

## Les facteurs de virulence d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, l'agent étiologique de la pleuropneumonie porcine.

VANDEN BERGH P.<sup>‡</sup>, FETT T., ZECCHINON L., DESMECHT D.

Département de Morphologie et de Pathologie, Service de Pathologie spéciale, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20, B43, 4000 Liège, Belgique.

<sup>‡</sup> Titulaire d'une bourse du « Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture », rue d'Egmont 5, 1000 Bruxelles, Belgique.

Correspondant : Prof. Daniel Desmecht, Email : daniel.desmecht@ulg.ac.be

**RESUME :** La pleuropneumonie porcine à *Actinobacillus pleuropneumoniae* est une maladie répandue mondialement, fréquente, hautement infectieuse et qui engendre des pertes économiques conséquentes liées aux déficits des gains zootechniques et à l'usage intensif d'antibiotiques. Cette synthèse a pour objectif de passer en revue les éléments de la bactérie nécessaires au développement de la pathogénie. Dans un premier temps, nous décrivons l'activation, la sécrétion, le mécanisme d'action cytotoxique et les spécificités des toxines Apx, reconnues comme les facteurs de virulence majeurs d'*A. pleuropneumoniae*. Par la suite, nous développons les facteurs de virulence secondaires de la bactérie que sont les lipopolysaccharides, la capsule polysaccharidique, les fimbriae, les systèmes de captation du fer et d'autres nutriments, diverses protéases, la mise en place de certaines voies métaboliques, les flagelles et la faculté d'agréger un biofilm.

### 1. INTRODUCTION

L'espèce *A. pleuropneumoniae*, du super-royaume des bactéries, est classée actuellement dans le phylum des protéobactéries, classe des gamma-protéobactéries, ordre des pasteurellales, famille *Pasteurellaceae*, genre *Actinobacillus*. La première souche, mise en évidence par Pattison et collaborateurs (1957), est une bactérie exigeante en bêta-nicotinamide adénine dinucléotide ( $\beta$ -NAD). Elle fut dénommée *Haemophilus parahaemolyticus*, puis *H. pleuropneumoniae* (Pattison *et al.*, 1957). En 1978, une bactérie ressemblant à *Mannheimia haemolytica*, non exigeante en  $\beta$ -NAD, est isolée d'un cas de pleuropneumonie porcine et est appelée *Pasteurella haemolytica-like* ou souche BS (Bertschinger et Seifert, 1978). Des études d'hybridation d'ADN montrèrent que ces bactéries appartenaient à une seule espèce et qu'elles s'apparentaient plus à *Actinobacillus lignieresii* qu'au genre *Haemophilus* et un nouveau taxon fut créé : *Actinobacillus pleuropneumo-*

*niae* (Pohl *et al.*, 1983). Les souches moins communes « *Pasteurella haemolytica-like* » décrites par Bertschinger et Seifert (1978), capables de synthétiser le  $\beta$ -NAD en présence de nucléotides pyrimidiques ou de leurs précurseurs (Niven et Lévesque, 1988), sont considérées aujourd'hui comme le biotype II d'*A. pleuropneumoniae*, le biotype I étant constitué des souches  $\beta$ -NAD dépendantes.

*A. pleuropneumoniae* est une bactérie Gram négative, non sporulante, capsulée, se présentant de manière isolée, en paires ou en courtes chaînes, pléiomorphe bien que la forme prédominante soit la forme coccobacillaire. Dans les premières heures de culture, les formes filamenteuses sont rares mais deviennent de plus en plus nombreuses entre 24 et 96 heures d'incubation (Sebunya et Saunders, 1983). Cette bactérie est aérobie ou micro-aérophile à l'isolement mais apparaît aéro-anaérobie lors des repiquages. Son métabolisme est de type fermentatif (Euzéby, 1998). Elle possède un

chromosome d'environ 2,4 Mpb qui montre une hétérogénéité structurale d'un sérotype à l'autre (Chevallier *et al.*, 1998 ; Oswald *et al.*, 1999).

Sur base de la diversité des antigènes O (AgO) des lipopolysaccharides (LPS) ainsi que des antigènes K (AgK) de la capsule polysaccharidique d'*A. pleuropneumoniae*, 15 sérotypes différents ont été décrits (tableau 1). Les sérotypes 1 et 5 ont par la suite été différenciés en 1a-1b et 5a-5b du fait de légères différences dans leurs structures polysaccharidiques (Perry *et al.*, 1990 ; Jolie *et al.*, 1994). Tous les sérotypes n'ont pas la même répartition géographique et certains sérotypes se retrouvent préférentiellement dans certaines régions du monde. Globalement, les sérotypes 2, 3, 9 et 11 dominent en Europe et les sérotypes 1 et 5 en Amérique du Nord. Le sérotype 1 n'est trouvé qu'exceptionnellement en Europe tandis que le sérotype 9, fort rencontré en Europe, n'a jamais été isolé en Amérique du Nord (Satran et Nedbalcova, 2002). La

Tableau 1 : Caractéristiques antigéniques, phénotype et génotype Apx, virulence des différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

