pour les macrophages alvéolaires et les neutrophiles. Son poids moléculaire est d'environ 103 kDa (Jansen *et al.*, 1994b; Kamp *et al.*, 1991). Tous les sérotypes produisent cette toxine, à l'exception des

sérotypes 10 et 14 (Blackall *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 1992b; Kamp *et al.*, 1991).

ApxIII est une toxine de 120 kDa, ne possède pas d'activité hémolytique mais a une activité cytotoxique contre les macrophages alvéolaires et les neutrophiles. Les sérotypes 2, 3, 4, 6, 8 et 15 produisent cette toxine (Blackall *et al.*, 2002; Jansen *et al.*, 1994; Kamp *et al.*, 1991).

Enfin, une quatrième toxine de type RTX a été identifiée récemment : ApxIV (Schaller *et al.*, 1999). Le sérotype 1 produit ApxIV, une toxine de 202 kDa et, chez le sérotype 3, ApxIV a un poids moléculaire de 170 kDa. Il semblerait que cette différence soit due principalement à la variation du nombre de répétitions des séquences riches en glycine à l'extrémité C-terminale de la protéine (Schaller *et al.*, 1999). Tous les sérotypes possèdent la région codante *apxIVA* et la production *in vivo* de la protéine a été démontrées chez tous les sérotypes sauf pour le sérotype 15. Il semblerait que cette protéine ne soit pas exprimée *in vitro* (Blackall *et al.*, 2002; Cho & Chae, 2001; Schaller *et al.*, 2001 et 1999).

2.3.3.1.1 L'organisation des différents gènes *apx*

Les opérons de ces toxines sont bien caractérisés et contiennent quatre gènes distinctifs qui sont les gènes *apxC*, *apxA*, *apxB* et *apxD*, selon l'ordre de transcription. Le gène *apxC* code pour la protéine activatrice de la toxine. Cette activation consiste en l'ajout d'une chaîne d'acides gras sur une lysine au niveau de la section N-terminale de la protéine. C'est cette chaîne d'acides gras qui permettrait à la toxine d'amorcer la formation d'un canal membranaire dans la membrane des cellules eucaryotes (Lally *et al.*, 1999). Le gène *apxA* code pour la toxine inactive. Les gènes *apxB* et *apxD* codent pour des protéines associées à la membrane externe de la bactérie et sont nécessaires à la sécrétion de la toxine (Lally *et al.*, 1999; Frey *et al.*, 1993). L'organisation des quatre gènes des opérons des différentes toxines est caractéristique des toxines RTX et est représentée par l'organisation de l'opéron *apxICABD* (Figure 2.4). La présence d'une

région promotrice en amont des gènes *apxIC* et *apxIB* ainsi que la présence d'une région d'arrêt de la transcription indiquent plusieurs transcrits possibles ; un ARNm composé du transcrit des gènes *apxICA* inductible par le calcium et un deuxième, composé du transcrit des gènes *apxICABD* (Gygi *et al.*, 1992). La concentration élevée de calcium dans le milieu interstitiel pulmonaire différente de la concentration retrouvée chez les bactéries, permettrait à *A. pleuropneumoniae* de reconnaître cette différence en tant que signal pour la production et la sécrétion des exotoxines (Gygi *et al.*, 1992).

On retrouve dans l'opéron *apxI* les quatre gènes mentionnés ci-haut. L'opéron *apxII* possède, quant à lui, le gène codant pour la toxine, ainsi que celui pour la protéine activatrice conservée dans le même ordre pour la transcription. Les souches produisant la toxine ApxII utilisent donc le produit des gènes *apxIB* et *apxID* pour la sécrétion, à l'exception des souches du sérotype 3 où la sécrétion dépend du produit des gènes *apxIIIBD* (Jansen *et al.*, 1994b et 1992). Enfin, l'opéron *apxIII* est toujours présent en entier (Jansen *et al.*, 1994b). Ces trois toxines sont transcrites et traduites *in vivo* ainsi qu'*in vitro* (Frey *et al.*, 1993). En ce qui a trait à la toxine ApxIV, seulement deux gènes sont identifiés : le gène *apxIVA* avec, en amont, le gène activateur de la toxine (Figure 2.5) (Schaller *et al.*, 1999).

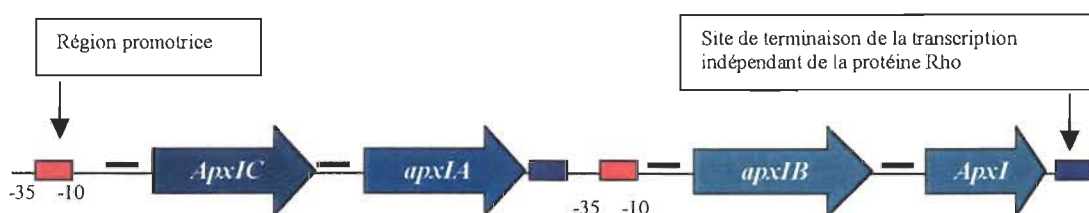


FIGURE 2.4 Représentation schématique de l'opéron *apxICABD* chez la bactérie *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1. Une séquence Shine-Dalgarno se trouve en amont de l'ATG de départ de chaque gène : la position de la séquence consensus est indiquée par la courte ligne supplémentaire. Un palindrome caractéristique d'un site d'arrêt de la transcription se trouve en aval des gènes *apxIA* et *apxID*. Enfin, une région promotrice (boîte rouge) caractérisée par deux séquences consensus se trouve en amont des gènes *apxIC* et *apxIB* (adaptée de Frey *et al.*, 1991 et Smits *et al.*, 1991).

En 1999, Schaller *et al.* caractérisent *apxIVA* chez les sérotypes 1 et 3 d'*A. pleuropneumoniae*. En amont de l'ATG de départ se trouve une séquence consensus Shine-Dalgarno. En aval se trouve une séquence potentielle d'arrêt de la transcription indépendante de la protéine Rho. La longueur d'*apxIVA* varie d'un sérotype à l'autre, selon le nombre de répétitions de la séquence riche en glycine à l'extrémité C-terminale (Schaller *et al.*, 2001 et 1999). ApxIV du sérotype 3 possède 14 répétitions de la région riche en glycine alors que le sérotype 1 en présente 24 (Schaller *et al.*, 1999). En aval du gène *apxIVA*, chez les deux sérotypes étudiés, se trouve une séquence caractéristique d'un site d'arrêt de la transcription dépendante de la protéine Rho. Un cadre ouvert de lecture (ORF, open reading frame) est présent en amont du gène *apxIVA* et celui-ci est précédé d'une région promotrice. La protéine produite par cet ORF est essentielle à l'activité de la toxine ApxIV; cette protéine n'a aucune homologie avec ApxC produite par le gène *apxIC*, *apxIIC* ou *apxIIIC* (Figure 2.5) (Schaller *et al.*, 1999).

2.3.3.1.2 Les toxines Apx : leur rôle dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae* et leur antigénicité.

La virulence d'*A. pleuropneumoniae* est en grande partie expliquée par la présence des exotoxines. Comme il a été mentionné précédemment, ces protéines forment des pores membranaires entraînant la lyse des cellules du porc telles les érythrocytes, les macrophages et les neutrophiles. Certains résultats démontrent également qu'il y a une corrélation entre le nombre de toxines secrétées et le degré de virulence d'*A. pleuropneumoniae*. Les sérotypes produisant les trois toxines démontreraient une plus grande virulence que ceux ne produisant qu'une toxine (Frey, 1995). De plus, les sérotypes qui produisent la toxine ApxI seraient également plus virulents. Cette hypothèse est confirmée par la virulence modérée des sérotypes du biotype 2 qui produisent seulement la toxine ApxII (Dom *et al.*, 1992).

Un essai d'immunisation de porcs à l'aide d'une souche ne sécrétant aucune toxine s'est avéré inefficace pour protéger les porcs contre une infection à *A. pleuropneumoniae*. (Haesbrouck *et al.*, 1997; Inzana *et al.*, 1991). Ces résultats démontrent que les toxines

doivent être utilisées dans la composition de vaccins faits à partir des composantes de la bactérie. La même expérience a été reprise par Prideaux *et al.* (1999), mais cette fois, c'est le gène activateur de toxine d'*A. pleuropneumoniae* (*apxIIC*) de sérotype 7 qui est inactif. De cette façon, la bactérie produit la toxine mais celle-ci demeure inactive. Cette souche a démontré une virulence atténuée et lors des essais d'immunisation, a conféré une protection efficace contre une infection à *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1. Ce genre de vaccin fabriqué à partir de bactéries vivantes assure une protection croisée contre les différents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

2.3.3.2 Les protéases

A. pleuropneumoniae de sérotype 1 sécrète dans le milieu des protéases de différents poids moléculaires. Ces protéases dégradent les IgA de porc, l'actine (composante du cytosquelette cellulaire) ainsi que l'hémoglobine porcine. Cette activité envers l'hémoglobine est très intéressante car il pourrait s'agir d'un mécanisme d'acquisition de fer (Negrete-Abascal *et al.*, 1994). De plus, il est intéressant de noter qu'*A. pleuropneumoniae* libère dans le milieu environnant des vésicules contenant des toxines Apx ainsi que des protéases. Ce mécanisme pourrait être une façon pour la bactérie d'éviter l'action antibactérienne de l'hôte et ainsi produire des dommages tissulaires accrus (Negrete-Abascal *et al.*, 2000). *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 produit une protéase de 200 kDa qui peut être isolée à partir d'un surnageant de culture. Cette protéase est reconnue par les anticorps contenus dans le sérum de porcs convalescents à la pleuropneumonie induite par les sérotypes 1, 2, 5, 8 et 9 (Negrete-Abascal, 1998). *A. pleuropneumoniae* produit également une métalloprotéase de 24 kDa (Garcia-Cuellar *et al.* 2000). Cette protéine, présente chez les sérotypes 1 à 12, est reconnue elle aussi par les anticorps contenus dans le sérum de porcs convalescents. Les protéases pourraient donc jouer un rôle important dans la stimulation du système immunitaire de l'hôte. Aucune donnée sur les gènes qui codent pour ces protéines n'est encore disponible.

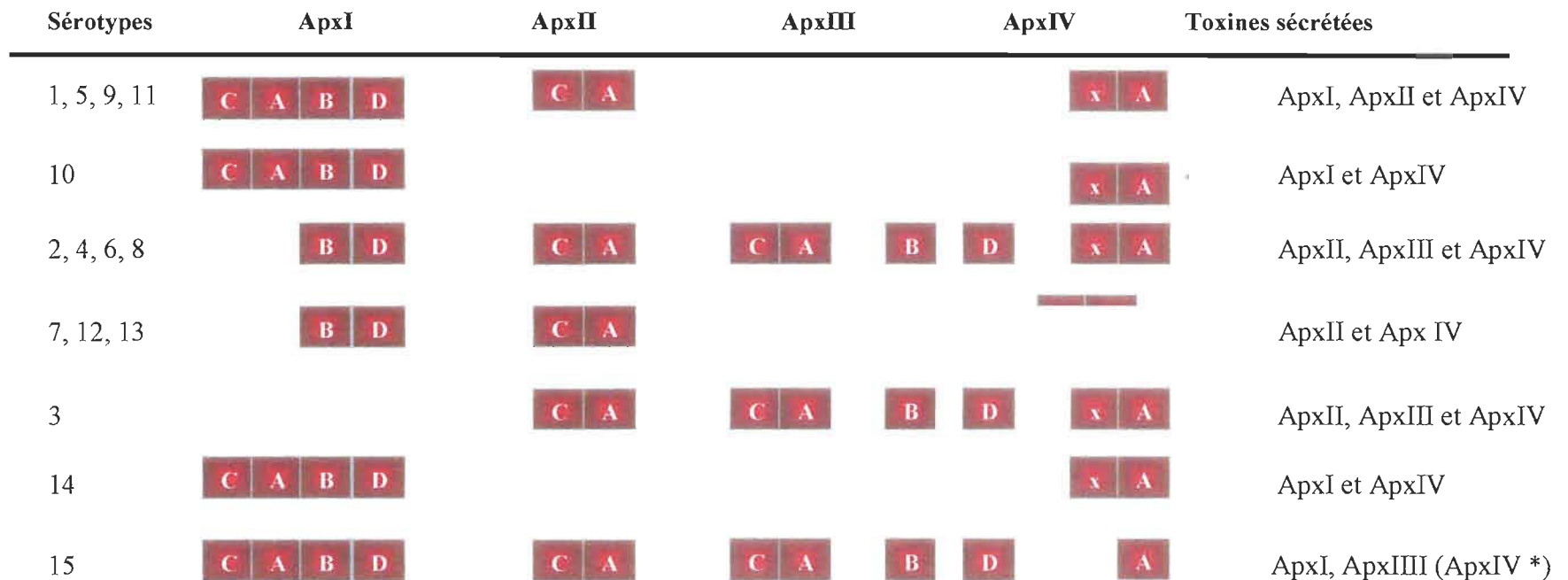


FIGURE 2.5. Représentation schématique de l'organisation des différents opérons des toxines Apx chez les différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. C : gène codant pour la protéine activatrice de la toxine. A : gène codant pour la toxine. B et D : gènes codant pour les deux protéines essentielles à la sécrétion des toxines. X : gène codant pour la protéine activatrice de la toxine ApxIV. * L'expression d'ApxIV chez le sérotype 15 est encore incertain (Blackall *et al.*, 2002; Cho & Chae, 2001; Schaller *et al.*, 2001 et 1999; Jansen *et al.*, 1994 et 1992; Frey *et al.*, 1993; Kamp *et al.*, 1991; Frey & Nicolet, 1990).

2.3.4 Les protéines de la membrane externe

Tel que déjà précisé précédemment, la majorité des facteurs de virulence sont des protéines de la membrane externe. De plus, les protéines immunogènes chez le porc sont des protéines exposées à l'extérieur de la bactérie, c'est-à-dire des protéines ancrées dans la membrane externe (Haesbrouck *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 1996). La production de certaines de ces protéines est inductible dans des conditions particulières telles qu'en restriction de fer, ou encore en restriction de maltose (Deneer & Potter, 1989a et 1989b). Ceci laisse présumer que dans certaines conditions propres à l'hôte, la bactérie pourrait exprimer certaines protéines essentielles à un stade d'infection particulier ou exprimer des protéines conférant à la bactérie la capacité de s'adapter au milieu environnant afin de favoriser sa survie.

L'importance des protéines de la membrane externe dans l'induction de la pleuropneumonie et dans la stimulation de la production d'anticorps protecteurs par le porc est également illustrée par Twahits et Kadis (1991) et par Beudet *et al.* (1994). Twahits et Kadis réussirent à isoler quatre protéines de la membrane externe d'*A. pleuropneumoniae*. Ils démontrent dans un premier temps que ces protéines sont immunogènes chez le porc et, dans un deuxième temps, que les anticorps produits permettent d'augmenter la phagocytose d'*A. pleuropneumoniae* par les macrophages pulmonaires du porc. D'autres établissent que des extraits de membrane externe permettent de stimuler le système immunitaire du porc (Beudet *et al.*, 1994).

2.3.4.1 Les protéines de fixation à la transferrine

En 1995, Gonzalez *et al.* caractérisent deux gènes codant pour des protéines de liaison à la transferrine chez *A. pleuropneumoniae* de sérotype 7 : *tbpA* et *tbpB*. Le gène *tbpA* code pour une protéine, Tbp1, de 102 kDa (Gonzalez *et al.*, 1995). La région N-terminale de la protéine est caractéristique d'une séquence codant pour une séquence d'exportation (« leader peptide ») et en position 23 se situe le site de clivage par l'enzyme « leader peptidase ». Le gène *tbpB* code pour une protéine de 60 kDa (Gonzalez *et al.*, 1995; Gerlach *et al.*, 1992a et 1992b). Les dix-neuf

premiers acides aminés de la protéine Tbp2 forment la séquence d'exportation avec une cystéine en position 20, indiquant un site de clonage pour une « leader peptidase » (Gerlach *et al.*, 1992a et 1992b). Les deux gènes sont organisés dans un même opéron (Figure 2.6) (Tonpitak *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 1995).

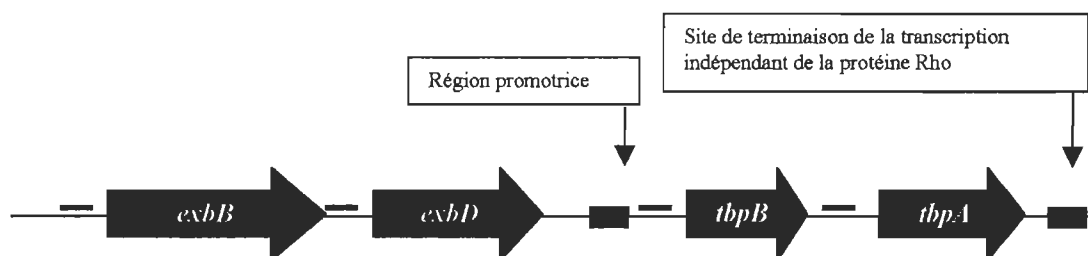


FIGURE 2.6 Organisation de l'opéron *exbBD-tbpBA* d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 5. Les doubles lignes indiquent les régions où se trouve une séquence consensus caractéristique de la séquence Shine-Dalgarno. En amont du gène *tbpB*, on retrouve, en position -10 et -35, une région promotrice caractérisée par deux séquences consensus de *E. coli* : TATAAT et TTGACA respectivement. Une région d'arrêt de la transcription indépendante de la protéine Rho se trouve en aval du gène *tbpA* (adaptée de Gonzalez *et al.*, 1995).

Les protéines ExbBD semblent toutes les deux essentielles au mécanisme par lequel *A. pleuropneumoniae* acquiert le fer suite à la fixation à la transferrine à l'aide de TbpAB. À ce jour, malgré l'identification d'une seule région promotrice en amont du gène *tbpB*, le seul transcrit identifié contenait le transcrit des gènes *exbBD - tbpB*. Ce résultat nous indique qu'il existe un autre promoteur en amont de ces gènes qui est régulé par le fer. Cette organisation génétique de l'opéron, d'abord caractérisée chez le sérotype 7, semble se retrouver chez les sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae* (Tonpitak *et al.*, 2000).