Biotype	Sérotype	Souche de référence	Antigène		Phénotype Apx				Génotype <i>apx</i>								Souris DL <sub>50</sub> (logCFU) *1	Activité hémol *2a	Activité cytotox *2b		
			O	K	-IA	-IIA	-IIIA	-IVA	I				II		III						
									C	A	B	D	C	A	C	A				B	D
1	1a	S4074	O1	K1a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5,9	308.0	320
	1b	ISU 158	O1	K1b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	nd <sup>3</sup>	nd	nd
	2	S1536	O2	K2	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	8,3	0.2	320
	3	S1421	O3	K3	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	8,9	0.1	1280
	4	M62	O4	K4	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	7,9	0.4	162
	5a	K17	O5	K5a	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5,2	371	320
	5b	L20	O5	K5b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	4,8	nd	nd
	6	femφ	O3	K6	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	9	0	0
	7	WF83	O4	K7	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	8	0.5	10
	8	405	O3	K8	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	8,7	0.1	2560
	9	CVI 13261	O1	K9	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5,5	863	320
	10	13039	O6	K10	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	5	305	160
	11	56153	O1	K11	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5,9	171	160
	12	8329	O7	K12	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	8,1	0.5	20
	15	HS143	O3	K15	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	7,6	nd	nd
2	2	-	O2	K2	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	nd	nd	nd
	4	-	O4	K4	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	nd	nd	nd
	7	-	O4	K7	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	nd	nd	nd
	9	-	O1	K9	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	nd	nd	nd
	13	NRCC6230	O4	K13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	14	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Les souches de référence ne sécrétant qu'une seule toxine Apx apparaissent en rouge, celles possédant le même profil génotypique et phénotypique pour les toxines Apx sont regroupées par couleur. Selon (Frey *et al.*, 1993a; Beck *et al.*, 1994; Frey, 1995; Rodriguez Barbosa *et al.*, 1995; Rodriguez Barbosa *et al.*, 1996; Euzéby, 1998). \*1 (Koyama *et al.*, 2007), DL<sub>50</sub> : dose létale 50, CFU : colony forming unit ; \*2 (Kamp *et al.*, 1991) a) Exprimé en unité hémolytique où 1 unité est la valeur d'absorbance d'une part d'érythrocytes de mouton 1% et 3 parts d'eau distillée ; b) Exprimé comme l'inverse de la plus grande dilution montrant au moins 50% de macrophages marqués ; \*3 nd : non déterminé. Biotype 1, Sérotype 1a (Altman *et al.*, 1986a; 1986b; Beynon *et al.*, 1992a; Jolie *et al.*, 1994; Michael *et al.*, 2004), 1b (Jolie *et al.*, 1994), 2 (Altman *et al.*, 1987a; Altman *et al.*, 1987b; Michael *et al.*, 2004), 3 (Altman *et al.*, 1987c; 1988a), 4 (Altman *et al.*, 1989a), 5a (Nielsen, 1986; Altman *et al.*, 1987d; Altman *et al.*, 1990a; Michael *et al.*, 2004), 5b (Nielsen, 1986; Nicolet, 1988; Nielsen, 1988a; 1988b; Altman *et al.*, 1990a; Altman *et al.*, 1992; Michael *et al.*, 2004), 6 (Altman *et al.*, 1988b; 1989b), 7 (Beynon *et al.*, 1991a; Beynon *et al.*, 1991b), 8 (Altman *et al.*, 1988a; Altman *et al.*, 1990b), 9 (Beynon *et al.*, 1992a; Beynon *et al.*, 1992b), 10 (Perry, 1990; Beynon *et al.*, 1991d), 11 (Altman *et al.*, 1986b; Beynon *et al.*, 1992a; Beynon *et al.*, 1993), 12 (Beynon *et al.*, 1991c; Beynon *et al.*, 1991e), 13 (Nielsen *et al.*, 1997; MacLean *et al.*, 2004), 14 (Nielsen *et al.*, 1997; Perry et MacLean, 2004), 15 (Blackall *et al.*, 2002; Perry *et al.*, 2005; Koyama *et al.*, 2007), Biotype 2 (Frey, 1995), Sérotype 2 (Dom *et al.*, 1994a; Bouh et Mittal, 1999).

virulence varie d'un sérotype à l'autre (tableaux 1 et 2). Il existe aussi des spécificités au sein d'un même sérotype (Stenbaek et Hovind-Haugen, 1996 ; Jacques *et al.*, 2005 ; Ramjeet *et al.*, 2005).

L'objectif de cette synthèse est de passer en revue les éléments de la bactérie nécessaires au développement de la pathogénie. Dans un premier temps, nous décrivons l'activation, la sécrétion, le mécanisme d'action cytotoxique et les spécificités des toxines Apx, reconnues comme les facteurs de virulence majeurs d'*A. pleuropneumoniae*. Par la suite, nous développons les facteurs de virulence secondaires de la bactérie que sont les lipopolysaccharides, la capsule polysaccharidique, les fimbriae, les systèmes de captation du fer et d'autres nutriments, diverses

protéases, la mise en place de certaines voies métaboliques, les flagelles et la faculté d'agréger un biofilm.

## 2. LES FACTEURS DE VIRULENCE

### 2.1. Les exotoxines Apx

Les toxines ApxIA, -IIA, -IIIA et -IVA font partie de la famille des toxines dites RTX (*Repeats in ToXin*) qui sont toutes sécrétées et Ca<sup>2+</sup>-dépendantes. Elles partagent une même caractéristique structurale qui est la répétition d'un nonapeptide riche en glycine et en aspartate (L/I/V/F-X-G-G-X-G-N/D-D-X) (tableaux 3 et 4). Ce type de répétition a été retrouvé dans d'autres protéines comme des protéases de *Pseudomonas* (Baumann *et al.*, 1993),

*Serratia* (Nakahama *et al.*, 1986) et *Erwinia* (Delepelaire et Wandersman, 1990), ou encore la protéine NodO de *Rhizobium* (Economou *et al.*, 1990). Ces répétitions constituent de courts brins β organisés en forme de super-hélice β, qui lient les ions Ca<sup>2+</sup> en suivant la stœchiométrie d'un ion par répétition (figure 1) (Baumann *et al.*, 1993).

Ces exotoxines sont reconnues comme les facteurs de virulence majeurs de la bactérie car l'instillation de toxines ApxIA ou ApxIIIA recombinantes purifiées à des porcs conduit à l'apparition des signes cliniques et des lésions typiques de la maladie (Kamp *et al.*, 1997). La toxine ApxIIA recombinante, quant à elle, ne produit pas ou peu de signes cliniques et uniquement des lésions pulmonaires discrètes

**Tableau 2 : Sensibilité de différents types cellulaires en fonction du sérotype d'*Actinobacillus pleuropneumoniae***

Types cellulaires		Sérotypes toxiques	Sérotypes peu ou pas toxiques	Références
Po	Macrophages alvéolaires	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	nd	Bendixen <i>et al.</i> , 1981 ; Kume <i>et al.</i> , 1986 ; Pijoan, 1986 ; Van Leengoed <i>et al.</i> , 1989 ; Kamp <i>et al.</i> , 1991 ; Rycroft <i>et al.</i> , 1991 ; Crujisen <i>et al.</i> , 1992 ; Dom <i>et al.</i> , 1992a ; Udeze et Kadis, 1992 ; Cullen et Rycroft, 1994 ; Dom <i>et al.</i> , 1994 ; Kamp <i>et al.</i> , 1997
	Macrophages péritonéaux	2	nd	Kume <i>et al.</i> , 1986
	Monocytes	2	nd	Kume <i>et al.</i> , 1986
	Lymphocytes	1, 7	nd	Stine <i>et al.</i> , 1991
	Neutrophiles	1, 2, 8	9	Rosendal <i>et al.</i> , 1988 ; Crujisen <i>et al.</i> , 1992 ; Dom <i>et al.</i> , 1992b ; Udeze et Kadis, 1992 ; Dom <i>et al.</i> , 1994 ; Jansen <i>et al.</i> , 1995 ; Seah et Kwang, 2004
	Endothéliocytes	1	nd	Serebrin <i>et al.</i> , 1991
	Pneumocytes type II	1, 10	nd	van de Kerkhof <i>et al.</i> , 1996
	Cellules testiculaires	1	nd	Bendixen <i>et al.</i> , 1981
Erythrocytes	1, 2	6, 8	Nakai <i>et al.</i> , 1983 ; Rosendal <i>et al.</i> , 1988	
Bo	Neutrophiles	1	nd	Rosendal <i>et al.</i> , 1988
	Endothéliocytes	1	nd	Serebrin <i>et al.</i> , 1991
	Erythrocytes	1	6, 8	Rosendal <i>et al.</i> , 1988
Mu	Lymphocytes	1, 7	nd	Stine <i>et al.</i> , 1991
	Pneumocytes type I et II	1	nd	Idris <i>et al.</i> , 1993
	Endothéliocytes	1	nd	Idris <i>et al.</i> , 1993
Ov érythrocytes	1, 5, 9, 10, 11	2, 3, 4, 6, 7, 8, 12	Nakai <i>et al.</i> , 1983 ; Rosendal <i>et al.</i> , 1988 ; Frey et Nicolet, 1990 ; Kamp <i>et al.</i> , 1991	
Cv érythrocytes	1, 2	6, 8	Nakai <i>et al.</i> , 1983 ; Rosendal <i>et al.</i> , 1988	
Lap érythrocytes	1, 2	6, 8	Nakai <i>et al.</i> , 1983 ; Rosendal <i>et al.</i> , 1988	
Can érythrocytes	1	6, 8	Rosendal <i>et al.</i> , 1988	
Cob érythrocytes	1, 2	6, 8	Nakai <i>et al.</i> , 1983 ; Rosendal <i>et al.</i> , 1988	
Vol érythrocytes	1	2, 6, 8	Nakai <i>et al.</i> , 1983 ; Rosendal <i>et al.</i> , 1988	
Hu érythrocytes	1	6, 8	Rosendal <i>et al.</i> , 1988	