La protéine TbpA forme un canal transmembranaire au niveau de la membrane externe et TbpB est une lipoprotéine ancrée à la membrane externe via un lipide. Ces protéines sont importantes dans le mécanisme d'absorption du fer via la transferrine et sont présentes lorsqu'*A. pleuropneumoniae* se retrouve dans des conditions limitantes en fer (Haesebrouck *et al.*, 1997; Deneer & Potter, 1989a). De plus, Baltes *et al.* (2001) confirment que la protéine TbpB de fixation à la transferrine est essentielle à la virulence d'*A. pleuropneumoniae*. En effet, le mutant qui n'exprime plus la protéine TbpB n'est plus en mesure d'utiliser le fer provenant

de l'hôte, et est donc dans l'impossibilité de causer la maladie. Wilke *et al.*, (1997), ainsi que Rossi-Campos *et al.* (1992) démontrent que TbpA et TbpB, les deux protéines de fixation à la transferrine chez *A. pleuropneumoniae*, sont hautement immunogènes et induisent une immunité protectrice chez le porc.

2.3.4.2 Protéine de la membrane externe, AopA

Des extraits de membrane externe d'*A. pleuropneumoniae* permettent l'identification d'une protéine de 48 kDa par Cruz *et al.* (1996). La protéine porte le nom de AopA pour « *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein ». Cette protéine isolée du sérotype 5 ainsi que du sérotype 1a, induit la production d'anticorps chez le porc. L'immunisation, ainsi acquise, permet une protection contre des infections subséquentes à *A. pleuropneumoniae* des sérotypes 5 et 1a. La protéine AopA est donc intéressante pour son potentiel antigénique. Outre sa capacité à induire une production d'anticorps chez le porc, l'intérêt pour cette protéine provient également de sa présence chez tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (toutefois, aucune donnée n'est disponible pour les sérotypes 13, 14 et 15 qui étaient alors inconnus) (Cruz *et al.*, 1996).

Aucune séquence homologue à une séquence d'exportation n'est présente dans le gène. Par conséquent, la séquence nucléotidique du gène associé à la protéine ne donne aucun indice quant au mode de transport jusqu'à la membrane externe. Aucune séquence ne correspond aux séquences consensus de *E. coli* permettant d'identifier une région promotrice et une séquence Shine-Dalgarno en amont de l'ATG de départ (Cruz *et al.*, 1996). Ce qui implique probablement que ce gène se retrouve dans un opéron.

2.3.4.3 La protéine inductible au maltose

Lorsque *A. pleuropneumoniae* croît dans des conditions limitantes en maltose, c'est-à-dire dans des conditions où le maltose est en faible concentration, la bactérie augmente la production d'une protéine de 42 kDa (Deneer & Potter, 1989b). Cette protéine agirait comme un canal membranaire permettant le passage du maltose

exogène à travers la membrane externe. Les sérotypes étudiés, soit les sérotypes 1 à 7, produisent cette protéine. De plus, la protéine produite par chaque sérotype est reconnue par les anticorps contenus dans le sérum d'un porc convalescent à la pleuropneumonie porcine causée par *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 (Deneer & Potter, 1989b). Cependant, toutes les souches ne réagissent pas à une diminution du maltose dans le milieu environnant. En effet, parmi les différentes souches des sérotypes étudiées une variabilité a été observée dans l'intensité de la réponse de la bactérie au sein des différentes souches d'un même sérotype. Certaines souches étaient même insensibles à ce changement. Toutefois, il n'a pas encore été établi que la variabilité de la réponse à la diminution de maltose pourrait correspondre à la variabilité de la virulence d'*A. pleuropneumoniae*. (Deneer & Potter, 1989b). Le gène codant pour cette protéine n'a pas encore été caractérisé.

2.3.4.4 Les fimbriae

Les fimbriae apparaissent être importants lors de l'adhésion des bactéries pathogènes aux cellules de l'hôte parasité (Pijoan & Trigo, 1990). L'étude réalisée par Utrera et Pijoan (1991) démontrent que, chez *A. pleuropneumoniae*, les fimbriae s'expriment sous certaines conditions. Ainsi, une souche isolée à partir d'un modèle animal et ensemencée sur un milieu de culture, perd l'expression des fimbriae. Zhang *et al.* (2000), identifient un fimbriae de type 4 chez *A. pleuropneumoniae* : la sous-unité de 17 kDa est présente chez les sérotypes 1, 2, 7 et 12.

2.3.5 Les lipoprotéines

2.3.5.1 La lipoprotéine PalA

Frey *et al.*, en 1996, isolèrent une protéine de la membrane externe, fortement immunogène, de 14 kDa présente chez les sérotypes 1 à 12. Peu de données sont présentement disponibles quant à son rôle dans la virulence de cette protéine. Par contre, sa capacité à induire une forte réponse immunitaire chez le porc donne déjà des indications sur l'importance que cette protéine pourrait avoir dans le diagnostic sérologique de la maladie et dans la production d'un vaccin (Frey *et al.*, 1996).

Le gène codant pour PalA est précédé par une séquence consensus caractéristique Shine-Dalgarno, 6 pb (paires de bases) en amont de l'ATG de départ. Au début de la région codante se trouve une séquence codant pour une séquence d'exportation. Cette séquence se caractérise par une région hydrophobe typique des lipoprotéines, Leucine-Alanine-Alanine-Cystéine. Au niveau du site de clivage de l'enzyme « signal peptidase II » on retrouve une Cys²⁰ et une Ser²¹, ce qui est caractéristique des protéines de la membrane externe (Frey *et al.*, 1996).

2.3.5.2 OmlA, une lipoprotéine de la membrane externe

Le gène *omlA* d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 est identifié par Gerlach *et al.* (1993). Ce gène, de 1083 pb, code pour une protéine de 39 kDa. La région codante est précédée, à 8 pb en amont de l'ATG de départ, d'une séquence consensus Shine-Dalgarno. Une région riche en résidus alanine et thymine en position -10 et -30 en amont du codon de départ, est caractéristique de la séquence consensus des promoteurs de *E. coli*. Enfin, en aval du codon stop, un palindrome de 26 pb est typique d'une région de terminaison de la transcription indépendante de la protéine Rho.

Les 19 premiers acides aminés de la protéine sont caractéristiques d'une séquence d'exportation d'une lipoprotéine avec une Cys²⁰. Le gène *omlA* est présent chez les sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae*. Aucune mention n'est encore faite en ce qui concerne les sérotypes 13, 14 et 15. Les sérotypes 2, 8, 9, 11 et 12 produisent une protéine homologue détectée par le sérum produit à partir de OmlA d'*A. pleuropneumoniae* sérotype 1 (Gerlach *et al.*, 1993).

A. pleuropneumoniae sérotype 7 produit également une lipoprotéine identifiée sous le nom de OmlA (OmlA₇) (Ito *et al.*, 1998). Cette lipoprotéine présente une forte homologie avec OmlA du sérotype 1 (OmlA₁) et OmlA du sérotype 5 (OmlA₅) (Ito *et al.*, 1998; Bunka *et al.*, 1995; Gerlach *et al.*, 1993). Bunka *et al.* (1995) ont déterminé que les protéines OmlA provenant des sérotypes 5a, 5b et 10 présentent de fortes homologies entre elles. Des analyses subséquentes permettent de déterminer la présence d'une protéine homologue chez les sérotypes 3, 4, 6 et 7 (Ito *et al.*, 1998).

Ito *et al.* (1998) présentèrent donc OmlA comme une protéine produite par tous les sérotypes mais arborant un profil antigénique permettant de les classer en trois catégories selon leur similarité avec OmlA₁, OmlA₅ ou OmlA₇. Aucun résultat ne démontre encore l'absence ou la présence de cette protéine chez *A. pleuropneumoniae* des sérotypes 13, 14 ou 15.

La capacité de la lipoprotéine OmlA à induire une réponse humorale a été étudiée par plusieurs équipes de recherche. Il semble que cette protéine soit en mesure d'assurer une immunité partielle contre les souches homologues d'*A. pleuropneumoniae*. En effet, les résultats d'études menées par Bunka *et al.* (1995), ainsi que par Gerlach *et al.* (1993) démontrent qu'OmlA provenant d'*A. pleuropneumoniae* des sérotypes 1 et 5 induisent toutes les deux la production d'anticorps. Cette dernière est efficace afin de prévenir l'évolution mortelle de la maladie. Malheureusement, la protection ainsi induite ne prévient pas l'infection à *A. pleuropneumoniae* de même sérotype (Bunka *et al.*, 1995; Gerlach *et al.*, 1993).

2.3.5.3 La lipoprotéine ApaA

Un gène codant pour une protéine immunogène de 29 Kda ayant une forte homologie avec un transporteur de type ABC est identifié chez *A. pleuropneumoniae* de serotype 5 (Martin & Mulks, 1999). Cette protéine pourrait avoir un rôle dans l'absorption de nutriments essentiels à la survie de la bactérie dans l'hôte, et ainsi, être importante dans les mécanismes de pathogenèse (Martins & Mulks, 1999). La séquence du gène est précédée d'une séquence consensus Shine-Dalgarno à 5 pb en amont de l'ATG de départ. En aval du gène se retrouve une séquence répétée inversée de 16 pb qui correspondrait à une région de terminaison de la transcription indépendante de la protéine Rho. La région N-terminale de la protéine contient 22 acides aminés qui forment une région hydrophobe agissant comme une séquence d'exportation. Cette séquence contient également un site de clivage en avant de la cystéine située en position 23. En position 24 se situe un résidu aspartate, indiquant que la protéine sera située dans l'espace périplasmique et non au niveau de la membrane externe (Martins & Mulks, 1999).

2.3.6 Les protéines cytoplasmiques

Il est évident que les protéines cytoplasmiques ne sont pas celles qui participent à la stimulation de la réponse humorale chez l'hôte. Par contre, elle sont intéressantes par leur participation à la virulence bactérienne en favorisant la survie de la bactérie dans l'animal hôte. Ces protéines sont donc très intéressantes afin de produire des vaccins à partir de bactéries vivantes. Les bactéries incluent dans ce type de vaccin pourraient stimuler la production d'une réponse humorale par l'hôte tout en ayant une durée de vie raccourcie les empêchant d'induire la maladie.

2.3.6.1 Les protéines pour la biosynthèse de la riboflavine

La riboflavine (vitamine B₂), un précurseur de la coenzyme flavine est essentielle au métabolisme de base des bactéries. Plusieurs bactéries pathogènes sont incapables d'utiliser la flavine exogène et dépendent donc de la production endogène de riboflavine (Fuller & Mulks, 1995). Quatre gènes, organisés dans un même opéron, sont impliqués dans la biosynthèse de la riboflavine chez *A. pleuropneumoniae* de sérotype 5: *ribGBAH* (Figure 2.7).

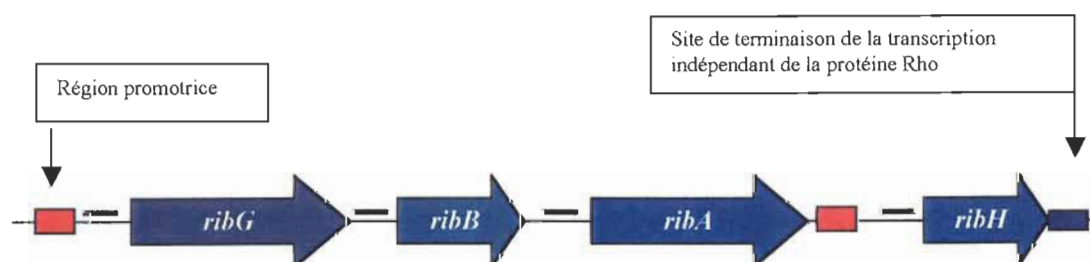


FIGURE 2.7 Schéma représentant l'opéron des gènes impliqués dans la biosynthèse de la riboflavine chez *A. pleuropneumoniae* de sérotype 5. Chaque gène est précédé d'un site de liaison au ribosome (représentée par une ligne supplémentaire). On retrouve également en amont du gène *ribG* et du gène *ribH*, deux séquences consensus d'une région promotrice situées à -10 et -35 de l'ATG de départ. Une séquence répétée en aval du gène *ribH* pourrait agir comme une séquence d'arrêt de la transcription indépendante de la protéine Rho (Adaptée de Fuller & Mulks, 1995).

Afin de bien déterminer l'importance de cette protéine quant à la virulence de la bactérie, une souche mutante au niveau des gènes *ribA* et *ribB* d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 a été produite (Fuller *et al.*, 1996). Cette souche mutante s'est avérée incapable d'induire la maladie, même à de fortes doses d'inoculation chez le porc. Lors de la restauration de l'opéron, cette même souche a recouvré la capacité de causer la maladie et de croître sans source de riboflavine exogène. Un vaccin vivant fut donc élaboré par Fuller *et al.* en 2000 à partir d'une souche d'*A. pleuropneumoniae* avirulente. Ce nouveau vaccin permis de protéger des porcs, de façon significative, contre de subséquentes infections (Fuller *et al.*, 1996).

2.3.6.2 L'enzyme 3-déhydroquinase

Lalonde *et al.* (1994) se sont intéressés à l'enzyme 3-déhydroquinase car chez *E. coli* elle est essentielle à la synthèse du précurseur de l'acide folique, élément indispensable au métabolisme bactérien. Cette enzyme, la 3-déhydroquinase (AroQ), est également nécessaire au cycle de biosynthèse de certains composés aromatiques : le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Étant donné qu'*A. pleuropneumoniae* est en mesure de croître dans un milieu sans tryptophane, cela implique l'existence d'une voie métabolique pour la synthèse des composés aromatiques (Lalonde *et al.*, 1994).

Afin de vérifier l'importance de ce gène dans la virulence d'*A. pleuropneumoniae*, une souche mutante du sérotype 1 n'exprimant pas AroQ a été inoculée chez le porc. Les résultats illustrent que cette souche est significativement moins virulente que la souche sauvage chez le porc et que cette mutation affecte la durée de vie de la bactérie chez l'hôte. En effet, après seulement six jours d'infection, la bactérie mutante n'a pu être isolée à partir des poumons des porcs infectés (Ingham *et al.*, 2002). Des travaux restent encore à faire quant à savoir si une protection contre la pleuropneumonie est possible à l'aide de cette souche mutante (Ingham *et al.*, 2002).

La région codante pour le gène *aroQ* est identifiée par Lalonde *et al.* (1994). Le gène *aroQ* code pour une protéine d'environ 22,6 kDa.

2.3.6.3 L'hémoprotéine NADPH-sulfite réductase

L'hémoprotéine NADPH-sulfite réductase (CysI) participe à la synthèse de la cystéine chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium* (Ostrowski *et al.*, 1989). Chez *A. pleuropneumoniae* la région codante pour cette protéine fait partie d'un opéron constitué de 3 gènes : *cysJ*, *cysI* et *cysH* (Willson *et al.*, 2001). Même s'il s'agit d'une protéine cytoplasmique, elle peut quand même avoir un rôle important dans la défense de l'hôte. En effet, lors du processus d'infection par une bactérie, des antigènes sont libérés à la mort des bactéries. Ces protéines peuvent être reconnues par le système de défense de l'animal et ainsi stimuler la production d'anticorps protecteurs (Mosier *et al.*, 1998). Les protéines CysI provenant d'*A. pleuropneumoniae* des sérotypes 1 et 5a ont donc été utilisées afin d'induire une immunité chez le porc. Cette protéine s'est avérée fortement antigénique que ce soit pour le sérotype 1 ou 5a. L'observation des porcs immunisés, suite à une induction de la maladie par *A. pleuropneumoniae* avec le sérotype homologue a permis de constater une diminution de 70% du taux de mortalité chez les porcs (Willson *et al.*, 2001). Ce résultat démontre donc l'importance de la protection induite par la protéine CysI contre des infections à *A. pleuropneumoniae*.

Le gène codant pour cette protéine a une longueur de 1766 pb et code pour une protéine de 66,5 kDa. Le gène est précédé d'une séquence consensus Shine-Dalgarno (AGGAG) 7 pb en amont de l'ATG de départ (Willson *et al.*, 2001).

2.3.6.4 La superoxyde dismutase

A. pleuropneumoniae produit deux superoxydes dismutases : SodA et SodC (Langford *et al.*, 1996). La région codant pour l'enzyme superoxyde dismutase Cu-Zn dépendante (SodC) est identifiée par Langford *et al.* (1996) chez le sérotype 3 d'*A. pleuropneumoniae*. Le gène, de 1038 pb, code pour une protéine de 18 kDa. En positions -10 et -35, en amont de l'ATG de départ, se trouve la région promotrice caractérisée par une séquence consensus d'*E. coli*. Un palindrome en aval du gène est identifié comme région de terminaison de la transcription indépendante de la protéine Rho. La séquence en acides aminés permet d'identifier localisée dans les 23 premiers acides aminés une séquence d'exportation avec une

séquence Alanine-Histidine-Alanine, caractérisant le site de clivage d'une « leader peptidase ».

La protéine SodC est à distinguer de SodA qui est responsable du contrôle des radicaux superoxydes endogènes (Forest *et al.*, 2000). SodC est, quant à elle, responsable du contrôle des radicaux superoxydes déchargés par les neutrophiles et les macrophages lors de l'infection (Forest *et al.*, 2000; Langford *et al.*, 1996). Si l'on considère que l'inflammation provoquée lors d'une infection à *A. pleuropneumoniae* est principalement modulée par la présence et l'action des macrophages alvéolaires ainsi que des neutrophiles (Huang *et al.*, 1999), il est raisonnable de spéculer que cette enzyme, chez *A. pleuropneumoniae*, pourrait jouer un rôle dans la virulence de la bactérie, surtout en ce qui a trait aux mécanismes d'adaptation à son milieu (Langford *et al.*, 1996). Par contre, les résultats d'une étude menée par Sheehan *et al.*, parus en 2000, démontrent que l'induction de la pleuropneumonie chez le porc, suite à l'introduction d'une souche qui n'exprime pas l'enzyme SodC, est pleinement efficace. Les données sur SodC demeurent insuffisantes pour la détermination de son rôle exact ou pour confirmer l'utilité de cette enzyme dans la composition de nouveaux vaccins.

2.3.6.5 L'hydroperoxyde réductase

Shea et Mulks (2002) identifient l'hydroperoxyde réductase par une technique d'identification de gènes induits en condition *in vivo* (IVET : *In vivo* Expression Technology), lors d'une infection chez le porc par *A. pleuropneumoniae*. Ce gène, d'une longueur de 423 pb, code pour une protéine de 143 acides aminés. En amont du gène se trouve une séquence Shine-Dalgarno et en aval du codon stop se trouve une palindromie oeuvrant probablement comme site de terminaison de la transcription (Shea & Mulks, 2002).

Cette enzyme chez d'autres bactéries pathogènes n'est produite qu'en présence d'hydroperoxydes et non de peroxydes d'hydrogène ou de superoxydes. Les hydroperoxydes sont des lipides oxydés qui ne sont pas détoxifiés par la SodC ni par la SodA. Cette classe de radicaux oxygénés peut être produite soit par les phagosomes suite à la phagocytose des bactéries par les macrophages, soit par le

contact de certains radicaux libres avec la membrane cellulaire des cellules eucaryotes (Miller & Britigan, 1997). Peu de données sont présentement disponibles quant à l'implication de cette enzyme dans la virulence de la bactérie. Par contre, il est intéressant de noter que les sérotypes 2, 8, 10 et 12 d'*A. pleuropneumoniae* n'ont pas de région codant pour cette enzyme et sont sensibles aux stress oxydatifs induits par la présence de n'importe quels radicaux libres. Cette nouvelle enzyme pourrait donc jouer un rôle dans la protection de la bactérie contre certains radicaux oxygénés se trouvant dans l'environnement de la bactérie lors d'infection chez l'hôte par d'*A. pleuropneumoniae* (Shea & Mulks, 2002).

2.3.6.6 L'uréase

En 1997, Bossé *et al.* démontrent qu'*A. pleuropneumoniae* possède la même organisation génétique pour la production d'une uréase active chez un grand nombre de bactéries comme démontré par Burne & Chen (2000). Les gènes *ureABC* se trouvent au début de l'opéron, suivi des gènes *ureDEFG*. La région de 615 pb entre *ureABC* et *ureDEFG* contient un ORF codant pour une protéine inconnue, UreX. (Bossé & MacInnes, 1997). L'enzyme uréase est composée de trois sous-unités : α , β et γ . Ces dernières sont les produits des gènes *ureABC* (Bossé & MacInnes, 1997). La biosynthèse d'une uréase active demande l'expression des quatre gènes accessoires *ureDEFG*. La protéine UreE agit comme transporteur nickel, élément essentiel à l'activité de l'uréase. Les protéines UreDFG agissent comme protéines stabilisatrices afin de permettre à l'enzyme de préserver sa conformation pour fixer le nickel (Burne & Chen, 2000).

Des essais avec des souches mutantes qui ne présentent pas d'activité de l'uréase, suggèrent que cette enzyme est nécessaire à *A. pleuropneumoniae* afin de pouvoir induire la maladie (Bossé *et al.*, 1997, 2000). En effet, lors d'une infection avec une souche mutante d'*A. pleuropneumoniae* inapte à produire une uréase active, cette souche s'est avérée incapable de causer la pleuropneumonie (Bossé *et al.*, 2000). Des résultats contradictoires rapportent cependant que la présence ou l'absence de l'uréase chez *A. pleuropneumoniae* n'aurait pas d'incidence sur sa virulence (Tascon *et al.*, 1997).

2.4 Conclusion

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, la bactérie pathogène responsable de la pleuropneumonie porcine, *A. pleuropneumoniae*, produit un grand nombre de protéines responsables de différents processus essentiels à l'introduction et au maintien de la bactérie dans l'organisme hôte, c'est-à-dire à l'infection du porc par la bactérie. De plus, le grand nombre de sérotypes présents à travers le monde augmente la complexité de l'étude de cette bactérie, d'autant plus qu'il existe une variation dans la virulence de chacune des souches. L'hétérogénéité des protéines produites par les différents sérotypes est à l'origine de la variation observée de la virulence. Des vaccins existent présentement mais aucun ne s'avère pas totalement efficace dans la prévention des infections à *A. pleuropneumoniae*.

CHAPITRE III

LA PHOSPHATASE ALCALINE EN TANT QUE GÈNE RAPPORTEUR

INTRODUCTION

La fusion des protéines avec la phosphatase alcaline bactérienne est utilisée depuis de nombreuses années pour l'étude des protéines membranaires et des protéines sécrétées chez les bactéries pathogènes (Manoil, 1990; Manoil *et al.*, 1990; Hoffman & Wright, 1985; Manoil & Beckwith, 1985). La majorité de ces protéines, dont la phosphatase alcaline, utilise le mode sécrétion de type II ou « general secretory pathway » (GPS). Une des principales caractéristiques de ce mode de transport est la présence d'une séquence d'acides aminés désignée « leader peptide » ou séquence d'exportation, à l'extrémité N-terminale des protéines. Cette séquence permet à la protéine d'être prise en charge par un système de transport protéique et ainsi être transportée et insérée dans la membrane cytoplasmique de la bactérie. Par la suite, les protéines sont prises en charge par d'autres mécanismes leur permettant de gagner le périplasme (Puglsey, 1993). Chez les bactéries pathogènes comme *A. pleuropneumoniae*, les protéines stimulant le système immunitaire de l'hôte sont, pour la plupart, des protéines de la membrane externe ou des protéines sécrétées à l'extérieur de la bactérie (Cruz *et al.*, 1996).

Ce chapitre permettra donc de bien comprendre le mécanisme impliquant l'utilisation de la séquence d'exportation dans le transport des protéines vers la membrane cytoplasmique. Ceci dans le but de bien saisir l'utilisation de la phosphatase alcaline dans l'identification de nouveaux facteurs de virulence et des protéines antigéniques chez *A. pleuropneumoniae*.

3.1 La séquence d'exportation

La séquence d'exportation chez les protéines exportées varient de 18 à 30 acides aminés et se situe à l'extrémité N-terminale de la protéine. Ce peptide peut être divisé en trois régions : a) le domaine N, à l'extrémité N-terminale; b) le domaine H,

région hydrophobique formant une hélice alpha dans un milieu aqueux; c) le domaine C, la région du site de clivage des séquences d'exportations (Figure 3.1) (Fekkes & Driessen, 1999; Pugsley, 1993).

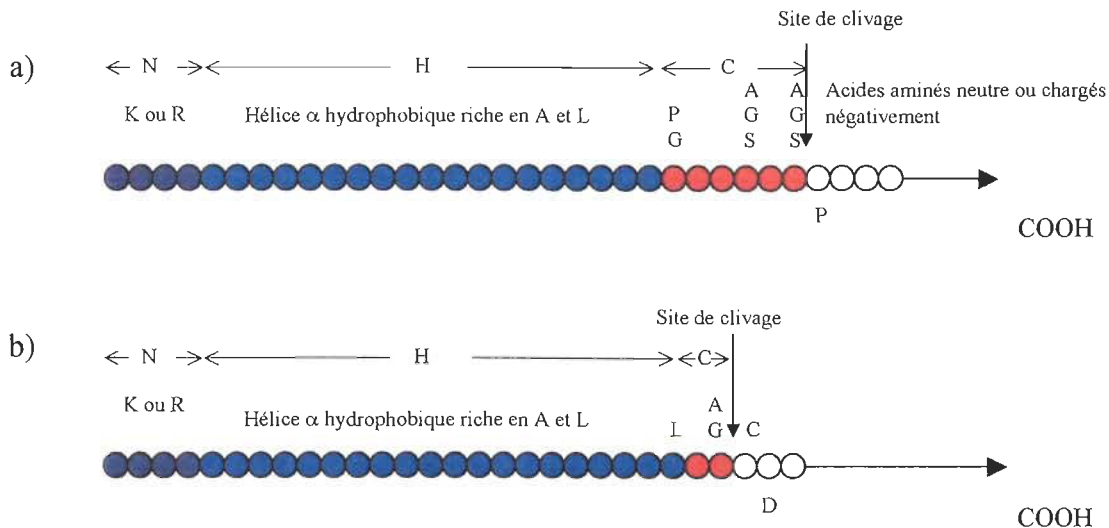


FIGURE 3.1. Représentation schématique d'une séquence d'exportation standard (a) et d'une séquence d'exportation typique des lipoprotéines (b). Les trois domaines sont identifiés par les lettres N (région N-terminale), H (région hydrophobique) et C (région du site de clivage). Le domaine N peut varier entre 2 et 15 résidus aminés incluant une majorité des acides aminés arginine (R) ou lysine (K). Le domaine H a plus de 8 résidus aminés et inclus des acides aminés tels alanine (A) et leucine (L). Le domaine C est le lieu de clivage des deux « leader peptidase », LepB et LspA. Cette région peut contenir une plus grande variété d'acides aminés : proline (P), glycine (G), leucine (L), alanine (A), Sérine (S) et cystéine (C). L'enzyme LepB est le « leader peptidase » qui clive les séquences d'exportation de la majorité des protéines et LspA ou « leader peptidase II » clive les séquences d'exportation des lipoprotéines (adaptée de Fekkes & Driessen, 1999; Pugsley, 1993).

Ce sont les protéines Sec qui sont impliquées dans la reconnaissance de la séquence d'exportation et qui assurent le transport de la protéine au niveau de la membrane cytoplasmique. Sept protéines Sec sont connues pour participer à ce processus : SecA, SecB, SecD, SecE, SecF, SecG et SecY. Les protéines SecA et SecB sont des protéines cytoplasmiques (Pugsley, 1993). SecY, SecE et SecG sont des protéines intégrales de la membrane cytoplasmique qui forment un canal membranaire permettant le passage des protéines. Les protéines SecD et SecF ne sont pas essentielles pour le transport des protéines à travers la membrane, mais leur présence a un effet stabilisateur (Fekkes et Driessen, 1999). La protéine SecB est la première

des protéines Sec à entrer en contact avec la protéine à être transportée à la membrane cytoplasmique. Cette reconnaissance se fait par une région centrale de la protéine spécifique pour la liaison avec SecB (Fekkes et Driessen, 1999). La nouvelle protéine est donc fixée à la protéine SecB, ce qui permet à cette dernière de se lier à SecA. Il y a, par la suite, transfert de la nouvelle protéine de SecB à SecA. Cette dernière serait la seule des protéines Sec à lier la séquence d'exportation. Une fois que la protéine et SecA sont attachées ensemble, SecA se lie aux trois protéines membranaires, SecE, SecY et SecG. La protéine SecA fournit alors l'énergie nécessaire au passage de la protéine à travers la membrane par l'hydrolyse de l'ATP (Figure 3.2). Enfin, une enzyme périplasmique, la « leader peptidase » clive la séquence d'exportation. La protéine peut alors rester au niveau du périplasma, être transportée à la membrane externe où elle s'y ancrera ou être sécrétée à l'extérieur (pour une revue voir Fekkes & Driessen, 1999; Hueck, 1998; Pugsley, 1993).

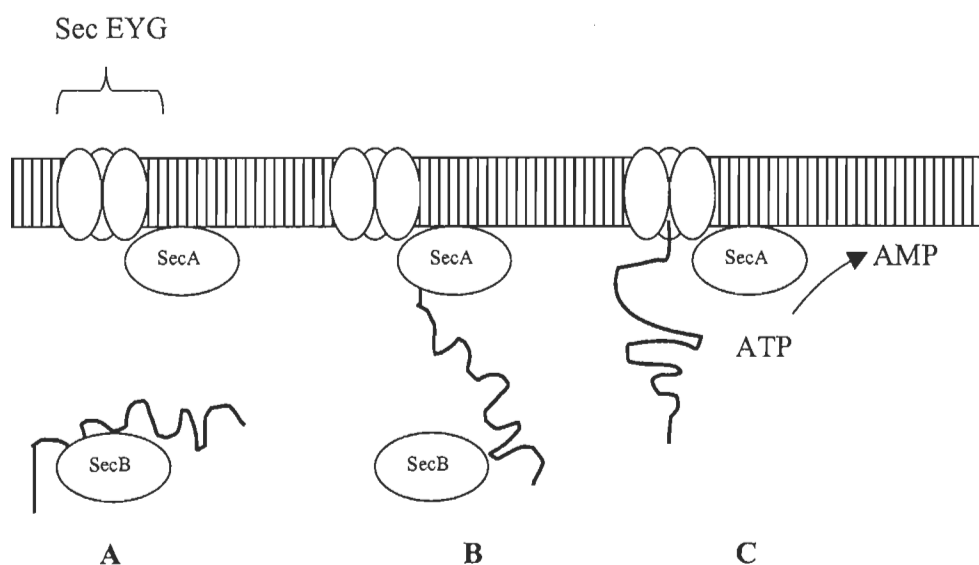


FIGURE 3.2. Illustration schématique du système de translocation par les protéines Sec. **A :** La protéine est prise en charge par SecB. **B :** SecA lie la nouvelle protéine par la séquence d'exportation. **C :** Par l'hydrolyse de l'ATP, SecA permet le passage de la protéine à travers la membrane cytoplasmique par le canal membranaire formé par les protéines SecEYG (adaptée de Fekkes & Driessen, 1999; Hueck, 1998; Pugsley, 1993).

3.2 La phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline de *E. coli* est une protéine de 471 acides aminés et requiert, pour son activité, a) la formation de ponts disulfures (liaison entre les atomes de soufre et de deux cystéines); b) la dimérisation; c) l'acquisition de zinc et de magnésium (Figure 3.2, 3.3 et 3.4)(Pearce *et al.*, 1993). Au moment de sa synthèse (traduction), elle possède à l'extrémité N-terminale, une séquence d'exportation qui lui permet d'être transportée dans l'espace périplasmique. Le transfert de la protéine à travers la membrane cytoplasmique est essentiel à cette dernière. En effet, lors de ce passage, la protéine prend la forme d'un dimère lié par des ponts disulfures, caractéristiques essentielles à l'activité de la phosphatase alcaline. Cette propriété permet l'utilisation du gène *phoA* en tant que gène rapporteur pour l'identification de gènes codant pour des protéines possédant une séquence d'exportation (Derman & Beckwith, 1995; Manoil *et al.*, 1990; Hoffman & Wright, 1985).

Ceci est important car, comme il a été mentionné précédemment, les protéines permettant de stimuler une réponse humorale et celles participant à la virulence des bactéries se trouvent, dans la majorité des cas, au-delà de la membrane cytoplasmique.

```

1  mkqstialal lpllftpvtk artpempvle nraaqgdita pggarrltgd qtaalrdsls
61  dkpakniill igdgmgdsei taarnyaega ggffkgidal pltgqytha lnkktgkpd
121 vtdsaasata wstgvktyng algvdihekd hptilemaka aglatgnvst aelqdatpaa
181 lvahvtsrkc ygpsatsqkc pgnalekggk gsiteqlna radvtlggga ktfaetata
241 ewqgkltreq aqargyqlvs daaslnsvte anqqkpllgl fadgnmpvrw lgpkatyhgn
301 idkpavtctp npqrndsvpt laqmtdkaie llsknekgff lqvegaskd qdhaanpcgq
361 igetvdldea vqralefakk egntlvivta dhahasqiva pdkapgltq alntkdgavm
421 vmsygnseed sqehtgsqrl iaaygphaan vvgldqtdl fytmkaalgl k

```

FIGURE 3.3 Séquence d'acides aminés de la phosphatase alcaline bactérienne (EC 3.1.3.1). En caractère gras : la séquence d'exportation.

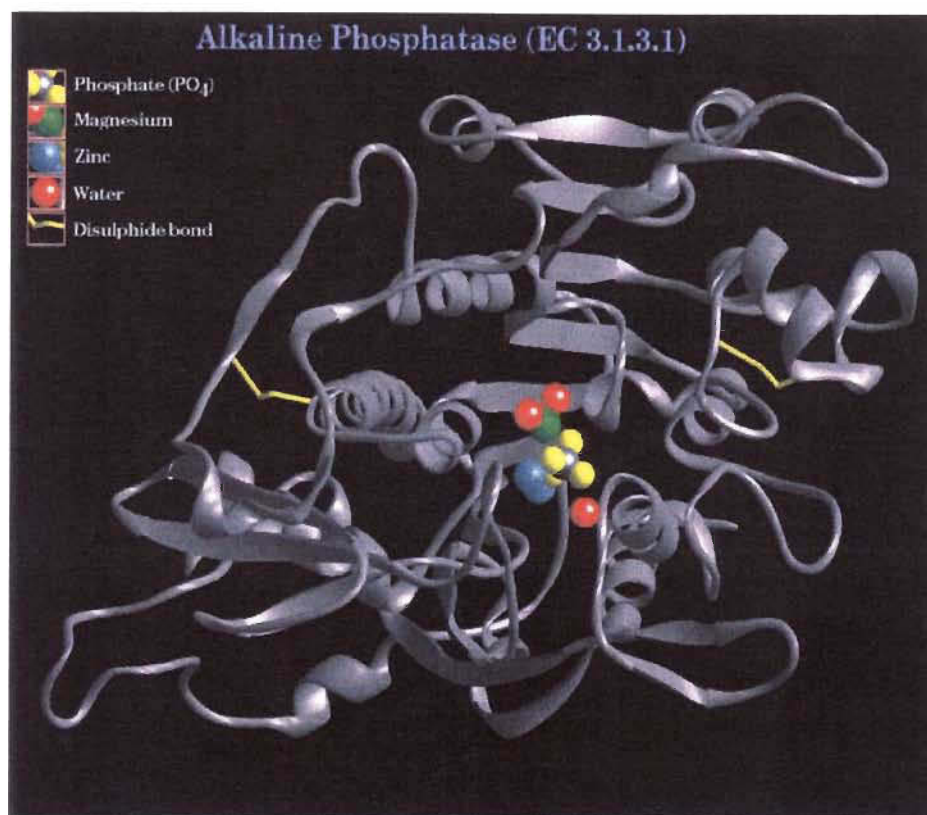


FIGURE 3.4 Illustration en 3 dimensions de la phosphatase alcaline. Les deux ponts dissulfures sont illustrés par les traits jaunes (SWISS-DIMAGE : P00634)

3.2.1 La fusion avec la phosphatase alcaline

La fusion d'une partie d'un gène avec le gène de la phosphatase alcaline est de type transcriptionnelle car elle résulte de la transcription et la traduction d'une protéine hybride. La région N-terminale de la protéine hybride est une partie d'une protéine d'*A. pleuropneumoniae* et la région C-terminale est la protéine codée par le gène rapporteur. Cette fusion doit donc se faire en respectant le cadre de lecture du gène '*phoA*' (L'apostrophe en avant du nom du gène *phoA* indique que le gène est tronqué, c'est-à-dire qu'il n'a plus la région codant pour la séquence d'exportation).