Bo : bovin, Can : canin, Cob : cobaye, Cv : cheval, Hu : humain, Lap : lapin, nd : non déterminé, Ov : ovin, Mu : murin, Po : porc, Vol : volaille.

tes (Kamp *et al.*, 1997). Cependant, il a été montré que des souches du sérotype 7 qui ne produisent qu'ApxIIA sont également capables de causer une maladie sévère avec des lésions pulmonaires typiques (Frey *et al.*, 1993a ; Kamp *et al.*, 1997) et que des mutants des sérotypes 1 et 5, dépourvus de toxine ApxIA mais produisant encore ApxIIA, sont encore capables de produire une maladie clinique sévère et des lésions pulmonaires (Tascon *et al.*, 1994 ; Reimer *et al.*, 1995 ; Boekema *et al.*, 2004b). L'importance de la virulence de la toxine ApxIIA dans la pathogenèse est donc controversée. Celle de la toxine ApxIVA n'est pas encore élucidée.

Les différents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* ne synthétisent qu'une ou deux des trois premières toxines Apx (tableau 1). Les souches qui sécrètent deux des trois premières toxines ne produisent que les couples ApxIA/ApxIIA ou ApxIIA/ApxIII. L'association de la production de ApxIA et ApxIII n'a jamais été rencontrée (Kamp *et al.*, 1994). Tous

les sérotypes synthétisent la toxine ApxIVA dont l'activité protéasique la rend différente des autres toxines Apx qui sont du type PFT (*Pore-Forming Toxin*) (Schaller *et al.*, 1999 ; Cho et Chae, 2001).

#### 2.1.1. L'activation et la sécrétion des toxines Apx PFT

Les mécanismes d'activation et de sécrétion des toxines Apx sont moins décrits que pour d'autres toxines RTX telles que l'hémolysine HlyA d'*E. coli*. De nombreuses étapes de ces processus ont donc été extrapolées par analogie de ce qui a été observé pour d'autres toxines de la même famille.

L'ensemble des gènes nécessaires à la maturation et à la sécrétion des toxines RTX s'organisent sous la forme d'un opéron *CABD*. En effet, les gènes qui codent pour la sécrétion des toxines ApxIA, -IIA et -IIIA se retrouvent respectivement au sein de l'opéron *apxICABD* (Frey *et al.*, 1991a ; Frey *et al.*, 1994), *apxIIICA* (Chang *et al.*, 1989 ; Inzana *et al.*, 1991 ; Smits *et*

*al.*, 1991 ; Gygi *et al.*, 1992 ; Jansen *et al.*, 1992 ; Frey *et al.*, 1993a ; Frey *et al.*, 1993b ; Jansen *et al.*, 1993a) et *apxIIICABD* (Chang *et al.*, 1993 ; Jansen *et al.*, 1994).

Le gène *A* code pour la protoxine, incapable de s'attaquer aux membranes cellulaires jusqu'à son activation dans le cytoplasme de la bactérie par le produit du gène *C*, coexprimé, et qui code pour une acyltransférase (Benz *et al.*, 1989 ; Hardie *et al.*, 1991). L'activateur RTX-C (~20 kDa) agit sous forme homodimérique en association avec une protéine ACP (*Acyl Carrier Protein*) (10 kDa) (Issartel *et al.*, 1991) pour acyler la protoxine proRTX-A (Hardie *et al.*, 1991). Il a été démontré pour HlyA que cette maturation est réalisée par la liaison de chaînes saturées à 14 (68 %), 15 (26 %) et 17 (6 %) carbones sur le groupe aminé ε de deux résidus lysyls internes spécifiques (K564 et K690) (Stanley *et al.*, 1994 ; Trent *et al.*, 1998 ; Lim *et al.*, 2000), retrouvés également au sein des toxines Apx (tableau 3). Cette acylation pourrait être en partie responsable

**Tableau 3 : Caractéristiques structurales et fonctionnelles des toxines ApxIA, -IIA, -IIIA et -IVA d'*Actinobacillus pleuropneumoniae***

Toxine	MM (kDa)	Nbre aa	pI	Dom TM	Répét	Lys acylées	Toxicité cellulaire	Type de toxicité	I - S	Références	
ApxIA	105	1022	5,34	226-256 297-326 367-406	13	K560 K686	fortement hémolytique, cytotoxique	hémolysine	HlyA I : 56 % S : 72 %	Frey <i>et al.</i> , 1991a ; Kamp <i>et al.</i> , 1991 ; Jansen <i>et al.</i> , 1993a ; Stanley <i>et al.</i> , 1998	
ApxIIA	103	956	5,45	233-256 266-323 361-406	8	K557 N687	faiblement hémolytique, modérément cytotoxique	hémolysine	LktA I : 64 % S : 80 %	Kamp <i>et al.</i> , 1991 ; Frey <i>et al.</i> , 1993a ; Tu <i>et al.</i> , 1994 ; Stanley <i>et al.</i> , 1998	
ApxIIIA	120	1049	5,76	154-170 315-331 397-413	13	K571 K702	pas hémolytique, fortement cytotoxique	leucotoxine	HlyA I : 51 % S : 68 %	Highlander <i>et al.</i> , 1989 ; Kamp <i>et al.</i> , 1991 ; Ludwig <i>et al.</i> , 1991 ; Chang <i>et al.</i> , 1993 ; Jansen <i>et al.</i> , 1993b ; Stanley <i>et al.</i> , 1998	
ApxIVA	Var1	202	1805	4,81	109-608	24	K667 K859	faiblement hémolytique	protéase	FrpC	Schaller <i>et al.</i> , 1999
	Var3	170	1522	4,93	101-600	14	K643 K854				

Dom TM : domaines transmembranaires hydrophobes, I-S : identité et similarité la plus grande, Lys : lysine, pI : point isoélectrique calculé, MM : masse moléculaire, Répét : nombre de répétitions du nonapeptide riche en glycine et en aspartate.

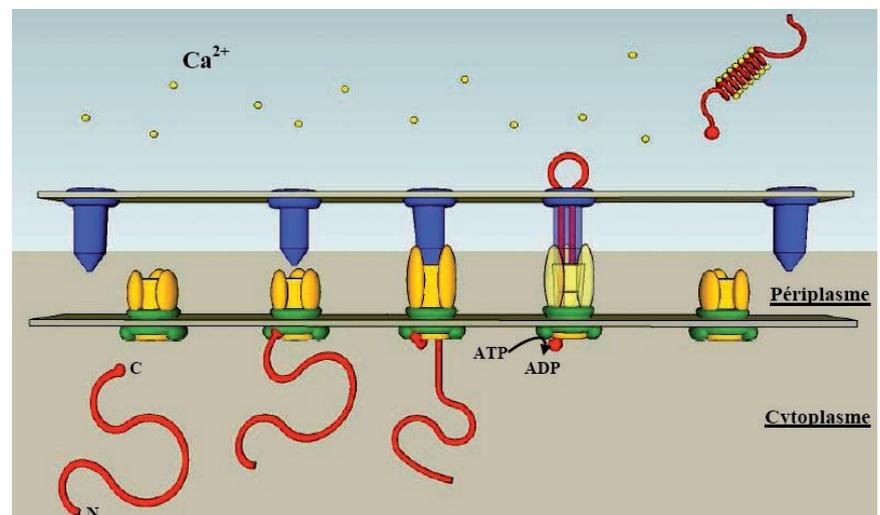
de la spécificité de l'action cytopathogène puisque l'activation d'une toxine hybride LktA/ApxIIA ne donne pas le même type de cytotoxicité selon qu'elle est activée par ApxC (hémolytique et leucolytique) ou LktC (leucolytique) (McWhinney *et al.*, 1992).

Les gènes *B* et *D* codent pour des protéines de la membrane cytoplasmique qui, en association avec la protéine TolC, forment un système de sécrétion de type I permettant la sécrétion de la toxine mature (figure 1) (Wandersman et Delepelaire, 1990 ; Wang *et al.*, 1991 ; Schulein *et al.*, 1992). La protéine RTX-B est un transporteur ABC qui lie la toxine RTX-A par son extrémité C-terminale (Benabdelhak *et al.*, 2003) et qui, lorsqu'elle hydrolyse de l'ATP, subit une modification conformationnelle qui permet le transport transmembranaire de la toxine (figure 1) (Koronakis *et al.*, 1993 ; Koronakis *et al.*, 1995 ; Zaitseva *et al.*, 2005). La protéine de fusion membranaire, RTX-D, possède un large domaine périplasmique (figure 1) (Schulein *et al.*, 1992 ; Pimenta *et al.*, 1999) et relie le cytoplasme de la bactérie au milieu extracellulaire en connectant RTX-B (membrane interne) et TolC (membrane externe) (Thanabalu *et al.*, 1998 ; Balakrishnan *et al.*, 2001). Elle pourrait intervenir dans le repliement et l'activation de la toxine puisque des substitutions au sein de HlyD mènent à la sécrétion d'une toxine déficiente chez *E. coli* (Pimenta *et al.*, 2005). TolC forme une structure *porin-like*

trimérique composée d'un domaine situé dans la membrane externe et d'un entonnoir de 100 Å constitué de 12 hélices  $\alpha$  antiparallèles qui se prolongent dans le périplasm (figure 1) (Koronakis *et al.*, 1991 ; Koronakis *et al.*, 1997 ; Koronakis *et al.*, 2000). Ce domaine possède un orifice de 35 Å du côté de la membrane externe et se rétrécit au niveau de l'ouverture péri-

plasmique. Il a été montré que cette dernière pouvait s'élargir jusqu'à un diamètre de 30 Å (Andersen *et al.*, 2002). Lorsque la toxine est captée via son signal de sécrétion C-terminal par RTX-B, une région non identifiée de la toxine semble également interagir avec un domaine de la portion cytoplasmique de HlyD produisant une modification structurale propagée à son

**Figure 1 :** Sécrétion des toxines RTX au travers de la paroi bactérienne via le système de sécrétion de type I. Lorsque l'extrémité C-terminale de la toxine (rouge) interagit avec le complexe RTX-BD, une modification conformationnelle de RTX-D (jaune) constitue un signal qui permet le recrutement de TolC trimérique (bleu). L'hydrolyse de l'ATP par RTX-B (vert) fournit l'énergie nécessaire à la sécrétion de la toxine au travers du canal transmembranaire. Une fois sécrétée, la liaison du  $Ca^{2+}$  extracellulaire aux répétitions du nonapeptide RTX induit le repliement de la toxine en hélice- $\beta$  dans sa conformation active (Zaitseva *et al.*, 2005 ; Balsalobre *et al.*, 2006).



domaine périplasmique et qui permet le recrutement du trimère TolC dans le translocon (figure 1) (Balakrishnan *et al.*, 2001). La sécrétion d'une toxine RTX active nécessite donc les produits d'au moins six gènes différents.