Il est de ce fait possible de créer une banque génomique de séquences d'exportation en fusion avec le gène '*phoA*' (Figure 3.5). Ces fusions permettront l'expression d'une phosphatase alcaline active.

L'activité de l'enzyme pourra alors être observée par la couleur des colonies contenant les protéines en fusion (Figure 3.6): le substrat, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (XP ou BCIP), est dégradé par la phosphatase alcaline en un produit insoluble et bleu. Lorsque la colonie est bleue, cela signifie que 'PhoA est exprimée et est active. La séquence clonée en amont du gène '*phoA*, est donc une séquence contenant un promoteur et une séquence codant pour une séquence d'exportation (Manoil *et al.*, 1990). Le besoin de la présence ou non d'une région promotrice dans le fragment cloné dépend de la construction du vecteur. Certain vecteur, comme pHRM104 que nous verrons plus loin, ne possède pas de région promotrice pour le gène '*phoA*. Par contre, dans les vecteurs pJDT1, pJDT2 et pJDT3, le gène tronqué de la phosphatase alcaline est précédé d'une région promotrice.

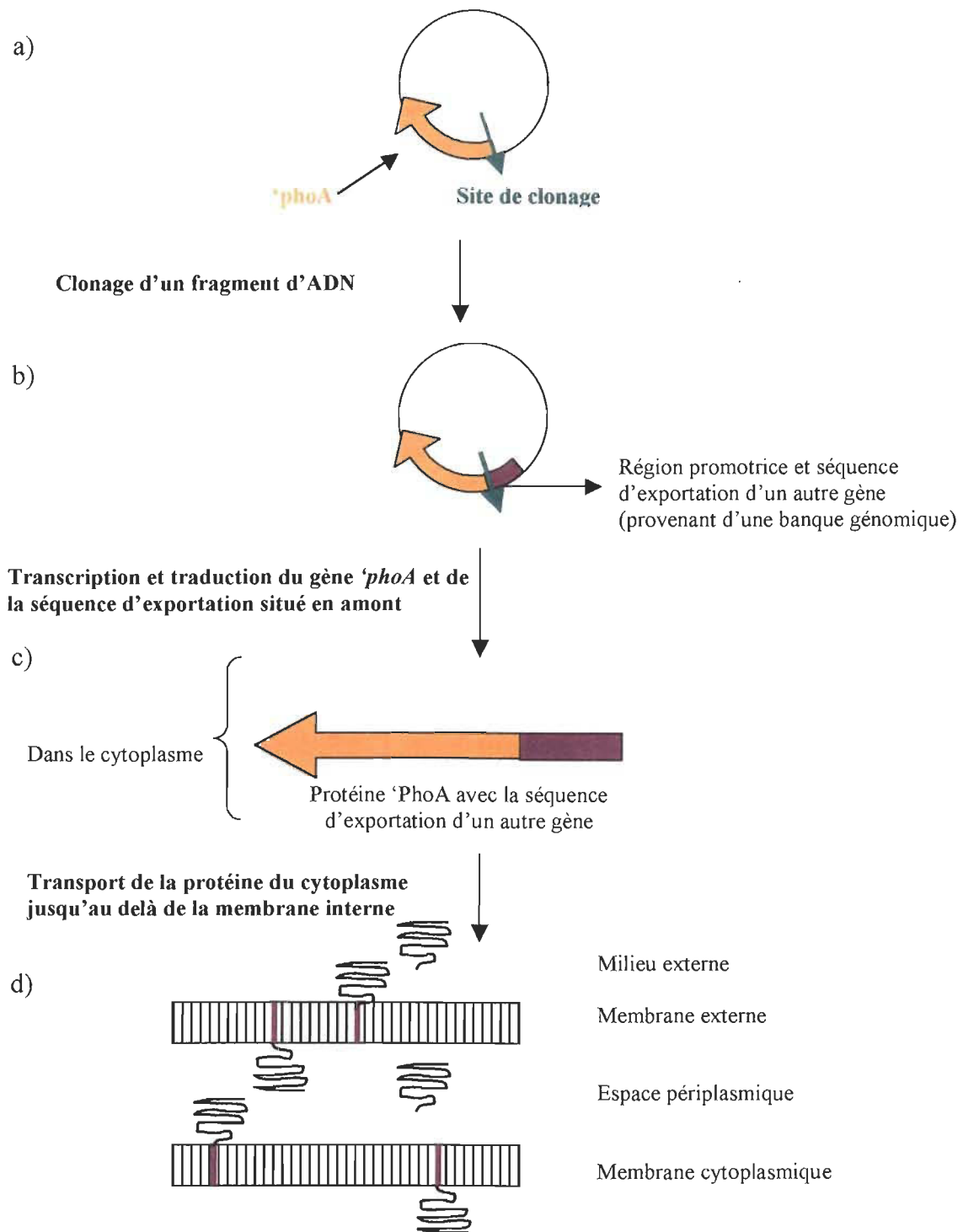


FIGURE 3.5 Schématisation du clonage dans un vecteur contenant le gène de la phosphatase alcaline. a) Vecteur plasmidique contenant le gène de la phosphatase alcaline sans la région promotrice et sans la séquence codant pour la séquence d'exportation. b) Fragment d'ADN cloné en amont du gène '*phoA*'.

Ce fragment possède une région promotrice ainsi qu'une séquence d'exportation. c) Suite à une transformation bactérienne du vecteur, la protéine hybride peut être synthétisée. La phosphatase alcaline se retrouve dans le cytoplasme de la bactérie avec, en sa région N-terminale, la séquence d'exportation. d) Une fois la protéine mature, on peut retrouver la phosphatase alcaline soit ancrée à la membrane cytoplasmique, dans l'espace périplasmique, au niveau de la membrane externe ou sécrétée dans le milieu extérieure. (adaptée de Fekkes & Driessen, 1999; Hueck, 1998; Pugsley, 1993; Manoil, 1990; Hoffman & Wright, 1985).

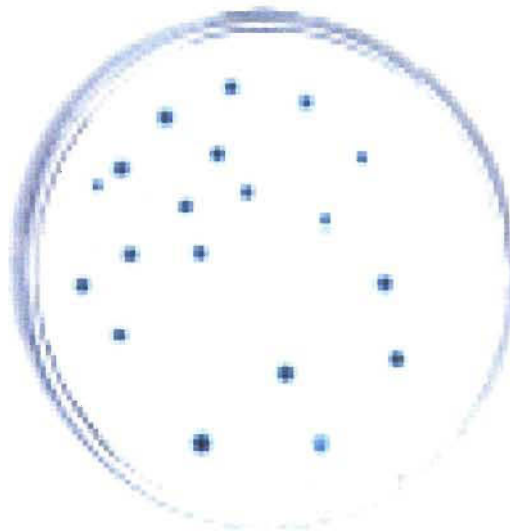


FIGURE 3.6. Colonies bactériennes bleues dues à l'activité de la phosphatase alcaline sur le substrat le substrat, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate.

3.2.2 L'utilisation de '*phoA* chez différentes espèces bactériennes

Les nombreuses infections bactériennes chez l'humain mais également chez les animaux demandent en effet, un grand effort au niveau de la recherche afin d'éclaircir les mécanismes de virulence. Cela implique donc la connaissance des protéines impliquées ainsi que les gènes codant pour ces dernières. C'est donc dans cette optique que depuis plusieurs années, de nombreux travaux de recherche démontrent l'utilisation de cette technologie chez plusieurs bactéries.

3.2.2.1 *Streptococcus agalactiae*

Une équipe de recherche, de l'Université de Washington, travaillant sur la bactérie *Streptococcus agalactiae*, identifiaient *phoZ* d'*E. faecalis* (Lee *et al.*, 1999). L'activité enzymatique de cette phosphatase alcaline est diminuée si la protéine reste dans le cytoplasme et augmente en activité si elle est exportée vers l'extérieur. Cette phosphatase alcaline fut donc utilisée dans le vecteur plasmidique pour l'identification de protéines exportées chez les bactéries faisant partie des streptocoques du groupe B. Ils identifiaient ainsi huit protéines en fusions avec 'PhoA dont la région codant pour chacune de ces protéines était des gènes dont les protéines associées sont des protéines exportées (Lee *et al.*, 1999).

3.2.2.2 *Treponema pallidum*

Blanco *et al.* (1991) des Utilisèrent cette technologie chez *Treponema pallidum*, la bactérie responsable de la syphilis chez l'humain. L'élaboration de trois vecteurs leurs permirent de procéder à un clonage dans les trois cadres de lectures en amont du gène '*phoA* (gène sans séquence codant pour une séquence d'exportation). Une banque génomique de 40 000 clones fut ainsi criblée sur un milieu de culture adéquat (contenant du XP, substrat de la phosphatase alcaline). De ces 40 000 clones, 2% montrèrent une fusion positive avec PhoA leur permettant ainsi d'identifier un bon nombre de nouveaux gènes dont les protéines associées sont susceptibles d'agir comme facteurs de virulence (Blanco *et al.*, 1991).

3.2.2.3 *Mycobacterium tuberculosis*

Lim *et al.* (1995) travaillèrent avec un vecteur navette (vecteur se répliquant dans deux espèces bactériennes différentes), chez la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*. La banque génomique fut construite à partir de fragment de 400 à 2000 pb. Un gène codant pour un antigène important chez *M. tuberculosis* fut ainsi identifié. En 2000, l'utilisation de ce vecteur permit à Olarion *et al.*, d'identifier une protéine immunogène chez l'humain exprimée dans des conditions *in vivo* (Olarion *et al.*, 2000). Une autre équipe de recherche travaillant sur *M. tuberculosis*, élaborer trois vecteurs, pJDT1, pJDT2 et pJDT3 (Mdluli *et al.*, 1995). Un avantage lors de

vecteurs, pJDT1, pJDT2 et pJDT3 (Mdluli *et al.*, 1995). Un avantage lors de l'utilisation de ces vecteurs est qu'ils permettent de cloner dans les trois cadres de lectures. Cette caractéristique leur a donc permis d'augmenter les possibilités d'obtenir la majorité des séquences d'exportation lors de la formation d'une banque génomique. De plus, le promoteur pLac (de l'opéron lactose) est situé en amont de 'phoA dans cette construction de vecteur. Cela évite ainsi d'éliminer les gènes a) se trouvant au centre d'un opéron; b) dont le promoteur ne serait pas reconnu par la souche de *E. coli* utilisée pour la construction de la banque génomique (Mdluli *et al.*, 1995). Ils ont réussi à identifier, grâce à cette technologie, un gène dont la protéine associée est un immunogène qui aurait la capacité de stimuler les leucocytes chez les souris. Cette protéine est de ce fait très intéressante pour l'élaboration de nouveaux traitements préventifs (Moran *et al.*, 1999).

3.2.2.4 *Pasteurella multocida*

La vaccination contre la bactérie *Pasteurella multocida* responsable, entre autre, du cholera chez le poulet, tout comme la vaccination contre la pleuropneumonie porcine n'empêche pas toujours l'infection par la bactérie. La recherche de protéines exportées à la surface bactérienne est donc d'une grande importance pour les équipes de recherche travaillant sur cette bactérie. Adler *et al.* (1999) utilisèrent les vecteurs pMG mais dans une souche particulière de *E. coli*. Ils utilisèrent la souche KS330 qui permet une diminution de la dégradation protéolytique des protéines de fusions dans l'espace périplasmique et facilite le passage des grosses molécules comme les fusions avec 'PhoA à travers la membrane externe. Par cette méthode, ils ont réussi à identifier trois nouveaux gènes codant pour des protéines de la membrane externe dont deux semblent être spécifique à *P. multocida*.

3.1.2.5 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Actinobacillus actinomycetemcomitans est une bactérie causant des périodontites chez l'humain. En 1999, Mintz et Fives-Taylor publièrent les résultats de leur recherche suite à l'utilisation de la technologie PhoA. Ils utilisèrent le vecteur pHRM104, élaboré par Pearce *et al.* en 1993, afin de construire une banque génomique de séquence d'exportation. Ils obtinrent donc une banque de 2800 clones dont 28

ont été effectuées avec la banque de données de SwissProt. Cinq clones donnèrent des homologies importantes (50% et plus); « saliva-binding protein », « transmembrane protein », « chaperone protein », « outer membrane protein » et « murein lipoprotein precursor ». Les gènes complets ont été isolés à partir d'une banque génomique construite dans un phage lambda. Une deuxième équipe de recherche, en 2001, publièrent des résultats portant sur la même bactérie (Ward *et al.*, 2001). La construction d'une banque génomique dans le vecteur pHRM104 leurs permirent d'identifier dans une banque de 8000 clones, 80 fusions positives avec PhoA. Par des analyses bio-informatiques ils réussirent à identifier quatre protéines qui semblent être sécrétées dans le milieu extérieur susceptibles d'être importantes lors de l'infection chez l'hôte.

3.2.2.6 *Helicobacter pylori*

Une banque génomique fût construite également chez *Helicobacter pylori* en utilisant la technologie PhoA (Bina *et al.*, 1997). Ils ont utilisé trois vecteurs, pJDT1, pJDT2 et pJDT3, construit de façon à être en mesure de cloner dans les trois cadres de lecture avec le gène de la phosphatase alcaline et d'éviter les problèmes liés aux promoteurs grâce à la présence du promoteur pLac en amont de '*phoA*' (Mdluli *et al.*, 1995). Un pourcentage se situant entre 2 et 3 % de clones recombinants fut obtenu. Des 120 clones séquencés, 25 donnèrent des résultats très intéressants lors de la recherche d'homologie suite aux analyses bio-informatiques. Selon ces résultats, plusieurs gènes de la banque génomique, mis en évidence, sont d'un grand intérêt pour la fabrication de vaccin ou encore sont intéressants comme cible thérapeutique : *exbD* (sidérophore), *lafB* (impliqué dans la motilité), *vanA* (résistance à la vancomycine), *feoB* (transport du fer) et *rfbA* (synthèse des LPS).

3.2.2.7 *Staphylococcus aureus*

Williams *et al.*, en 2000, identifièrent 90 fusions positives avec 'PhoA provenant de deux banques génomiques de 4200 et 5700 clones chez la bactérie *Staphylococcus aureus* (une bactérie responsable de plusieurs maladies chez l'humain comme l'ostéomyélite et le syndrome du choc toxique). Malgré la différence structurale entre la membrane des bactéries Gram négatives et Gram positives, chez ces

dernières il est également possible d'utiliser la fusion de protéine avec la phosphatase alcaline. La construction des banques génomiques fut faite dans le vecteur pHRM104. Toutes les séquences des clones positifs clonées dans le cadre de lecture avec 'phoA présentaient une séquence codant pour une séquence d'exportation. Cette analyse fut faite suite à l'utilisation du logiciel SignalP V1.1. Les analyses bio-informatiques leur permirent, entre autre, d'identifier 2 protéines similaires à LukD et LukE, deux composantes de la leukocidine (toxine induisant la formation de pore membranaire) chez *S. aureus*. Dix autres gènes codant pour des protéines exportées à l'extérieur de la bactérie furent ainsi identifiés et les protéines homologues sont toutes reconnues comme facteurs de virulence potentiels.

3.2.2.8 *Streptococcus pneumoniae*

Pearce *et al.*, (1993) élaborèrent le vecteur pHRM104 afin de construire une banque génomique de la bactérie *Streptococcus pneumoniae*. Contrairement à la majorité de vecteurs utilisant le gène de la phosphatase alcaline comme gène rapporteur, pHRM104 n'a pas de séquence codant pour la région promotrice (Pearce *et al.*, 1993). Il faut donc réussir à cloner, et ce dans le bon cadre de lecture, une séquence comprenant une région promotrice ainsi qu'une région codant pour une séquence d'exportation (les limites de l'utilisation de ce vecteur sont traitées dans la conclusion). Avec l'aide de ce vecteur, ils ont construit une banque génomique de 1500 clones utilisant des fragments de 400 à 600 pb d'ADN génomique de *S. pneumoniae*. De ces 1500 clones, 75 se sont avérés être des fusions positives avec 'PhoA. Suite aux analyses bio-informatiques, ils établirent certaines homologies avec des protéines déjà connues chez d'autres bactéries. À titre d'exemple, ils ont mis en évidence quelques protéines : « ATP-binding cassette », des protéines régulatrices de la protéolyse et PilB de *Neisseria gonorrhoeae* (Pearce *et al.*, 1993).

3.3 Conclusion

Il est évident que cette technologie est utilisée chez plusieurs espèces de bactéries Gram négatives, mais aussi chez quelques bactéries Gram positives. À ce jour, plusieurs banques génomiques ont été construites et plusieurs séquences ont été identifiées comme étant des séquences codant pour des séquences d'exportation de

protéines transportées au niveau de la membrane cytoplasmique ou au-delà de celle-ci. Tous s'entendent pour affirmer que les séquences ainsi identifiées sont d'importants outils pour l'identification de protéines antigéniques qui peuvent être des candidats intéressants pour la fabrication de vaccins. Les résultats des recherches chez différentes bactéries rapportées dans ce mémoire représentent des exemples concrets.

C'est donc suite à la modélisation des séquences d'exportations que plusieurs programmes informatiques ont vu le jour. Ceux-ci permettent, par des analyses bio-informatiques, de déterminer la présence ou l'absence de séquences d'exportation à partir des séquences clonées en amont du gène '*phoA*'.

La fin des années 1990 est ainsi marquée par un essor remarquable de la bio-informatique. L'utilisation de cette forme d'analyse est devenue nécessaire suite à l'accroissement rapide de la quantité de données génomique. À titre d'exemple, un groupe de chercheurs (Gomez *et al*, 2000), suite au séquençage complet du génome de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, ont réussi par analyses bio-informatiques du génome, à identifier de nouveaux gènes codant pour des protéines sécrétées. Ces analyses se sont faites en utilisant les logiciels SignalP, SPScan et Tmpred. Ce dernier logiciel permet d'éliminer les protéines ayant des segments transmembranaires, ce qui leur a permis d'identifier les protéines sécrétées dans le milieu extérieur à la bactérie. Ces résultats apportent un changement important dans la recherche en laboratoire « traditionnel » sur l'étude des gènes et des protéines associées et ouvert véritablement l'ère de la bioinformatique, ou les études de clonages moléculaires *in silico*.

CHAPITRE IV

PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

4.1 Problématique

Les nombreux sérotypes ainsi que la diversité des mécanismes utilisés par *A. pleuropneumoniae* pour induire la maladie chez l'hôte est responsable des difficultés rencontrées pour la mise au point de traitements préventifs efficaces. Dans le but de survivre dans les poumons d'un porc, *A. pleuropneumoniae* doit mettre en œuvre une série de mécanismes afin de diminuer ou de contourner les défenses immunitaires de l'hôte. Elle doit également être en mesure de se protéger contre les différentes attaques de l'hôte. Certaines composantes connues, telles que les toxines Apx, auraient probablement un rôle primordial à jouer à ce niveau en diminuant la capacité de défense cellulaire en provoquant la lyse des macrophages et des neutrophiles. Les protéases, ainsi que les toxines Apx, en lysant les érythrocytes, augmenteraient la source de fer disponible pour la survie de la bactérie. D'autres mécanismes, par exemple le système de contrôle des composées superoxydes par la superoxyde dismutase, permettraient à la bactérie de se défendre contre les composés toxiques libérés par les neutrophiles. De même, la capsule possède des propriétés de protection contre la phagocytose et la lyse par l'activation du complément, constitue un mécanisme important. Il est donc évident que les mécanismes de virulence utilisés par la bactérie *A. pleuropneumoniae* sont nombreux et diversifiés. C'est pourquoi la prévention par les vaccins demande une plus grande connaissance des facteurs de virulence et des protéines susceptibles de stimuler le système immunitaire porcin.

Tel qu'il a été mentionné plus tôt, deux types de vaccins sont produits. Le premier type de vaccin est fabriqué à partir d'un ensemble de protéines antigéniques de la bactérie. Malheureusement, aucun vaccin n'est à ce jour efficace, ce qui démontre bien le manque de connaissances des protéines antigéniques essentielles à la survie de la bactérie. Le deuxième type de vaccin est composé de la bactérie vivante mais

infections à *A. pleuropneumoniae*. Un fait intéressant à noter : les animaux convalescents suite à une infection à *A. pleuropneumoniae* acquise de façon naturelle sont protégé contre toutes autres infections à cette même bactérie et ce, indépendamment du sérotype. Tous ces faits démontrent bien la nécessité d'approfondir nos connaissances sur les nombreux facteurs de virulence de cet agent pathogène de même que sur les protéines essentielles à sa survie dans l'hôte.

4.2 Les hypothèses et objectifs de recherche

Comme il a déjà été mentionné, une protéine antigénique susceptible de faire partie de la composition d'un nouveau vaccin doit être exposée à la surface de la bactérie et stimuler le système immunitaire de l'hôte, c'est-à-dire être reconnue par les anticorps du porc et ainsi, devenir la cible des cellules phagocytaires telles les macrophages. Cette protéine doit également être produite par tous les sérotypes et ce, dans des conditions naturelles d'infection (Cruz *et al.*, 1996). Ces protéines, dans la majorité des cas, possèdent à leur extrémité N-terminale une séquence d'exportation, ce qui permet l'utilisation du gène de la phosphatase alcaline en tant que gène rapporteur pour leur identification ultérieure.

En utilisant le gène *phoA*, il serait donc possible d'identifier des gènes possédant une région codant pour une séquence d'exportation. Par la suite, des analyses bio-informatiques des séquences ainsi obtenues permettront de déterminer le rôle potentiel du produit de ces gènes chez *A. pleuropneumoniae*. Cette technologie permettrait donc d'identifier de nouvelles protéines présentant un potentiel antigénique et, possiblement, de cibler de nouveaux facteurs de virulence dans le but de les utiliser en vue de faire un vaccin.

CHAPITRE V

Identification of Secreted Proteins of the Swine Pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* using Gene Fusion with Alkaline Phosphatase

J. Provencher, A. St-Arneault, N. Perreault, L. A. Gagnon, M. Beauregard and M. Sirois*.

Laboratoire de Génomique Bactérienne
Département de Chimie-Biologie
Université du Québec à Trois-Rivières
3351, boul. des Forges
Trois-Rivières, Québec, Canada
G9A 5H7

Tél: (819) 376-5011 ext. 3999
Fax: (819) 376-5084
E-mail: siroism@uqtr.ca

Index entries: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, porcine pleuropneumonia, secreted proteins, alkaline phosphatase, fusion proteins, virulence factors, antigens.

5.1 ABSTRACT

Actinobacillus pleuropneumoniae is responsible for porcine pleuropneumonia, a specific swine contagious respiratory infection causing important losses to the industry. The disease is still not well controlled by commercial vaccines, mainly because of its multifactorial pathogenicity. The Gram negative bacterium expresses multiple virulence factors and many among them are proteins that are exported from the cytoplasm towards the bacterial surface. In order to identify new virulence factors and new antigens, an *A. pleuropneumoniae* random fusion library was constructed in a plasmid vector containing a truncated *phoA* gene, enabling to target several secreted proteins. Screening for alkaline phosphatase activity allowed us to identify 95 positive clones. Among them, nearly 40% reacted with a porcine pleuropneumonia convalescent antiserum. These clones were characterized via DNA sequencing and computer databases comparisons. Several of the deduced amino acid sequences were found to be homologous to known *Pasteurellaceae* surface proteins as others represented unique proteins with no existing homologues in the current database. We discuss the ability of the PhoA technology to identify more potential antigens and virulence factors useful for the developpement of new therapeutics against *A. pleuropneumoniae*.

5.2 INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) is a Gram-negative coccobacillus bacterium of the *Pasteurellaceae* family. It is the causative agent of swine pleuropneumonia, a highly contagious disease and has been encountered exclusively in pigs. The disease is responsible for important economic losses in the swine industry across the world (1, 2). Several App virulence factors have been characterized and many of these are exported proteins. It has been shown that the Apx toxins play an important role in the virulence of the bacteria (3, 4, 5, 6, 7). Other factors includes the capsule (8, 9, 10), lipopolysaccharides (LPS) (12, 13, 14, 15), outer membrane proteins (16, 17, 18, 19), fimbriae (20), urease (21, 22), SOD (23), transferrin binding protein (24, 25, 26, 27, 28) and proteases (29, 30, 31).

Gene fusion technology based on alkaline phosphatase (PhoA) has been used successfully to identify exported proteins originating from a wide range of bacterial species. The system is based on the fusion of genomic DNA fragments with a 5' truncated alkaline phosphatase gene ('*phoA*') lacking its promoter and leader peptide. This enables the identification of open reading frames (ORFs) containing a promoter and signal peptide in frame with '*phoA*', which are detected when PhoA is transported across the cytoplasmic membrane to become enzymic active to degrade chromogenic substrate 5-bromo-4-chlor-3-indolyl phosphate (BCIP) resulting in blue color. Several secreted proteins has been isolated using the PhoA technology in a number of pathogenic bacteria; *Streptococcus agalactiae* (32), *Helicobacter pylori* (33, 34), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (35, 36), *Pasteurella multocida* (37), *Treponema pallidum* (38), *Mycobacterium tuberculosis* (39, 40), *Vibrio cholerae* (41), *Streptococcus pneumoniae* (42), and *Staphylococcus aureus* (43). The aim of this present study was to identify, by a molecular genetic approach, surface-located or secreted proteins of App.

Among the proteins that can be identified, some of them should be interesting as outer membrane proteins that are important in the virulence of pathogenic bacteria or in the stimulation of the immune system of the host. As the pathogenesis of App is not fully understood, the hypothesis that there should exist some proteins that act as

virulence factors or as antigenic proteins not describe until now, seems very attractive.

Here we report the use of '*phoA* gene fusions to target App genes encoding secreted proteins and the immunological screening of the fusion proteins to identify and characterize new antigens and virulence factors.

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Bacterial strains, vectors and growth media

The bacterial strains used during this study were *Actinobacillus pleuropneumoniae* 4074 (type strain ATCC 27088, serotype 1), *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, Canada), *E. coli* ER 1647 and BM 25.8 (Novagen, USA). *A. pleuropneumoniae* was grown in Tryptic Soy Broth (TSB)(Difco, USA) supplemented with 1% of IsoVitaleX (BBL Microbiology Systems, USA) at 37°C under aerobic conditions. *E. coli* strains were grown in Luria Bertani (LB) broth or agar (Difco, USA). The plasmid vector pHRM104 (42) was kindly supplied by Keith P. Mintz (U. of Vermont, USA), propagated and maintained in *E. coli* DH5 α . The *A. pleuropneumoniae* genomic library in pHRM104 was propagated and grown on LB agar containing 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) and erythromycin at a final concentration of 50 ug/ml and 250 ug/ml, respectively.

5.3.2 Construction of the genomic fusion library

A. pleuropneumoniae whole-cell DNA was prepared as already described (46). Aliquots of 2.5 ug of chromosomal DNA were partially digested with *Sau3AI* for 5, 10, and 15 minutes at 37°C. The digested DNA was separated by agarose gel electrophoresis and 500 bp to 1500 bp restricted fragments were purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen). The vector pHRM104 was linearized with *Bam*HI for 2 hours at 37°C and then dephosphorylated using shrimp alkaline phosphatase (Roche Biochemicals, Canada). Vector and restriction fragments DNA was ligated in a 1:3 ratio. Ligation mix was transformed in *E. coli* DH5 α by

electroporation using standard methods (46). PhoA positive transformants showing alkaline phosphatase activity after 24 to 36 hours were detected on LB agar plates containing BCIP and erythromycin and colony-purified on a similar plate.

5.3.3 Immunoscreening of PhoA positive clones

5.3.3.1 Purification of antiserum

Preliminary data showed high-level background linked to the use of a swine pleuropneumonia convalescent serum against various *E. coli* recombinant clones. Using *E. coli* DH5 α , anti-*A. pleuropneumonia* 4074 porcine serum was extensively absorbed (4 to 6 times) until binding to the bacterium was not interfering in immunoblotting experiments.

5.3.3.2 Immunoblotting of the PhoA fusion clones

Purified PhoA positive clones were cultivated overnight in 5ml TSB/erythromycin and cells were pelleted by centrifugation. Pellets were resuspended in 350 μ l of 2X Laemmli sample buffer, boiled for 10 min. and stored at -20° C as fusion protein crude lysate until further needed. SDS-PAGE separation was conducted with Tris-glycine buffer using 4 and 12 % stacking and separating gel, respectively. Following electrophoresis separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes for immunoblotting (Bio Rad Laboratories, Canada). Membranes were blocked in 1X TBST (Promega Corp. USA) and 5 % skim milk for 2 hours at room temperature and then thoroughly washed. Nitrocellulose sheets were then incubated 30 min. at room temperature in the presence of the primary antibodies (convalescent antiserum) diluted 1:2500. Membranes were washed again before incubation with the 1:30 000 diluted secondary antibodies (goat anti-pig IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma, USA) for 30 min. at room temperature. Membranes were finally washed several times over an hour period in TBST and then incubated for 5 min using the BCIP/NBT liquid substrate system (Sigma) following the supplier's instructions.

5.3.3.3 Sequencing and bioinformatic analysis

Double-stranded plasmid DNA was prepared using the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics). Double-stranded template was automatically sequenced by cycle sequencing using the Big Dye terminator kit (Core Sequencing Facility, Laval University, Canada). The oligonucleotide 5'-CACCCGTTAAACGGCGAGCA-3' (PhoA-fus), located approximately 100 bases upstream from the *Bam*HI cloning site in pHRM104, was used for sequencing of the fusion junctions selected. Analysis of the *A. pleuropneumoniae* insert DNA sequence in frame with the PhoA sequence was performed using the GCG programs.

Sequencing reactions were obtained using the sequencer ABI Prism Dye Terminator Cycle sequencing (Applied Biosystem) by the CSF of University Laval. The analysis of the promoter and signal sequences upstream *phoA*' have been made using GCG package (Wisconsin Package Version 10.2, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.)

5.4 Results and Discussion

An *A. pleuropneumoniae* strain 4074 leader peptide library was constructed using the plasmid vector pHRM104. When the *E. coli* DH5 α recombinant clones were plated on LB BCIP/erythromycin plates, approximately 1% showed blue color, indicating the presence of PhoA translational fusions, as a consequence of the cloning of exported proteins DNA sequences. From 8 000 clones screened for PhoA expression, 95 DH5 α transformant clones displayed the blue-color phenotype and were streaked-purified on fresh BCIP/erythromycin plates to confirm PhoA positive phenotype. Among the PhoA positive clones, 40 reacted positively with the convalescent antiserum. These clones were chosen and their transformant plasmids were recovered for DNA sequencing using the PhoA-fus primer. Preliminary sequence analysis revealed that 40 out of 95 cloned inserts were distinct, demonstrating a sibling relationship between some of the clones, probably caused by enzyme restricted DNA bias.

5.4.1 PhoA fusion proteins vs immunogenicity

A polyclonal antiserum of pleuropneumonia convalescent swine was used to screen the PhoA positive clones. The *A. pleuropneumoniae* polyclonal antiserum reacted positively with 41 out of 95 PhoA+ clones obtained from the initial phenotypical screening. From the start, PhoA fusion clones reacting to convalescent antiserum were chosen for sequence analysis. Non-reacting fusion clones might be encoding for antigenic proteins but DNA insert might be too short to encode for at least one epitope. For that reason, 20 supplementary PhoA positive clones (non-reacting with antiserum) were randomly chosen for further sequence analysis.

5.4.2 General sequence analysis of PhoA positive clones

The protein sequences derived from the DNA sequences across the *phoA*/DNA insert fusion junction were used for BLAST searches of all protein sequences at the NCBI database. The size of the amino acid stretch fused to PhoA in each of the recombinants is shown in Tables 5.1 to 5.3. From the 61 clones sequenced, a number of them revealed the presence of identical DNA sequences. Table 1 to 3 shows the 51 non-redundant clones identified in this study. Sequence data generated from the 40 chosen clones allowed us to classify the fusion proteins into 3 groups. The first were those proteins that had homology to hypothetical proteins or proteins of various known *Pasteurellaceae* (Table 5.1). The second were those proteins which shared homology to non-*Pasteurellaceae* proteins (Table 5.2). The remaining group consisted of proteins that had no homology to any proteins in the current databases (Table 5.3).

Thirty six PhoA + clones encoded proteins that were similar to known *Pasteurellaceae* proteins (Table 5.1). Most of the homolog proteins found in the databases could be associated to *P. multocida* and *H. influenzae* with fourteen each. Five homology hits were found with the *Actinobacillus* genus, exclusively with *A. pleuropneumoniae*. Of particular interest, from a virulence point of view; *P. haemolytica* outer membrane lipoprotein (clone 1-2), *P. multocida* outer membrane antigen Oma 87 (clone 1-27) and hemin-binding surface protein A, HbpA (clone 3-5). Ten PhoA positive clones encoded proteins which shared homology to non-*Pasteurellaceae* proteins.

Among the 51 PhoA clones that were sequenced, many had deduced fusion proteins sequences that contained a start methionine residu (data not shown) followed by conserved amino acids features of prokaryotic signal peptides. As described in table 1 to 3, 41 out of 51 fusion proteins exhibited showed characteristic signature related to secreted proteins (transmembrane region, lipoprotein or signal peptide). The 10 remaining fusion proteins sequences may represent undefined signals for protein translocation in *A. pleuropneumoniae* and *E. coli*.

5.4.3 Analysis of particular sequences

5.4.3.1 Identification of putative lipoproteins

Two putative lipoproteins had been identified by submitting the sequence of the clones 1-2 and 3-1 against the database of Genbank. Two of them showed strong homology with two different lipoproteins of *Pasteurella haemolytica* (accession number: M91072 and P44445). All those clones are recognized by the convalescent antiserum. The presence of lipoprotein seems important in the stimulation and protection of pigs against infection with App. An outer membrane lipoprotein has been identified in a strain of App serotype 5 and when administrated for the immunization of pigs, yielded protection from infection with an App serotype 5 isolate (17). Our results allowed us to postulate that these two proteins could be potential antigens for new vaccines.

5.4.3.2 Identification of an outer membrane antigen

The sequence of clone 1-27 showed strong identity with an outer membrane protein of *Pasteurella multocida*, Oma87. In *P. multocida*, the protein as been reported to be a protective outer membrane antigen and has a significant similarity to the D15 protective surface antigen of *H. influenzae* (37, 47, 48). The protective perspective of Oma87 and D15 give us a good indication of the potential of our protein for the stimulating of the immune system of pigs for further immunization.

5.4.3.2.1 Identification of Stationary phase survival protein

The clone 1-18, after analysis of its sequence showed strong homology to the stationary phase survival protein (SurA) of *Haemophilus influenzae*. According to our knowledge, this protein has not been characterized in *H. influenzae*. However, in *Salomonella enterica*, it is known that when the *surA* gene is mutated, the bacteria becomes attenuated (49). We could expect the same characteristic in App and classify this new protein as a new putative virulence factor.

5.4.3.2.2 Identification of hypothetical protein

Two sequences give homologies with two hypothetical proteins. The clone 1-24 showed homology with an hypothetical protein of *Neisseria meningitis* (accession number: AAF42002). After analysing the sequence immediately upstream *phoA* with PSORT, it appears to be a putative lipoprotein located in the outer membrane. The clone 2-5a was submitted to similar analysis and was found to be homologous to a lipoprotein in *H. influenzae*, located in the outer membrane (accession number: AAC22498.1). As it is known that lipoproteins can have an important role in the stimulation of the immune system of the host, we shall consider the latter clone as a putative antigen.