Tous les sérotypes possèdent les gènes *apxIBD* (sauf le sérotype 3) et *apxIIICA* (sauf le sérotype 10) (tableau 1), la délétion des gènes *apxICA* dans certains sérotypes n'empêchant pas la transcription des gènes *apxIBD*. Le translocon d'ApXIA ainsi produit pourrait servir à la sécrétion de la toxine ApXIIA dans les sérotypes montrant ce génotype puisque l'opéron *apxIIICA* ne possède pas de gènes *apxIIBD* (tableau 1). Les gènes de sécrétion ont probablement été délétés et seuls de courts segments de gènes « *apxB-like* » se retrouvent en aval d'*apxIIA* (Chang *et al.*, 1989 ; Inzana *et al.*, 1991 ; Smits *et al.*, 1991 ; Gygi *et al.*, 1992 ; Jansen *et al.*, 1992 ; Frey *et al.*, 1993a ; Frey *et al.*, 1993b ; Jansen *et al.*, 1993a). Ainsi, il a été montré qu'un mutant non-hémolytique du sérotype 5 obtenu par mutagenèse chimique, ayant perdu l'ensemble de l'opéron *apxICABD* mais possédant toujours l'opéron *apxIIICA*, ne sécrétant ni ApXIA, ni ApXIIA et qui est non pathogène chez le porc et la souris, retrouve une activité hémolytique modérée lorsqu'il est complétement par un plasmide portant les gènes *apxIBD* (Reimer *et al.*, 1995). Cette souche recombinante induit de la pleuropneumonie chez des porcs mais à une dose plus élevée et avec moins de mortalité que la souche sauvage (Reimer *et al.*, 1995), ce qui semble logique puisqu'elle ne sécrète pas la toxine ApXIA contrairement à la souche parentale. Par ailleurs, le sérotype 3 qui ne possède pas l'opéron *apxICABD*, parvient tout de même à sécréter la toxine ApXIIA (tableau 1). Il existerait donc un autre système de sécrétion qui pourrait être celui codé par l'opéron *apxIIIICABD* (tableau 1) (Beck *et al.*, 1994). Il est intéressant de souligner que les sérotypes 2, 4, 6 et 8 sont doublement armés pour la sécrétion de leurs toxines puisqu'ils possèdent les deux systèmes ApXIBD et ApXIIIBD (tableau 1).

Une fois dans le milieu extracellulaire, la toxine RTX semble pouvoir se retrouver sous différentes formes selon l'environnement physico-chimique : agrégée ou monomérique en solution, adsorbée (réversible et non toxique) ou insérée (irréversible et toxique) dans la membrane cellulaire (Bakas *et*

*al.*, 1996 ; Ostolaza *et al.*, 1997 ; Goni et Ostolaza, 1998). Par exemple, HlyA est capable de se lier aux bicouches lipidiques avec la même affinité en présence ou en absence de Ca<sup>2+</sup>, ce qui explique sa faculté d'adsorption sur les membranes (Ostolaza *et al.*, 1997). Toutefois, son insertion membranaire irréversible menant à lyse cellulaire dépend de la liaison du Ca<sup>2+</sup> par la toxine (Ludwig *et al.*, 1988 ; Boehm *et al.*, 1990a ; 1990b). Cette chélation du Ca<sup>2+</sup> constitue donc une sorte de seconde activation, extracellulaire (Ostolaza *et al.*, 1995 ; Moayeri et Welch, 1997 ; Bakas *et al.*, 1998). Elle se produit au niveau du domaine de répétitions RTX, induirait un changement de la structure tertiaire de la molécule et causerait l'exposition de portions hydrophobes de la protéine favorisant la liaison aux membranes (Bakas *et al.*, 1998).

Enfin, *A. pleuropneumoniae* est également capable de relarguer ses toxines à l'intérieur de vésicules de 20 à 200 nm détachées de la membrane externe (Luque *et al.*, 2000 ; Balsalobre *et al.*, 2006) (figure 2).

### 2.1.2. Le mécanisme d'action cytotoxique des toxines ApX PFT

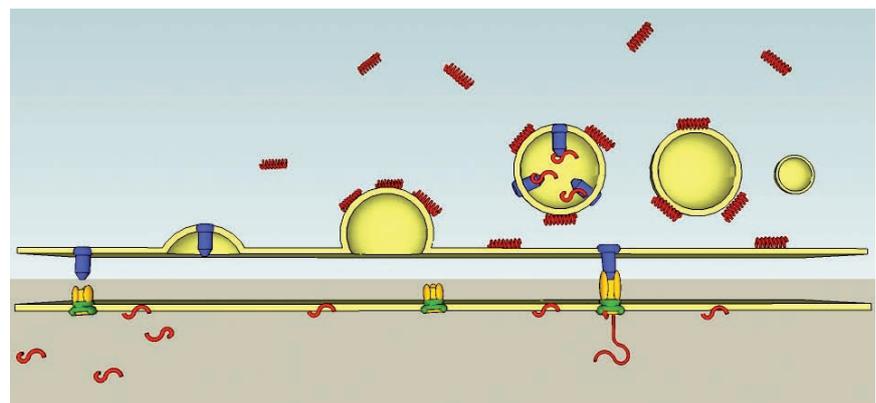
Jusqu'à présent, de nombreuses questions restent sans réponses quant au mécanisme d'action cytotoxique des toxines ApX PFT : la nécessité de lier ou non un récepteur, l'attaque membranaire par la formation d'un pore et/ou la perturbation de la monocouche lipidique externe de la membrane cellulaire, l'oligomérisation membranaire ou non, la demi-vie et la taille

de la lésion membranaire, l'activation de cascades intracellulaires, etc. Cependant, les connaissances acquises pour d'autres toxines RTX permettent, par analogie, de dégager des pistes et d'émettre certaines hypothèses sur le mode d'action lytique.

Il a été démontré pour plusieurs toxines RTX que leur action cytotoxique dépendait de leur liaison à un récepteur de surface spécifique : la glycophorine des érythrocytes et le LFA (*Lymphocyte Function associated Antigen*)-1 des leucocytes pour la toxine HlyA d'*E. coli* (Lally *et al.*, 1997 ; Cortajarena *et al.*, 2001 ; 2003), la sous-unité CD18 du LFA-1 et du Mac-1 des leucocytes des ruminants pour la LktA de *Mannheimia haemolytica* (Dileepan *et al.*, 2005a ; Dileepan *et al.*, 2005b ; Dileepan *et al.*, 2007a ; Lawrence *et al.*, 2008), la sous-unité CD18 du LFA-1 des leucocytes humains pour la LtxA d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Dileepan *et al.*, 2007b), et le CD11b du Mac-1 des leucocytes humains pour la CyaA de *Bordetella pertussis* (Masin *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, aucun récepteur cible n'a encore été identifié pour les toxines ApX d'*A. pleuropneumoniae* mais, étant donné son degré d'identité avec les autres toxines RTX (tableau 3), il est possible qu'elles interagissent de la même manière, par exemple, avec le récepteur LFA-1 porcin.