5.5 Conclusion

The aim of this present work was to identify, by a genetic approach, secreted proteins of *A. pleuropneumoniae* acting as virulence factors and/or that could stimulate an immune response during infection. Localisation of proteins at the bacterial surface is the result of complex processes, involving exportation signals and interaction with bacterial membranes. In most cases, cell membrane-associated and secreted proteins of Gram negative bacteria contain a distinctive signature signal peptide that directs their export across the cytoplasm membrane via the general secretory pathway (50). To identify exported proteins of *A. pleuropneumoniae*, a random PhoA fusion library was constructed and screened to identify multiple sequences that encode signals for protein exportation.

In this study we used gene fusion with a truncated alkaline phosphatase gene for the identification of putative virulence factors and immunogenic proteins. With this tool, we have been able to identify a number of immunogenic proteins and some putative virulence factors. The sequencing of strong positives clones that were immunogenic permit us to identified a large number of proteins as lipoproteins, outer surface proteins, periplasmic protein, inner membrane proteins, etc.

The present study was conducted in order to identify and characterize DNA sequences which cause secretion of a truncated alkaline phosphatase (PhoA) in *E. coli*. The vector pHRM104 represents a promoter and leader peptide trap, a DNA stretch necessary for the expression and exportation of the PhoA enzyme beyond the cytoplasmic membrane. As expected, we have fund that *A. pleuropneumoniae* DNA inserts wich lead to the expression of active PhoA fusion proteins have N-terminal signal peptides or hydrophobic membrane-spanning sequences. Extensive bioinformatics analysis revealed already known virulence proteins.

The identification of DNA sequences representing membrane-spanning domains and signal peptides provides the first step for the cloning of the entire genes encoding these proteins. We hypothesize that these proteins may be important in the pathogenic process of *A. pleuropneumoniae* in swine pleuropneumonia. More studies are needed to be conducted in order to associate these proteins with the multifactorial virulence process and eventually to better understand the biology of *A. pleuropneumoniae*.

The PhoA technology showed to be a useful tool to identify new proteins representing putative virulence factors and/or antigenic proteins. In the specific case of *A. pleuropneumoniae*, which virulence is known to be multifactorial, identification of new key genes linked to the pathogenic process could lead to the development of new diagnostic tools, therapeutics agents, and fully protective vaccines.

Acknowledgements

This work was supported by the Conseil de Recherche en Pêcheries et Alimentation du Québec (CORPAQ) and the Fonds Institutionnel de Recherche of the Université du Québec à Trois-Rivières (FIR-UQTR). J.P., A.St-A. and N. P. were supported by NATEQ (Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies) graduate studentship. We are grateful to Dr. K. P. Mintz for supplying the pHRM104 plasmid.

REFERENCES

1. Taylor D. J. (1999) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Diseases of swine. Edited by: Straw B. E., D'Allaire S., Mengeling W. L. and Taylor D. J. Ames, Iowa State University Press: 343-354.
2. Shope, R. E. (1964) Porcine contagious pleuropneumonia. J. Exp. Medecine. **119**, 357-368.
3. Schaller A., Kuhn R., Kuhnert P., Nicolet J., Anderson T. J., MacInnes J. I., Segers R. P. A. M. and Frey J. (1999) Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiol. **145**, 2105-2116.
4. Jansen R., Briaire J., van Geel A. B. M., Kamp E. M., Gielkens A. L. J. and Smits M. A. (1994) Genetic map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin (Apx) operons: characterization of the ApxIII operons. Infect. Immun. **62**, 4411-4418.
5. Jansen R., Briaire J., Kamp E. M. and Smits M. A. (1992) Comparison of the cytolysin II genetic determinants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. Infect. Immun. **60**, 630-636.
6. Kamp E. M., Popma J. K., Anakotta J. and Smits M. A. (1991) Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. Infect. Immun. **59**, 3079-3085.

7. Frey J. and Nicolet J. (1990) Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Clin. Microbiol. **28**, 232-236.
8. Rioux S., Galarneau C., Harel J., Kobish M., Frey J., Gottschalk M. and Jacques M. (2000) Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Microbial pathog. **28**, 279-289.
9. 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. **53**, 2110-2121.
10. 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.
11. Paradis S. E., Dubreuil D., Gottschalk M., Archambault M. and Jacques M. (1999) Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of LPS receptors. Current Microb. **39**, 313-320.
12. 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.
13. Bélanger M., Dubreuil D. and Jacques M. (1994) Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind to lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun. **62**, 868-873.

14. Bélanger M., Dubreuil D., Harel J., Girard C. and Jacques M. (1990) Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* **58**, 3523-3530.
15. 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.
16. Cruz W. T, Nedialkov Y. A., Thacker B. J., Mulks M. H., (1996) Molecular characterization of a 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**, 83-90.
17. Bunka S., Christensen C., Potter A. A., Willson P. J. and Gerlach G-F. (1995) Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **63**, 2797-2800.
18. Beaudet B., McSween G., Boulay G., Rousseau P., Bisailon J. G., Descoteaux J. P. and Ruppanner R. (1994) Protection of mice and swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination. *Vet. Microbiol.* **39**, 71-81.
19. 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.
20. Utrera V. and Pijoan C. (1991) Fimbriae in *A. pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet. Record.* **128**, 357-358.
21. Bossé, J. T. and MacInnes, J. I. (2000) Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Can. J. Vet. Res.* **64**, 145-150.

22. Bossé J. T. and MacInnes J. I. (1997) Genetic and biochemical analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease. *Infect. Immun.* **65**, 4389-4394.
23. Langford P. R., Loynds B. M. and Kroll S. (1996) Cloning and molecular characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**, 5035-5041.
24. Wilk M., Franz B. and Gerlach GF. (1997) Characterization of a large transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Zent. Vet.* **44**, 73-86.
25. Daban M., Medrano A. and Querol E. (1996) Cloning, sequencing and expression of the transferrin-binding protein 1 gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biochem. J.* **315**, 257-264.
26. 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.
27. Rossi-Campos A., Anderson C., Gerlach G. F., Klashinsky S., Potter A A. and Willson P. J. (1992). Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine.* **10**, 512-518.
28. 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.
29. Garcia-Cuellar C, Montanez C, Tenorio V, Reyes-Esparza J, Duran M. J., Negrete E, Guerrero A, de la Garza M. (2000) A 24-KDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin *in vitro*. *Can. J. Vet. Res.* **64**, 88-95.

30. Negrete-Abascal E., Garcia R. M., Reyes M. E., Godígez D. and de la Garza M. (2000) Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain protease and Apx toxins. FEMS Microbiol. Letters. **191**, 109-113.
31. 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.
32. Lee H. M., Nittayajarn A., Ross R. P., Rothschild C. B., Parsonage D., Claiborn A. and Rubens C. E. (1999) Characterization of *Enterococcus faecalis* alkaline phosphatase and use in identifying *Streptococcus agalactiae* secreted proteins. J. Bacteriol. **181**, 5790-5799.
33. Olario J., Johnson R. D., Chen W., Chadwick V. S. and Murray A. (2000) Identification of an immunogenic 18-Kda protein of *Helicobacter pylori* by alkaline phosphatase gene fusions. J. Med. Microbiol. **49**, 643-650.
34. Bina J. E., Nano F. E. and Hancock R. E. W. (1997) Utilization of alkaline phosphatase fusions to identify secreted proteins, including potential efflux proteins and virulence factors from *Helicabacter pylori*. FEMS Microbiol. Lett. **148**, 63-68.
35. Ward J., Fletcher J., Nair S. P., Wilson M., Williams R. J., Poole S. and Henderson B. (2001) Identification of the exported proteins of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by using alkaline phosphatase fusions. Infect. Immun. **69**, 2748-52.
36. Mintz K. P. and Fives-Taylor P. (1999) Identification of genes coding for exported proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect. Immun., **67**, 6217-6220.

37. Adler B., Bulach D., Chung J., Doughty S., Hunt M., Rajakumar K., Serrano M., van Zanden A., Zhang Y. and Ruffolo C. (1999) Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. J. Biotech. **73**, 83-90.
38. Blanco D. R., Gilaldi M., Champion C. I., Haake D. A., Chikami G. K., Miller J. N. and Lovett M. A. (1991) Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* genes encoding signal peptides and membrane-spanning sequences using a novel alkaline phosphatase expression vector. Mol. Microbiol. **5**, 2405-2415.
39. Braunstein M., Griffin T. J., Kriakov J. I., Friedman S. T, Grindley N. D. F. and Jacobs JR W. R. (2000) Identification of genes encoding exported *Mycobacterium tuberculosis* proteins using a Tn552'*phoA* in vitro transposition system. J. Bacteriol. **181**, 2732-2740.
40. Moran A. J., Doran J. L., Wu J., Treit J. D., Ekpo P., Kerr V. J., Roberts A. D., Orme I. M., Galant S. and Ress S. R., (1999) Identification of novel immunogenic *Mycobacterium tubersulosis* peptides that stimulate mononuclear cells from immun donors. FEMS Microbiol. Lett. **177**, 123-130.
41. Bondre V. P., Srivastava R., Shina V. B. and Srivastava B. S. (1997) Screening of Tn*phoA* mutants of *Vibrio cholerae* 0139 for identification of antigens involved in colonisation. Bacterial Structure and Pathogenicicty. J. Med. Microbiol. **46**, 1007-1011.
42. Pearce B. J., Yin Y. B. and Masure H. R. (1993) Genetic identification of exported proteins in *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Microbiol. **9**, 1037-1050.

43. Williams R. J., Ward J. M., Henderson B., Wilson M. and Nair S. P. (2000) Rapid screening for putative exported proteins from *Staphylococcus aureus* using alkaline phosphatase as a reporter molecule. *Mol. Biochech.* **15**, 11-20.
44. Manoil C. (1990) Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J. Bacteriol.* **172**, 1035-1042.
45. Matteucci M. and Lipetsky H. (1986) Alkaline phosphatase fusions: a tag to identify mutations that result in increased expression of secreted human growth hormone from *E. coli*. *Biotechnol.* **4**, 51-55.
46. Silhavy T. J., Berma M. L. and Enquist L. W. (1984) Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory publications. Cold Spring Harbor, NY.
47. Ruffolo C. G. and Adler B. (1996) Cloning, sequencing, expression and protective capacity of the oma87 gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membrane antigen. *Infect. Immun.* **64**, 3161-3167.
48. Yang Y.P., Thomas W. R., Chong P., Loosmore S. M. and Klein M. H. (1998) A 20-kilodalton N-terminal fragment of the D15 protein contains a protective epitope(s) against *Haemophilus influenzae* type a and type b. *Infect. Immun.* **66**, 3349-3354.
49. Sydenham M., Douce G., Bowe F., Ahmed S., Chatfield S. and Dougan G. (2000) *Salomonella enterica* serovar *typhimurium surA* mutants are attenuated and effective live oral vaccines. *Infect. Immun.* **68**, 1109-1115.
50. Pugsley, A. P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-Negative bacteria. *Microbiol. Reviews.* **57**, 50-108.

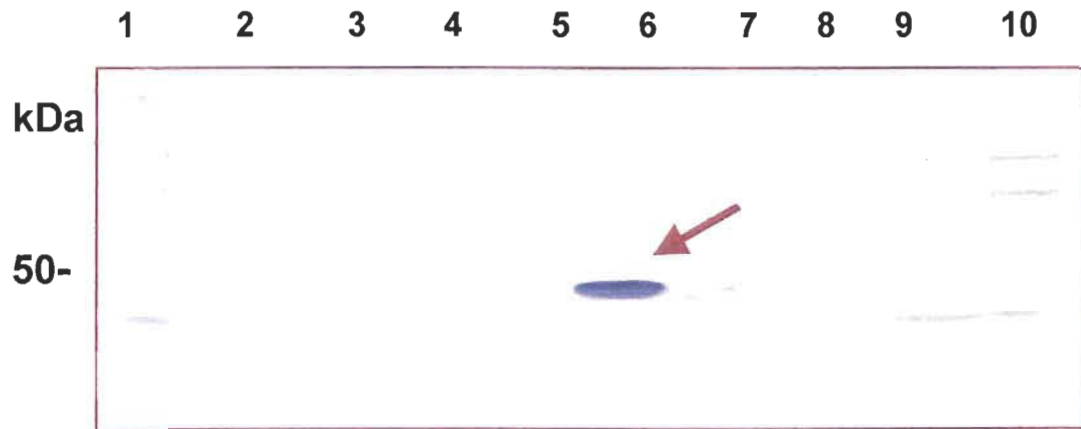


FIGURE 5.1 Result of a typical screening by immunoblot of the genomic library of App with antisera of convalescent pig. Line 1: protein marker (kaleidoscope: Biorad). Line 2 to 10: 9 different 'PhoA positive clones. Lane 6: the arrow indicated a protein fusion with PhoA that bind antibodies.

TABLE 5.1
Clones sharing homology to known *Pasteurellaceae* proteins

Library clone	Homology ^a	Identity (%)	No. of fused aa ^b	Nature ^c	Prediction of protein localization site ^d	Immunoreactive protein
<i>Actinobacillus</i> genus						
1-12	antigenic protein; <i>A. pleuropneumoniae</i>	86	196	TM	inner membrane	+
3-9a	hypothetical protein; <i>A. pleuropneumoniae</i> putative cytoplasmic membrane protein (CbiL); <i>A. pleuropneumoniae</i>	93	163	SP	inner membrane	
3-14		100	44	SP	outer membrane	+
3-23	hypothetical protein; <i>A. pleuropneumoniae</i>	99	135	----	cytoplasm	+
4-12	disulfide bound formation protein E; <i>A. pleuropneumoniae</i>	90	177	SP-TM	inner membrane	
<i>Pasteurella</i> genus						
	putative coproporphyrinogen III oxidase (HemN);					+
1-1	<i>P. multocida</i>	74	190	----	cytoplasm	+
1-2	outer membrane lipoprotein 1 (PlpA1); <i>P. haemolytica</i>	65	143	LP	outer membrane	+
1-3	ribose ABC transporter (RbsC); <i>P. multocida</i> putative cell shape-determining protein (MreD); <i>P.</i>	84	88	SP-TM	inner membrane	+
1-4	<i>multocida</i>		67	SP-TM	periplasmic space	+
1-27	Outer membrane antigene gene (oma87); <i>P. multocida</i>	48	199	----	Outer membrane	
3-5	hemin-binding surface protein A (HbpA); <i>P. multocida</i>	59	59	----	Outer membrane	+
2-5	unknown protein; <i>P. multocida</i>	66	73	SP	cytoplasm	+
3-2	unknown protein; <i>P. multocida</i>	77	48	TM	cytoplasm	+
3-4	unknown protein; <i>P. multocida</i>	51	106	SP	outer membrane	
3-16	inner membrane peptidase LepB (LepB); <i>P. multocida</i>	52	52	SP	periplasmic space	+
4-4	cytochrome C-type protein (NapC); <i>P. multocida</i>	62	163	SP	inner membrane	+
4-5	TRK system potassium uptake protein (TrkH); <i>P. multocida</i>	63	81	SP	inner membrane	+

TABLE 5.1 (continued)

4-6	cytochrome c-type biogenesis protein (CcmH); <i>P. multocida</i>	68	102	SP	periplasmic space	
4-16	membrane-bound lytic murein transglycosylase C (MltC); <i>P. multocida</i>	76	143	LP	outer membrane	+
4-17	unknown protein; <i>P. multocida</i>	29	97	SP	periplasmic space	+
<i>Haemophilus</i> genus						
1-5	acyl carrier protein (FabZ); <i>H. influenzae</i>	72	33	----	cytoplasm	+
1-7	hypothetical protein; <i>H. influenzae</i>	74	136	SP	inner membrane	+
1-10	conserved hypothetical protein; <i>H. influenzae</i>	51	121	TM	inner membrane	
1-15	malate dehydrogenase (Mdh); <i>H. influenzae</i>	71	75	SP	inner membrane	+
					periplasmic space or outer	
1-18	stationary phase survival protein (SurA); <i>H. influenzae</i>	58	68	SP	membrane	+
1-19	malate dehydrogenase (mdh); <i>H. influenzae</i>	79	62	SP	periplasmic space	+
1-23	28 kDa outer membrane protein (hlpA); <i>H. influenzae</i>	63	143	LP	outer membrane	
2-2	hypothetical protein; <i>H. somnus</i>	58	171	TM	cytoplasm	+
3-11	outer membrane lipoproteins carrier (LolA); <i>H. influenzae</i>	52	127	SP	outer membrane	
	predicted N6-adenine-specific DNA methylase; <i>H. influenzae</i>					
3-20		79	256	----	cytoplasm	
4-3	hypothetical protein; <i>H. somnus</i>	39	108	SP	periplasmic space	
4-7	NADH:ubiquinone oxidoreductase; <i>H. influenzae</i>	57	98	SP	periplasmic space	+
4-9	organic solvent tolerance protein; <i>H. influenzae</i>	50	120	SP	periplasmic space	
4-14	hypothetical protein; <i>H. influenzae</i>	84	44	SP-TM	inner membrane	+

^aAnalysis made with BLASTp program on the NCBI site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

^bNumber of amino acids in the protein fused to the phoA protein.

^cAnalysis made with PSORT program (<http://psort.nibb.ac.jp/>). Prediction for the protein structure; Tm: transmembrane region; SP: signal peptide sequence and LP for lipoprotein signature. The analysis for the prediction of transmembrane region of each clone was made with the logiciel TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

^dThe prediction of protein localization sites was possible with PSORT program.