Plusieurs hypothèses mécanistiques ont été formulées pour expliquer comment les toxines RTX PFT perturbent la membrane et l'homéostasie cellulaire. L'hypothèse la plus courante est la formation de pores transmembra-

**Figure 2** : Libération des toxines RTX au sein de vésicules détachées de la membrane externe de la bactérie. En plus de la sécrétion transmembranaire, la bactérie est capable de larguer, à partir de la membrane externe dans le milieu extracellulaire, des vésicules lipidiques de 20 à 200 nm de diamètre contenant des toxines RTX et des protéases (Zaitseva *et al.*, 2005 ; Balsalobre *et al.*, 2006).



naires, hydrophiles et perméables aux cations (entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  et sortie de  $\text{K}^+$ ), après insertion dans les bicouches lipidiques des trois domaines hydrophobes de l'extrémité N-terminale des toxines (tableau 3), oligomérisées ou non, suite à la liaison ou non à un récepteur membranaire (Bhakdi *et al.*, 1986 ; Menestrina *et al.*, 1987 ; Menestrina, 1988 ; Benz *et al.*, 1989 ; Oropeza-Wekerle *et al.*, 1992 ; Ludwig *et al.*, 1993 ; Ostolaza *et al.*, 1993 ; Menestrina *et al.*, 1994 ; Menestrina *et al.*, 1995a ; Menestrina *et al.*, 1995b). Le diamètre du pore créé par les toxines Apx a été estimé à environ 2 nm, ce qui est suffisamment petit pour que de grandes molécules telles que les protéines ne puissent s'échapper des cellules (Maier *et al.*, 1996). Comme la pression osmotique intracellulaire est plus élevée que celle du fluide extracellulaire, il y aurait un flux entrant passif causant un gonflement irréversible des cellules et, *in fine*, leur nécrose (Tarigan *et al.*, 1994).

Cependant, pour HlyA, d'autres données ont suggéré qu'en conditions lytiques, cette toxine ne formait pas un canal transmembranaire dans la cellule cible mais qu'elle s'insérait plutôt via dix hélices amphipathiques dans la monocouche phospholipidique externe de la membrane cellulaire, à la manière d'une protéine intrinsèque ou intégrale (Soloaga *et al.*, 1999 ; Verza et Bakas, 2000). L'insertion des toxines dans la couche externe de la membrane cellulaire induirait alors une augmentation de la pression latérale exercée entre lipides qui, au-delà d'un certain seuil, mènerait à une rupture membranaire transitoire (peut-être réparée par un transfert net de lipides vers la monocouche lipidique interne), à l'influx d'eau et à une libération d'éléments cellulaires (Soloaga *et al.*, 1999). L'accumulation des toxines dans la couche lipidique externe serait ainsi responsable d'une fragilisation de la membrane, rendue plus sensible aux contraintes mécaniques exercées dans les poumons (Welch, 2001). Par ailleurs, la liaison de la toxine à son récepteur pourrait activer ce dernier et enclencher une cascade de signaux intracellulaires débouchant, dans les macrophages et les leucocytes polymorphonucléaires (PMNs), sur une flambée oxydative (*oxidative burst*) avec production de radicaux libres et libération de médiateurs de l'inflammation (Jeyaseelan *et al.*, 2001 ; Zecchinon *et al.*, 2005).

Enfin, l'action cytotoxique ne s'exprime pas de la même façon selon la dose de toxine. Une dose sublytique augmenterait légèrement la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$ , stimulerait le métabolisme oxydatif et enclencherait des mécanismes d'apoptose, tandis qu'une forte concentration provoquerait un afflux intracellulaire massif de  $\text{Ca}^{2+}$  et d'eau entraînant la lyse cellulaire (Dom *et al.*, 1992a ; 1992b ; Tarigan *et al.*, 1994).

### 2.1.3. La toxine ApxIA

La transcription de l'opéron *apxI-CABD*, amplifiée par la protéine Fur et le  $\text{Ca}^{2+}$  (Hsu *et al.*, 2003), produit un transcrit majoritaire *apxICA* de 3,5 kb inductible par le  $\text{Ca}^{2+}$  et un minoritaire *apxICABD* de 7,5 kb dont l'expression est indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (Gygi *et al.*, 1992 ; Frey *et al.*, 1994). Il existe deux variants du gène *apxIA*, l'un rencontré dans les sérotypes 1, 9 et 11 et l'autre dans les sérotypes 5 et 10, qui diffèrent en trois régions et surtout dans la partie C-terminale (Jansen *et al.*, 1993a ; Nagai *et al.*, 1993). Bien que la somme des polymorphismes pourrait en modifier la structure secondaire, aucune des substitutions n'influence fondamentalement le caractère faiblement hydrophobe et la queue hydroxylée de cette région (Jansen *et al.*, 1993a). Par ailleurs, cette partie intervient dans l'interaction avec ApxIBD pour la sécrétion et il est donc possible que le type d'interaction ApxIA/ApxIBD diffère entre ces deux variants. Ces modifications pourraient aussi avoir une répercussion sur l'activité biologique et l'immunogénicité de la toxine ApxIA. Une fois sécrétée, elle fixe le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (Frey *et al.*, 1991a) et cette liaison est nécessaire pour permettre son interaction avec les membranes cellulaires (van Leengoed et Dickerson, 1992). ApxIA présente le plus d'identité avec la toxine HlyA d'*E. coli* (tableau 3) et possède comme cette dernière une activité cytotoxique du type « hémolysine », c'est-à-dire non spécifique du type cellulaire et de l'espèce hôte. Elle a été impliquée dans la destruction des types cellulaires suivants : macrophages alvéolaires et péritonéaux, monocytes, PMNs, lymphocytes, cellules testiculaires, endothéliocytes, pneumocytes et érythrocytes porcins ; PMNs, endothéliocytes et érythrocytes bovins ; lymphocytes, pneumocytes et endothéliocytes murins ; érythrocytes ovins, équins, canins, humains, de lapin, de volaille

et de cobaye (tableau 2).

### 2.1.4. La toxine ApxIIA

Le gène *apxIIA* ne montre pas de variation allélique significative. Contrairement à l'opéron *apxICABD*, son niveau d'expression reste le même pour des concentrations différentes de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture (Gygi *et al.*, 1992 ; Frey *et al.*, 1994). Il a aussi été démontré que le fer réprimait la production de toxines ApxIIA à des concentrations de 100 et 500  $\mu\text{M}$  (Maudsley et Kadis, 1986). Une fois sécrétée, ApxIIA fixe également le  $\text{Ca}^{2+}$  et il a été démontré que cette liaison est nécessaire pour l'interaction avec les membranes des érythrocytes et des PMNs (Frey et Nicolet, 1990 ; Frey *et al.*, 1991b ; van Leengoed et Dickerson, 1992). La toxine ApxIIA présente la plus grande identité avec la toxine RTX LktA de *Mannheimia haemolytica* et ne montre qu'une faible activité hémolytique et cytotoxique (tableau 3). Elle a été impliquée dans la cytotoxicité contre les macrophages, lymphocytes, pneumocytes de type II porcins (Stine *et al.*, 1991 ; van de Kerkhof *et al.*, 1996 ; Kamp *et al.*, 1997) et les lymphocytes murins (Stine *et al.*, 1991).