TABLE 5.2
Clones sharing homology to non *Pasteurellaceae* proteins

Library clone	Homology ^a	Identity (%)	No. of fused aa ^b	Nature ^c	Prediction of protein localization site ^d	Immunoreactive protein
1-8	hypothetical protein; <i>Desulfitobacterium hafniense</i>	41	77	SP	periplasmic space	+
1-11	Formate--tetrahydrofolate ligase; <i>Clostridium acetobutylicum</i>	71	28	----	cytoplasmic	+
1-24	conserved hypothetical protein; <i>Neisseria meningitidis</i>	89	102	----	cytoplasmic	+
1-33	anaerobic C4-dicarboxylate transporter (DcuA); <i>Serratia marcescens</i>	61	24	SP	periplasmic space or outer membrane	+
1-34	anaerobic C4-dicarboxylate transporter (DcuA); <i>S. marcescens</i>	61	24	SP	periplasmic space or outer membrane	+
1-38	acid shock protein; <i>E. coli</i>	42	110	SP	membrane	+
2-1	endopeptidase O (PepO); <i>Porphyromonas gingivalis</i>	26	217	----	cytoplasmic	+
3-3	conserved hypothetical protein; <i>Staphylococcus aureus</i>	46	86	SP	periplasmic space	+
4-2	GntP family permease; <i>Yersinia pestis</i>	75	44	SP	Inner membrane	+
4-13a	UDP-sugar hydrolase (5'-nucleotidase); <i>E. coli</i>	70	79	SP	outer membrane	+

^aAnalysis made with BLASTp program on the NCBI site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

^b Number of amino acids in the protein fused to the phoA protein.

^cAnalysis made with PSORT program (<http://psort.nibb.ac.jp/>). Prediction for the protein structure; Tm: transmembrane region; SP: signal peptide sequence and LP for lipoprotein signature. The analysis for the prediction of transmembrane region of each clone was made with the logiciel TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

^d The prediction of protein localization sites was possible with PSORT program.

TABLE 5.3

Predicted amino acid sequences of clones encoding unique proteins

Library clone	Predicted amino acid sequence ^a	No. of fused aa ^b	Nature ^c	Prediction of protein localization sites ^d	Immunoreactive protein
1-24	MGNKRRNMSY TKLFYHIVFR TLQSVPAINE ENEKELYQYI WAFCQQQKCT LHRINGMPD	102 aa	----	cytoplasm	+
3-8a	MKIRFLVGLI FSLCFSPFLQ GKMMQITIGQ QIFEAEADT EAARQLTELL PLTLEMQDHL RNEKFAELPQ NLTAID	76 aa	SP	periplasmic space	
3-10	MKKLVFLTIP FGLSACGSAD LQTVWQDVSN LDKLFEPEDR KGVAVTKGYP VSDVAMNSTP QKTGKKVATK QSITHQRINT AQCKDADDWY LDGYRVGRSF ASQKAAMYQQ RVSICKRMLS HAD	123 aa	LP	outer membrane	+
3-17	MKKLLRNVLL SGMLFIFLPT QVIADDNSVF SRYEQAKLKI TYQGEVGNLL QQLAQRLKIG FIVYELDTAH KVSISNKEDT AIKTLIQQLS AQMPDADIRF EKIED	105 aa	SP	periplasmic space	+

^aAnalysis made with blastp program on the NCBI site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), boldface: leader peptide.^bNumber of amino acids in the protein fused to the phoA protein.^cAnalysis made with PSORT program (<http://psort.nibb.ac.jp/>).^dPrediction for the protein structure; Tm: transmembrane region; SP: signal peptide sequence and LP for lipoprotein signature. The analysis for the prediction of transmembrane region of each clone was made with the logiciel TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). The prediction of protein localization sites was possible with PSORT program.

In bold: leader peptide.

CHAPITRE VI

CONCLUSION GÉNÉRALE

La pleuropneumonie porcine est un problème très actuel et de grands efforts dans le domaine de la recherche fondamentale sont apportés afin de mieux comprendre la pathogénicité de cette maladie. Depuis les années 50, au moment où la bactérie *A. pleuropneumoniae* a été identifiée formellement comme l'agent étiologique de pleuropneumonie porcine, les connaissances sur la bactérie et la maladie n'ont cessé de croître. Malgré cela, la pleuropneumonie porcine est encore présente à travers le monde et engendre encore des pertes économiques considérables (Taylor, 1999).

Notre étude a donc été amorcée dans l'optique d'identifier de nouveaux gènes codant pour des protéines agissant comme facteurs de virulence et protéines antigéniques. Et ce, dans le but d'être éventuellement en mesure de mieux comprendre les mécanismes de virulence d'*A. pleuropneumoniae* et ainsi, apporter de nouveaux outils pour l'élaboration de traitements préventifs. Dans ce dernier chapitre, un retour sur la technique utilisée sera fait en relation avec les limites de la méthode et sur ce que cela a permis d'accomplir.

6.1 La technologie PhoA en relation avec les facteurs de virulence et les protéines antigéniques

L'utilisation du gène tronqué de la phosphatase alcaline permet l'identification rapide de gènes codant pour des protéines de la membrane externe ou des protéines sécrétées. L'utilisation du vecteur pHRM104 a permis la construction d'une banque génomique de séquence d'exportation d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 souche 4074. Ce type de construction plasmidique apporte toutefois quelques limites à la technologie PhoA:

- 1) demande absolument le clonage d'une séquence contenant une région promotrice reconnue par la bactérie *E. coli* dans laquelle est transformée la banque génomique;
- 2) ne permettra pas d'identifier un gène qui fait partie d'un opéron et qui n'est pas le premier gène suivant la région promotrice;
- 3) le clonage du fragment provenant du génome à l'étude doit être fait dans le bon cadre de lecture, c'est-à-dire dans le cadre de lecture permettant l'expression PhoA;
- 4) il existe d'autres systèmes de transport pour les protéines de la membrane externe et des protéines sécrétées n'ayant pas de séquence d'exportation. Ces systèmes n'utilisent pas le système de sécrétion des protéines Sec (pour une revue voir Stuber *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2001). La technologie PhoA ne permet pas leur identification.

6.2 Les analyses bio-informatiques

La banque génomique de séquences d'exportation dans le vecteur pHRM104 a permis un criblage de 8000 clones. Les 95 fusions positives avec '*phoA* (restaurant l'activité phosphatase alcaline) de ces 8000 clones représentent un rendement d'environ 1.2%, ce qui correspond au rendement obtenu chez d'autres bactéries. Une fois les séquences nucléotidiques obtenues, la traduction en séquences d'acides aminés a été faite en utilisant les outils disponibles sur le site « ExPASy Molecular Biology Server » (<http://ca.expasy.org/>). Pour la recherche de séquence d'exportation, les analyses des séquences des différents clones ont été faites à l'aide du logiciel Psort (<http://psort.nibb.ac.jp/>). Ce logiciel établit la présence d'une séquence d'exportation ainsi que la position probable de la protéine mature. Finalement, les séquences ont été soumises à Tmpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), un logiciel qui permet l'analyse des séquences protéiques afin d'établir la présence de segment transmembranaire. Cette information supplémentaire nous permet de poser une hypothèse de plus quant à la localisation des protéines dans la membrane externe. Une

liste des nombreux logiciels disponibles à cette fin peut être consultée à l'adresse Internet suivante : <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/prot-transmembrane.html>.

6.3 Des protéines potentiellement antigéniques.

Des 95 fusions positives, 41 ont démontré un caractère immunogène probable. C'est-à-dire que 41 des fusions positives avec PhoA ont été reconnus par les anticorps d'un sérum de porc convalescent à la maladie. Il s'agit de résultats très intéressants, car la mise en évidence d'une protéine stimulant de façon significative le système immunitaire du porc permettrait l'élaboration d'un nouveau vaccin.

Les clones n'ayant pas été reconnus par les anticorps ne peuvent être définitivement exclus des protéines d'intérêts quant à leur caractère antigéniques. En effet, la procédure d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide provoque la perte de la structure quaternaire des protéines, et de ce fait, une disparition de certains sites de reconnaissance (épitopes) pour les anticorps. De plus, la courte région clonée en amont du gène '*phoA* ne contient pas nécessairement d'épitope et ce, même si la protéine est un immunogène. Les résultats positifs doivent également être évalués avec beaucoup de précautions. En effet, les protéines reconnues par les anticorps ne sont pas nécessairement des protéines qui stimulent le système immunitaire du porc lors du processus infectieux. En d'autres mots, lors d'une infection bactérienne chez le porc (également chez les autres espèces) un grand nombre de bactéries meurent libérant ainsi les protéines cytoplasmiques. Ces dernières peuvent être reconnues comme protéines étrangères et stimuler la production de nouveaux anticorps.

La technique de criblage des protéines de fusions avec les anticorps doit être utilisée avec circonspection. On doit tenir compte des différentes significations des résultats et analyser ceux-ci en association avec les analyses bio-informatiques.

Parmi les gènes identifiés chez *A. pleuropneumoniae* lors de cette étude, plusieurs semblent démontrer un potentiel antigénique. Les homologies avec des protéines connues

pour leur caractère antigénique confirme leur importance probable dans la participation à la réponse humorale de l'hôte. Parmi les protéines homologues aux séquences d'acides aminés associées aux différents clones de la banque, se trouvent des protéines particulièrement intéressantes : deux lipoprotéines antigéniques chez *Pasteurella haemolytica*; Oma87, un antigène de la membrane externe chez *Haemophilus influenzae*; des protéines inconnues de la membrane externe.

Selon les tableaux 5.1 et 5.2, on remarque également un certain nombre de clones dont les protéines associées n'ont pas été reconnues par les anticorps d'un porc convalescent. Et ce, malgré le fait que les séquences d'acides aminés soient homologues avec des protéines reconnues comme des protéines immunogènes chez d'autres espèces bactériennes. Comme il est expliqué précédemment, il est impossible à ce stade d'infirmier le caractère antigénique de ces protéines.

Ces différents résultats démontrent la nécessité d'études supplémentaires pour chaque gène identifié. Comme il est mentionné dans ce chapitre, il est nécessaire d'avoir la protéine en entier et ce dans sa forme naturelle afin d'être en mesure de déterminer son potentiel antigénique chez le porc.

6.4 De nouveaux gènes de virulence

Les analyses bio-informatiques des différentes séquences démontrent une grande variété dans les nouveaux gènes identifiés. La majorité des gènes clonés sont fortement homologues avec des gènes des bactéries de la famille des *Pasteurellaceae*, phénomène normal car les bactéries du genre *Actinobacillus*, *Haemophilus* et *Pasteurella* sont très semblables. Un certain nombre de clones sont homologues à des gènes qui ne sont pas associées à cette famille bactérienne. Par contre, dans ce groupe, la majorité des bactéries sont des bactéries Gram négatives. Finalement, un certain nombre de gènes ne sont homologues à aucun gène connu. Dans ces cas-ci, nous sommes donc en présence de gènes uniques.

Toutefois, il faut toujours garder en mémoire que ces analyses sont provisoires étant donné l'avancement rapide des données génomiques bactériennes disponibles dans les nombreuses banques de données. Les résultats d'analyses seront de plus en plus précis, en étroite relation avec la disponibilité des séquences bactériennes dans les banques de données publiques.

L'analyse des séquences d'acides aminés associées aux différentes séquences clonées en amont du gène '*phoA*' a permis de cibler des facteurs de virulence potentiels encore inconnus chez *A. pleuropneumoniae*. La séquence homologue avec Oma87 chez la bactérie *P. multocida* en est un exemple. Si cette protéine se comporte de la même façon que chez *P. multocida*, il s'agira d'une avancée importante concernant la virulence d'*A. pleuropneumoniae*.

6.5 Perspectives d'avenir

Il existe un grand nombre d'avenues possibles suite aux résultats de cette étude. Dans un premier temps les protéines ayant des homologies avec des antigènes reconnus chez d'autres bactéries peuvent faire le sujet d'un premier choix pour procéder à l'expression des gènes associés. Une fois les protéines obtenues, la production d'anticorps peut être faite à partir de porc. Ces anticorps pourront être testés sur les lysats de bactéries provenant de cultures bactériennes d'*A. pleuropneumoniae* obtenues lors de culture dans des conditions *in vitro* et *in vivo*. On pourra, dans ce cas, différencier les protéines produites en conditions *in vivo* seulement, ce qui nous donnerait un outil puissant pour la production de vaccin et des informations supplémentaires quant au mode d'infection de la bactérie. Les anticorps pourraient également servir à établir si les protéines sont des antigènes protecteurs, c'est-à-dire des protéines pouvant servir dans la fabrication de vaccins.

Dans un deuxième temps, les gènes codant pour les protéines d'intérêts pourraient être inactivés chez la bactérie *A. pleuropneumoniae* faisant en sorte d'empêcher toute expression de la protéine. Une fois la souche mutante obtenue, on pourrait vérifier si la

virulence de la bactérie est modifiée (par des test en condition *in vivo*) et le cas échéant , considérer la production de vaccin vivant atténué.

Finalement, un criblage bio-informatique de séquences d'exportation sur la séquence complète du génome complet d'*A. pleuropneumoniae* pourrait être faite. De cette façon, les séquences codant pour les séquences d'exportation pourraient toutes être mises en évidence, et ainsi nous fournir une banque de séquences d'exportation précieuse pour l'élaboration de futurs vaccins et pour l'acquisition d'informations en relation avec la virulence d'*A. pleuropneumoniae*.

À partir des résultats que nous avons obtenus, les travaux de recherche sur les facteurs de virulence et les protéines antigéniques d'*A. pleuropneumoniae* viennent de franchir une nouvelle étape. Une grand nombre de données nous sont maintenant disponibles afin d'augmenter nos connaissances sur la pathogénicité d'*A. pleuropneumoniae*. Nous serons également en mesure de mettre en évidence de nouveaux facteurs de virulence et ainsi accroître la quantité d'information disponible pour l'élaboration de traitements préventifs efficaces contre la pleuropneumonie porcine.

BIBLIOGRAPHIE

- Adler B., Bulach D., Chung J., Doughty S., Hunt M., Rajakumar K., Serrano M., van Zanden A., Zhang Y. & Ruffolo C. (1999) Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. J. Biotechnol., 73, 83-90.
- Andresen L.O., Klausen J., Barfod K. & Sorensen V. (2002) Detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 12 in pig serum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay. Vet. Microbiol., 8, 61-7.
- Baarsch M.J., Scamurra R.W., Burger K., Foss D.L., Maheswaran S.K. & Murtaugh M. P. (1995) Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun., 63, 3587-3594.
- Baltes N., Tonpitak W., Gerlach G.F., Hennig-Pauka I., Hoffmann-Moujahid A., Ganter M. & Rothkotter H.J. (2001) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. Infect. Immun., 69, 472-8.
- Beaudet R., McSween G., Boulay G., Rousseau P., Bisailon J.G., Descoteaux J.P. & Ruppanner R. (1994). Protection of mice and swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination. Vet. Microbiol., 39, 71-81.
- Bélanger M., Dubreuil D. & Jacques M. (1990) Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun., 62, 868-873.
- Bélanger M., Dubreuil D., Harel J., Girard C. & Jacques M. (1990) Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. Infect. Immun., 58, 3523-3530.
- Bélanger M., Dubreuil D. & Jacques M. (1994) Identification of porcine respiratory tract mucus proteins binding lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 15, 249-51.
- Bélanger M., Bégin C. & Jacques M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. Infect. Immun., 63, 656-662.

- Biberstein E.L., Gunnarsson A. & Hurvell B. (1977) Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus* spp from swine. *Am. J. Vet. Res.*, 38, 7-11.
- Bina J. E., Nano F.E. & Hancock R.E.W. (1997) Utilization of alkaline phosphatase fusions to identify secreted proteins, including potential efflux proteins and virulence factors from *Helicabacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 148, 63-68.
- Blackall P.J., Bowles R., Pahoff J.L. & Smith B.N. (1999) Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in 1993 to 1996. *Aust. Vet J.*, 77, 39-43.
- Blackall P.J., Klaasen H.L., van D.B., Kuhnert P. & Frey J. (2002) Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet. Microbiol.*, 84, 47-52.
- Blanco D.R., Gilaldi M., Champion C.I., Haake D.A., Chikami G.K., Miller J.N. & Lovett M.A. (1991) Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* genes encoding signal peptides and membrane-spanning sequences using a novel alkaline phosphatase expression vector. *Mol. Microbiol.*, 5, 2405-2415.
- Bossé J.T., Johnson R.P. & Rosendal S. (1990) Serodiagnosis of pleuropneumonia using enzyme-linked immunosorbent assay with capsular polysaccharide antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5 and 7. *Can. J. Vet. Res.*, 54, 427-31.
- Bossé J.T., Johnson R.P., Nemec M. & Rosendal S. (1992) Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.*, 60, 479-84.
- Bosse J.T., Friendship R., Rosendal S. & Fenwick B.W. (1993) Development and evaluation of a mixed-antigen ELISA for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 5, and 7 infections in commercial swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5, 359-62.
- Bossé J.T. & MacInnes J.I. (1997) Genetic and biochemical analyses of *Actinibacillus pleuropneumoniae* urease. *Infect. Immun.*, 65, 4389-4394.

- Bossé J.T. & MacInnes, J.I. (2000) Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. Can. J. Vet. Res., 64, 45-150.
- Bunka S., Christensen C., Potter A.A., Willson P.J. & Gerlach G.F. (1995) Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. Infect. Immun., 63, 2797-2800.
- Burne R.A. & Chen Y.Y. (2000) Bacterial ureases in infectious diseases. Microbes. Infect., 2, 533-42.
- Chiers K., van O.I., De L.P., Ducatelle R., Carel S. & Haesebrouck F. (1998) Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. Vet. Q., 20, 65-69.
- Cho, W-S. & Chae C. (2001) Expression of the *ApxIV* gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Comp. Pathol., 125, 34-40.
- Christie R., Atkins N.E. & Munch-Petersen E. (1944) A note on a lytic phenomenon shown by β -streptococci. Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 22, 197.
- Cruz W.T., Nedialkov Y.A., Thacker B.J. & Mulks M.H., (1996) Molecular characterization of a 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun., 64, 83-90.
- Deneer H.G. & Potter A.A. (1989a) Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Infect. Immun., 57, 798-804.
- Deneer H.G. & Potter A.A. (1989b) Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Microb. Pathog., 6, 425-32.
- Derman A.I. & Beckwith J. (1995) *Escherichia coli* alkaline phosphatase localized to the cytoplasm slowly acquires enzymatic activity in cells whose growth has been suspended: a caution for gene fusion studies. J. Bacteriol., 177, 3764-3770.

- Dom P., Haesebrouck F., Kamp E.M. & Smits M.A. (1994) NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* stains: production of RTX toxins and interactions with porcine phagocytes. *Vet. Microbiol.*, 39, 205-218.
- Dom P., Haesebrouck F., Ducatelle R. & Charlier G. (1994) *In vivo* association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infect. Immun.*, 62, 1262-1267.
- Dom P., Haesebrouck F., Kamp E.M. & Smits M.A. (1992) Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolytins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infect. Immun.*, 60, 4328-4334.
- Fekkes P. & Driessen A.J.M. (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 161-173.
- Fenwick B. & Henry S. (1994) Porcine pleuropneumonia, clinical update, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 204, 1334-1340.
- Fischer W., Haas R. & Odenbreit S. (2002) Type IV secretion systems in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.*, 292, 159-68.
- Fodor L., Varga J., Molnar E. & Hajtos I. (1989) Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. *Vet. Microbiol.*, 20, 173-180.
- Forest K.T., Langford P.R., Kroll J.S. & Getzoff E.D. (2000) Cu,Zn superoxide dismutase structure from a microbial pathogen establishes a class with conserved dimer interface. *J. Mol. Biol.*, 296, 145-153.
- Frey J. & Nicolet J. (1990) Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 232-236.
- Frey J., Bossé J.T., Chang Y.F., Cullen J.M., Fenwick B., Gerlach G.F., Gygi D., Haesebrouck F., Inzana T.J., Jansen R., Kamp E.M., Macdonald J., Macinnes J.I., Mittal K.R., Nicolet J., Rycroft A.N., Segers R.P. A.M., Smits M.A., Stenbaeck E., Struck D.K., Van Den Bosch J.F., Willson P.J. & Young, R. (1993) *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of hemolysins, cytolytins, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.*, 139, 1723-1728.

- Frey, J. (1995) Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. Trends. Microbil., 3, 257-261.
- Frey J, Kuhnert P., Villiger L. & Nicolet J. (1996) Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins. Res. Microbiol., 147, 351-361.
- Fuller T.E. & Mulks M.H. (1995) Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* riboflavin biosynthesis genes. J. Bacteriol., 177, 7265-7270.
- Fuller T.E., Thacker B.J. & Mulks M.H. (1996) A riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is attenuated in swine. Infect. Immun., 64, 4659-4664.
- Fuller T.E., Thacker B.J., Duran C.O. & Mulks M.H. (2000) A genetically-defined riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a live attenuated vaccine. Vaccine., 18, 2867-2877.
- Garcia-Cuellar C., Montanez C., Tenorio V., Reyes-Esparza J., Duran M.J., Negrete E., Guerrero A. & de I.G. (2000) A 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleave actin *in vitro*. Can. J. Vet. Res., 64, 88-95.
- Gerlach G.F., Klashinsky S., Anderson C., Potter A.A. & Wilson P.J. (1992) Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. Infect. Immun., 60, 3253-3261.
- Gerlach G.F., Anderson C., Potter A.A., Klashinsky S. & Willson P.J. (1992) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun., 60, 892-898.
- Gerlach G.F., Anderson C., Klashinsky S., Rossi-Campos A., Potter A.A. & Wilson P.J. (1993) Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Infect. Immun., 61, 565-572.
- Gomez M., Johnson S. & Gennaro M.L. (2000) Identification of secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by a bioinformatic approach. Infect. Immun., 68, 2323-2327.

- Gonzalez G.C., Yu R.H., Rosteck P.R.J. & Schryvers A.B. (1995) Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferring receptor genes. *Microbiol.*, 141, 2405-2416.
- Gram T., Ahrens P. & Nielsen J.P. (1996) Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. *Vet. Microbiol.*, 51, 95-104.
- Gygi D., Nicolet J., Hughes C. & Frey J. (1992) Functional analysis of the Ca^{2+} -regulated hemolysin I operon of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype I. *Infect. Immun.*, 60, 3059-3064.
- Haesebrouck F., Chiers K., Van Overbeke I. & Ducatelle, R. (1997) *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.*, 58, 239-249.
- Higgins R., Larivière S., Mittal K.R., Desrosiers R., Désilets A., Bédard-Royal C., Clermont R., Éthier R. & Simard J. (1982) La pleuropneumonie porcine au Québec. *Med. Vét. Q.*, 12, 33-47.
- Hoffman C.S. & Wright A. (1985) Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studying protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 5107-5111.
- Huang H., Potter A.A., Campos M., Leighton F.A., Willson P.J., Haines D.M. & Yates W.D.G. (1999) Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*, part 2: roles of proinflammatory cytokines. *Can. J. Vet. Res.*, 63, 69-78.
- Hueck C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 379-433.
- Ingham A., Zhang Y. & Prideaux C. (2002) Attenuation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by inactivation of *aroQ*. *Vet. Microbiol.*, 84, 263-73.
- Inzana T.J., Ma J., Workman T., Gogolewski R.P. & Anderson P. (1988) Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, 56, 1880-1889.

- Inzana T.J., Todd J., Ma J. & Veit H. (1991) Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. *Microb. Patho.*, 10, 281-296.
- Ito H., Osaki M., Uchida I., Ohya T. & Sekizaki T. (1998) Demonstration of the third antigenically distinct outer membrane lipoprotein (OmlA) in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Fems Microbiol. Lett.*, 167, 303-308.
- Jansen R., Briaire J., Kamp E.M. & Smits M.A. (1992) Comparison of the cytolysin II genetic determinants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect. Immun.*, 60, 630-636.
- Jansen R. (1994) The RTX toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In anonymous, the RTX toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*., 9-24.
- Jansen R., Mulks M.H. & Thacker B.J. (1994) Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.*, 38, 329-349.
- Jansen R., Briaire J., van Geel A.B. M., Kamp E.M., Gielkens A.L.J. & Smits M.A. (1994) Genetic map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin (Apx) operons: characterization of the ApxIII operon. *Infect. Immun.*, 62, 4411-4418.
- Jolie R., Mulks M. H. & Thacker B. J. (1994) Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.*, 38, 329-349.
- Jolie R.A., Mulks M.H. & Thacker B.J. (1995) Cross-protection experiments in pigs vaccinated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* subtypes 1A and 1B. *Vet. Microbiol.*, 45, 383-391.
- Kamp E. M., Popma J. K., Anakotta J. & Smits, M. A. (1991) Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 59, 3079-3085.
- Kilian M. (1976) A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.*, 93, 9-62.
- Klausen J., Andressen L. O., Barfod K. & Sorensen V. (2002) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 in pig herds. *Vet. Microbiol.*, 88, 223-232.

- Lally E. T., Hill R. B., Kieba I. R. & Korostoff J. (1999). The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.*, 7, 356-361.
- Lalonde G., O'Hanley P.D., Stocker B.A. & Denich K.T. (1994) Characterization of a 3-dehydroquinase gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* with homology to the eukaryote genes qa-2 and QUTE. *Mol. Microbiol.*, 11, 273-280.
- Langford P.R., Loynds B.M. & Kroll J.S. (1996) Cloning and molecular characterization of Cu,Zn superoxyde dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 64, 5035-5041.
- Lee H.M., Nittayajarn A., Ross R.P., Rothschild C.B., Parsonage D., Claiborn A. & Rubens C.E. (1999) Characterization of *Enterococcus faecalis* alkaline phosphatase and use in identifying *Streptococcus agalactiae* secreted proteins. *J. Bacteriol.*, 181, 5790-5799.
- Lim E.M., Rauzier J., Timm J., Torrea G., Murray A., Gicquel B. & Portnoi D. (1995) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA sequences encoding exported proteins by using *phoA* gene fusions. *J. Bacteriol.*, 177, 59-65.
- Lombin L. H., Rosendal S. & Demoor J. (1985) Biochemical and serological identification of strains of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 10, 393-7.
- Maier E., Reinhard N., Benz R. & Frey J. (1996) Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII and Apx III of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 64, 4415-4423.
- Manoil C. & Beckwith J. (1985) TnpA: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82, 8129-33.
- Manoil C. (1990) Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J. Bacteriol.*, 172, 1035-1042.
- Manoil C., Mekalanos J.J. & Beckwith J. (1990) Alkaline phosphatase fusions: Sensors of subcellular location. *J. Bacteriol.*, 172, 515-518.
- Martin P.R. & Mulks M.H. (1999) Cloning and characterization of a gene encoding an antigenic membrane protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* with homology to ABC transporters. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 25, 245-254.

- Mduli K.E., Treit J.D., Kerr V.J. & Nano F.E. (1995) New Vectors for the in vitro generation of alkaline phosphatase fusions to proteins encoded by G +C-rich DNA. *Gene.*, 155, 133-4.
- Miller R.A. & Britigan B.E. (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10, 1-18.
- Mintz K.P. & Fives-Taylor P. (1999) Identification of genes coding for exported proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.*, 67, 6217-6220.
- Mittal K. R., Higgins R., Larivière S. & Leblanc D. (1984) A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 715-9.
- Mittal K. R., Higgins R., Larivière S. & Nadeau M. (1992) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.*, 32, 135-148.
- Mittal K.R., Bourdon S. & R. Higgins. (1998) Évolution de la distribution des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* provenant de porcs malades au Québec. *Med. Vét. Q.*, 28, 91-92.
- Moran A.J., Doran J.L., Wu J., Treit J.D., Ekpo P., Kerr V.J., Roberts A.D., Orme I M., Galant S. & Ress S.R., (1999) Identification of novel immunogenic *Mycobacterium tuberculosis* peptides that stimulate mononuclear cells from immun donors. *FEMS Mycrobial. Lett.*, 177, 123-130.
- Muller S., Feldman M.F. & Cornelis G.R. (2001) The Type III secretion system of Gram-negative bacteria: a potential therapeutic target? *Expert. Opin. Ther. Targets.*, 5, 327-339.
- Negrete-Abascal E., Tenorio V.R., Serrano J.J., Garcia C. & de la Garza M. (1994) Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.*, 58, 83-86.
- Negrete-Abascal E., Tenorio V.R., Guerrero A.L., Garcia R.M., Reyes M.E. & de la Garza M. (1998) Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Can. J. Vet. Res.*, 62, 183-90.

- Negrete-Abascal E., Garcia R.M., Reyes M.E., Godígez D. & de la Garza, M. (2000) Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain protease and Apx toxins. FEMS Microbiol. Lett., 191, 109-113.
- Nielsen R. (1984) *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes--cross protection experiments. Nord. V. Med., 36, 221-34.
- Nielsen R. (1985) Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 10. Acta. Vet. Scand., 26, 581-5.
- Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. & von H.G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng., 10, 1-6.
- 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.
- Nielsen R. (1994) *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes, cross protection experiments. Nord. Vet. Med., 36, 221-234.
- Niven D. F. & Lévesque M. (1988) V-Factor dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008/76). International Journal of Systematic Bacteriology., 38, 319-320.
- Olario J., Johnson R.D., Chen W., Chadwick V.S. & Murray A. (2000) Identification of an immunogenic 18-Kda protein of *Helicobacter pylori* by alkaline phosphatase gene fusions. J. Med. Microbiol., 49, 643-650.
- Ostrowski J., Wu J.Y., Rueger D.C., Miller B.E., Siegel L.M. & Kredich N.M. (1989) Characterization of the *cysJIH* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. DNA sequences of *cysI* and *cysH* and a model for the siroheme-Fe₄S₄ active center of sulfite reductase hemoprotein based on amino acid homology with spinach nitrite reductase. J. Biol. Chem., 264, 15726-37.
- Paradis S. E., Dubreuil D., Rioux S., Gottschalk M. & Jacques M. (1994). High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. Infect. Immun., 62, 3311-3319.

- Paradis S.E., Dubreuil D., Gottschalk M., Archambault M. & Jacques M. (1999) Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of LPS receptors. *Curr. Microbiol.*, 39, 313-320.
- Pearce B.J., Yin Y.B. & Masure H.R. (1993) Genetic identification of exported proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 9, 1037-50.
- Perry M.B. (1990) Structural analysis of the lipopolysaccharide of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 10. *Biochem. Cell. Biol.*, 68, 808-10.
- Pi Joan C. & Trigo F. (1990) Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates atrophic rhinitis. *Can. J. Vet. Res.*, 54 Suppl., S16-S21.
- Pohl S., Bertschinger H.U., Frederiksen W. & Mannheim, W. (1983) Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica* -like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 33, 510-514.
- Prideaux C.T., Lenghaus C., Krywult J. & Hodgson A.L.M. (1999) Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the ApxII operon. *Infect. Immun.*, 67, 1962-1966.
- Pugsley A.P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, 57, 50-108.
- Rioux S., Dubreuil J.D., Bégin C., Laferrière C., Martin D. & Jacques M. (1997) Evaluation of a protective efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 lipopolysaccharide-protein conjugate in mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 20, 63-74.
- Rioux S., Bégin C., Dubreuil J.D. & Jacques M (1997) Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr. Microbiol.*, 35, 139-144.

- Rioux S., Galarneau C., Harel J., Frey J., Kobish M., Gottschalk M. & Jacques M. (2000) Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb. Pathog.*, 28, 279-289.
- Rosendal S. & MacInnes J.I. (1990) Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.*, 51, 711-717.
- Rossi-Campos A., Anderson C., Gerlach G.F., Klashinsky S., Potter A.A. & Willson P.J. (1992) Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine.*, 10, 512-8.
- Schaller A., Kuhn R., Kuhnert P., Nicolet J., Anderson T.J., MacInnes J.I., Segers R.P. A.M. & Frey J. (1999) Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiol.*, 145, 2105-2116
- Schaller A., Djordjevic S.P., Eamens G.J., Forbes W.A., Kuhn R., Kuhnert P., Gottschalk M., Nicolet J. & Frey J. (2001) Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. *Vet. Microbiol.*, 79, 47-62.
- Schiefer B., Moffat R.E., Greenfield J., Agar J.L. & Majka J.A. (1974) Porcine *Haemophilus parahaemolyticus* pneumonia in Saskatchewan. *Can. J. Comp. Med.*, 38, 99-104.
- Sebunya T.N.K., Saunders J.R. & Osborne A.D. (1983) Dose response relationship of *Haemophilus pleuropneumoniae* aerosols in pigs. *Can. J. Comp. Med.*, 47, 54-56.
- Shea R.J. & Mulks M.H. (2002) *ohr*, Encoding an organic hydroperoxide reductase, is an in vivo-induced gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun.*, 70, 794-802.
- Sheehan B.J., Langford P.R., Rycroft A.N. & Kroll J.S. (2000) [Cu,Zn]-Superoxide dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are unattenuated in infections of the natural host. *Infect. Immun.*, 68, 4778-81.
- Shope R. E. (1964) Porcine contagious pleuropneumonia. *J. Exp. Med.*, 119, 357-368.

- Sirois M., Lemire E.G. & Lévesque R.C. (1991) Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 29, 1183-1187.
- Smits M.A., Briaire J., Jansen R., Smith H.E., Kamp E.M. & Gielkens A.L. (1991) Cytolysins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9. Infect. Immun., 59, 4497-4504.
- Stuber K., Frey J., Burnens A.P. & Kuhnert P. (2003) Detection of type III secretion genes as a general indicator of bacterial virulence. Mol. Cell. Probes., 17, 25-32.
- Tascon R.I., Vasquez-Boland J.A., Gutiérrez-Martin C.B., Rodriguez-Barbosa I. & Rodriguez-Ferri E.F. (1996) Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiologia, 12, 171-184.
- Taylor D. J. (1999) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Diseases of swine. Édité par: B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling and D. J. Taylor. Ames, Iowa State University Press, 343-354.
- Thwaites R. N. & Kadis S. (1991) Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane proteins and enhancement of phagocytosis by antibodies to the proteins. Infect. Immun., 59, 544-549.
- Tonipak W., Thiede S., Oswald W., Baltes N. & Gerlach G.F. (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport: a set of *exbBD* gene is transcriptionally linked to the *tbpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron. Infect. Immun., 68, 1164-1170.
- Trottier Y.L., Wright P.F. & Lariviere S. (1992) Optimization and standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay protocol for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. J. Clin. Microbiol., 30, 46-53.
- Udeze F.A., Latimer K.S. & Kadis S. (1987) Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res., 48, 768-773.
- Urera V. & Pijoan C. (1991) Fibrin in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. Vet. Res., 128, 357-358.

- Ward C.K. & 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. Immun.*, 153, 2110-2121
- Ward C.K. & Inzana T.J. (1997) Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. *Infect. Immun.*, 65, 2491-2496.
- Ward J., Fletcher J., Nair S.P., Wilson M., Williams R.J., Poole S. & Henderson B. (2001) Identification of the exported proteins of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by using alkaline phosphatase fusions. *Infect. Immun.*, 69, 2748-52
- Ward C.K., Lawrence M.L., Veit H.P. & Inzana T.J. (1998) Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.*, 66, 3326-3336.
- Ward J., Fletcher J., Nair S.P., Wilson M., Williams R.J., Poole S. & Henderson B. (2001) Identification of the exported proteins of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by using alkaline phosphatase fusions. *Infect. Immun.*, 69, 2748-2752.
- Welch R.A., Bauer M.E., Kent A.D., Leeds J.A., Moayeri M., Regassa L.B. & Swenson D.L. (1995) Battling against host phagocytes: the wherefore of the RTX family of toxins? *Infect. Agents Dis.*, 4, 254-272.
- Wilke M., Franz B. & Gerlach G.F. (1997) Characterization of a large transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Zentralbl Veterinarmed. B.*, 44, 73-86.
- Williams R.J., Ward J.M., Henderson B., Wilson M. & Nair S.P. (2000) Rapid screening for putative exported proteins from *Staphylococcus aureus* using alkaline phosphatase as a reporter molecule. *Mol. Biotechnol.*, 15, 11-20.
- Willson P.J., Gerlach G.F., Klashinsky S. & Potter A.A. (2001) Cloning and characterization of the gene coding for NADPH-sulfite reductase hemoprotein

from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and use of the protein product as a vaccine. Can. J. Vet. Res., 65, 206-212.

Zhang Y., Tennent J.M., Ingham A., Beddome G., Prideaux C. & Michalski W.P. Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett., 189, 15-18.