### 2.1.5. La toxine ApxIIIA

Contrairement à l'opéron *apxICABD* mais à l'instar de l'opéron *apxIICA*, le niveau d'expression de l'opéron *apxIIICABD* reste le même pour des concentrations différentes de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture (van Leengoed et Dickerson, 1992). ApxIIIA ne se lie pas aux érythrocytes mais aux leucocytes, uniquement en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (van Leengoed et Dickerson, 1992). Elle ne présente donc pas d'activité hémolytique mais possède une activité cytotoxique spécifique des leucocytes porcins (tableau 3) (Cullen et Rycroft, 1994 ; van de Kerkhof *et al.*, 1996 ; Kamp *et al.*, 1997). Les déterminants pro-apoptotiques de la toxine ApxIIIA semblent localisés à ses extrémités N- (aa 1 à 160) et C-terminales (aa 825-1000), tandis que les déterminants cytotoxiques, en plus des extrémités N- et C-terminales, se situeraient aussi dans le domaine d'activation (aa 420-680) (Seah et Kwang, 2004).

### 2.1.6. La toxine ApxIVA

L'expression du gène *apxIVA* n'a pas été observée *in vitro* (Schaller *et al.*, 1999). Il existe deux variants de ce

**Tableau 4 : Répétitions du nonapeptide RTX, (L/I/V/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D-X, des toxines ApxIA, -IIA, -IIIA et -IVA d'*Actinobacillus pleuropneumoniae***

Répét	ApxIA (Frey <i>et al.</i> , 1991a)	ApxIIA (Frey <i>et al.</i> , 1991a)	ApxIIIA (Jansen <i>et al.</i> , 1993b)	ApxIVA <sub>var1</sub> (Schaller <i>et al.</i> , 1999)	ApxIVA <sub>var3</sub> (Schaller <i>et al.</i> , 1999)
1	719-IIGSNRDK-727	717-IIGSQFNDI-725	734-IIGSNQRDE-742	1105-LSGSAGDDL-1113	1097-LSGSAGDDL-1105
2	728-FFGSRFTDI-736	726-FKGSQFDDV-734	743-FKGSKFRDI-751	1114-LIGGEGNDT-1122	1106-LIGGEGNDT-1114
3	737-FHGAKGDDE-745	735-FHGGNGVDT-743	752-FHGADGDDL-760	1123-LKGSYGADT-1131	1115-LKGSYGADT-1123
4	746-IYGNDGNDI-754	744-IDGNDGDDH-752	761-LNGNDGDDI-769	1134-FSKGHGQDI-1142	1126-FSKGHGQDV-1134
5	755-LYGGDGNV-763	753-LFGGAGDDV-761	770-LYGDKGND-778	1224-LYGTGND-1232	1216-LYGTGND-1224
6	764-IHGGDGNH-772	762-IDGGNGNF-770	779-LRGDNGNDQ-787	1243-LEGGKNDI-1251	1235-VEGGKNDI-1243
7	773-LVGGNGNDR-781	771-LVGGTGNDI-779	788-LYGGEGNDK-796	1252-LRGGYGADT-1260	1244-LRGGYGADT-1252
8	782-LIGGKGNF-790	780-ISGGKNDI-788	797-LLGGNGNY-805	1263-FSKGHGQDI-1271	1255-FSKGHGQDI-1263
9	791-LNGGDGDE-799		806-LSGGDGN-814	1353-LFGTDGDDN-1361	1345-LFGTDGDDN-1353
10	810-LLGGAGNDI-818		825-LRGGKGD-833	1371-IDAGAGNDT-1379	1363-IDAGAGNDT-1371
11	819-LYGSNGT-827		834-LYSSGSD-842	1380-VNGGNGDDT-1388	1372-VNGGNGDDT-1380
12	828-FDGGVGNK-836		843-LDGGEGNDY-851	1389-LIGGKNDI-1397	1381-LIGGKNDI-1389
13	837-IYGLGKDI-845		852-LEGGDGSDF-860	1398-LRGGYGADT-1406	1390-LRGGYGADT-1398
14				1409-FSKGHGQDI-1417	1401-FSKGHGQDI-1409
15				1499-LYGTGND-1507	
16				1518-LEGGKNDI-1526	
17				1527-LRGGYGADT-1535	
18				1538-FSKGHGQDI-1546	
19				1628-LFGTDGDDN-1636	
20				1646-IDAGAGNDT-1654	
21				1655-VNGGNGDDT-1663	
22				1664-LIGGKNDI-1672	
23				1673-LRGGYGADT-1681	
24				1684-FSKGHGQDI-1692	

Dom TM : domaines transmembranaires hydrophobes, I-S : identité et similarité la plus grande, Lys : lysine, pI : point isoélectrique calculé, MM : masse moléculaire, Répét : nombre de répétitions du nonapeptide riche en glycine et en aspartate.

gène (Dreyfus *et al.*, 2004). Les sérotypes 1 (S4074) et 3 (HV114) possèdent respectivement le gène *apxIVA<sub>var1</sub>* et *apxIVA<sub>var3</sub>* (Schaller *et al.*, 1999). Les trois premiers quarts de ces deux variants diffèrent par 11 résidus. Le premier gène code pour la toxine ApxIVA<sub>var1</sub> qui possède les éléments typiques des protéines RTX (tableaux 3 et 4). L'arrangement de l'extrémité C-terminale est cependant inhabituel car les répétitions typiques des nonapeptides sont entremêlées avec quatre régions présentant une homologie avec les séquences consensus des ADN polymérase de la famille 2 et qui pourraient être impliquées dans la liaison de Mg<sup>2+</sup> (Argos, 1988). La toxine APX-IVA<sub>var3</sub> contient seulement 14 nonapeptides riches en glycine et deux séquences du type « ADN polymérase de la famille 2 » (tableaux 3 et 4) (Schaller *et al.*, 1999). L'organisation de cette région est identique à celle de ApxIVA<sub>var1</sub> sauf pour les résidus 1146-1428 qui sont délétés et remplacés par une courte séquence peptidique (YSDSANSKK). Dans ces deux souches, le gène *apxIVA* est précédé par, et peut-être co-transcrit avec, *ORF1*. Le produit de ce gène, qui ne ressemble à aucune protéine connue,

semble être impliqué dans l'activation de ApxIVA et est requis pour les phénotypes hémolytique et co-hémolytique (CAMP) observés (Schaller *et al.*, 1999). La toxine ApxIVA montre une similarité élevée avec les exoprotéines RTX FrpA et FrpC de *Neisseria meningitidis* et se distingue donc des trois premières toxines Apx (tableaux 3 et 4) (Thompson *et al.*, 1993). Il a été démontré récemment que des concentrations physiologiques en Ca<sup>2+</sup> pouvaient induire un nouveau type de clivage autocatalytique au niveau de la liaison peptidique entre l'Asp414 et la Pro415 de FrpC et que le nouveau fragment N-terminal généré pouvait être fixé de façon covalente par un nouveau type de liaison entre le groupe carboxyl de son Asp C-terminale et le groupe aminé ε d'une Lys interne d'une autre molécule FrpC (Osicka *et al.*, 2004). De telles activités autocatalytiques et de « cross-linking » furent observées pour la toxine ApxIVA d'*A. pleuropneumoniae*, mais leur importance biologique n'est pas encore connue (Osicka *et al.*, 2004). Le segment nécessaire et suffisant à cette activité autocatalytique se situerait entre les résidus 400 à 657 de FrpC et une séquence homologue se

retrouve au sein de ApxIVA (Osicka *et al.*, 2004).

## 2.2. Les lipopolysaccharides

Les LPS jouent un rôle dans le développement de la maladie mais de moindre importance que les toxines Apx. En effet, il a été montré qu'un mutant du sérotype 1, ne produisant ni ApxIA, ni ApxIIA, mais possédant des LPS intacts, est dépourvu de pouvoir pathogène chez la souris et chez le porc par rapport à sa souche parentale (Tascon *et al.*, 1994 ; Boekema *et al.*, 2004b) et que des surnageants de culture débarrassés des toxines par des anticorps monoclonaux sont peu pathogènes (Kamp *et al.*, 1997). Toutefois, l'inoculation intranasale à des souris de LPS du sérotype 1 par Idris et ses collaborateurs (1993) a permis de reproduire les mêmes lésions que celles obtenues par l'inoculation de la bactérie entière de ce sérotype ou de son surnageant de culture contenant les toxines Apx. En réalité, l'action toxique des LPS dépend des quantités administrées et de très fortes doses (100 µg à 40 mg) sont nécessaires pour induire des lésions similaires à celles

trouvées chez des porcs infectés par la bactérie (Fenwick *et al.*, 1986 ; Udeze *et al.*, 1987).

Le LPS semble participer à la virulence d'*A. pleuropneumoniae* en intervenant dans l'adhérence : (i) les souches générant des colonies de type lisse adhèrent en plus grand nombre à des anneaux trachéaux porcins en culture que celles de type semi-rugueux (Belanger *et al.*, 1990) ; (ii) cette adhérence peut être inhibée par du LPS purifié, par des polysaccharides de haut poids moléculaire ou par un anticorps monoclonal dirigé contre ces polysaccharides (mAb 5.1G8F10) (Paradis *et al.*, 1994 ; Paradis *et al.*, 1999) ; (iii) des souches mutantes pour le corps du LPS montrent que ce domaine joue un rôle important dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules du tractus respiratoire porcine puisque l'adhérence de ces mutants à des sections trachéales congelées est moindre comparée à celle de la souche parentale (Rioux *et al.*, 1997 ; Rioux *et al.*, 1999 ; Labrie *et al.*, 2002).

Les glycosphingolipides présents à la surface des cellules épithéliales respiratoires ont été identifiés comme des récepteurs potentiels du LPS d'*A. pleuropneumoniae* et en particulier les séquences saccharidiques : (i) GlcCer et LacCer ; (ii) glycosphingolipides GalCer et sulfatide, et (iii) GgO3 et GgO4 (Abul-Milh *et al.*, 1999). Des bactéries entières, du LPS purifié et du LPS détoxifié des sérotypes 1 et 2 d'*A. pleuropneumoniae* se lient plus fortement au gangliotriaosylcéramide (GgO3) et au gangliotétraosylcéramide (GgO4) (Abul-Milh *et al.*, 1999). Ces interactions ne sont pas significativement affectées par des anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes O homologues, suggérant que le corps oligosaccharidique pourrait être le domaine conservé du LPS impliqué dans l'adhérence au GgO3 et au GgO4 (Abul-Milh *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a été montré pour certains sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* qu'ils étaient capables de se lier spécifiquement aux phospholipides du type éthanolamine, constituant des membranes cellulaires, et que cette liaison semble se faire via l'antigène O du LPS (Jeannotte *et al.*, 2003). Néanmoins, le rôle du corps oligosaccharidique dans l'adhérence n'a pas été démontré *in vivo*.

Lorsque l'on interprète ces données, il faut tenir compte de la variation dans la longueur et la complexité des chaînes O entre souches de dif-

férents sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. Par exemple, les souches du sérotype 2 formant des colonies de type lisse expriment typiquement un LPS qui peut empêcher l'accessibilité du corps oligosaccharidique (Bosse *et al.*, 2002). L'adhérence aux cellules hôtes est un processus complexe, multifactoriel, et d'autres expériences avec des mutants bien définis sont nécessaires afin de mieux comprendre cette étape initiale qu'est l'adhérence dans la pathogenèse de l'infection par *A. pleuropneumoniae*.

Le LPS pourrait aussi jouer un autre rôle en intervenant, pour certains sérotypes, comme élément protecteur contre l'attaque des facteurs du complément. Une étude de mutagenèse par transposition montre que c'est l'expression de la chaîne O du LPS qui est responsable de la résistance au sérum, typique du sérotype 1 (Rioux *et al.*, 1999).

### 2.3. La capsule polysaccharidique

La capsule polysaccharidique semble jouer un rôle dans la virulence par son épaisseur, sa composition et son expression, rendant les souches plus ou moins virulentes (Bandara *et al.*, 2003). Contrairement aux souches parentales capsulées, les mutants non capsulés d'*A. pleuropneumoniae* obtenus par mutagenèse chimique (Inzana *et al.*, 1988), échange allélique (Ward *et al.*, 1998) ou mutagenèse par transposition (Rioux *et al.*, 2000) sont atténués (Inzana *et al.*, 1988 ; Inzana *et al.*, 1993). En général, les isolats dotés de capsules épaisses semblent être plus virulents : (i) une souche du sérotype 5 (isolat B8) possédant une capsule fragile, moins adhérente, est moins virulente qu'un isolat du même sérotype (I2000) qui a une capsule épaisse et bien adhérente (Jensen et Bertram, 1986) ; (ii) la souche atténuée CM5A dérivée de plusieurs passages *in vitro* de la souche virulente du sérotype 1 CM5 s'entoure d'une capsule plus fine (Rosendal et MacInnes, 1990) ; (iii) des mutants acapsulaires d'une souche du sérotype 5a ( $\Delta cps5ABC$ ) générés par délétion des gènes intervenant dans la synthèse de la capsule *cps5ABCD* (Ward *et al.*, 1998) et des mutants acapsulaires issus de mutagenèse par transposition dans une souche du sérotype 1 (Rioux *et al.*, 2000) sont plus facilement éliminés du tractus respiratoire que leurs souches parentales encapsulées et pleinement

virulentes ; (iv) un mutant isogénique du sérotype 1 délété dans les gènes *cps1AB* et ne produisant pas de capsule est moins virulent que sa souche parentale (Bandara *et al.*, 2003).

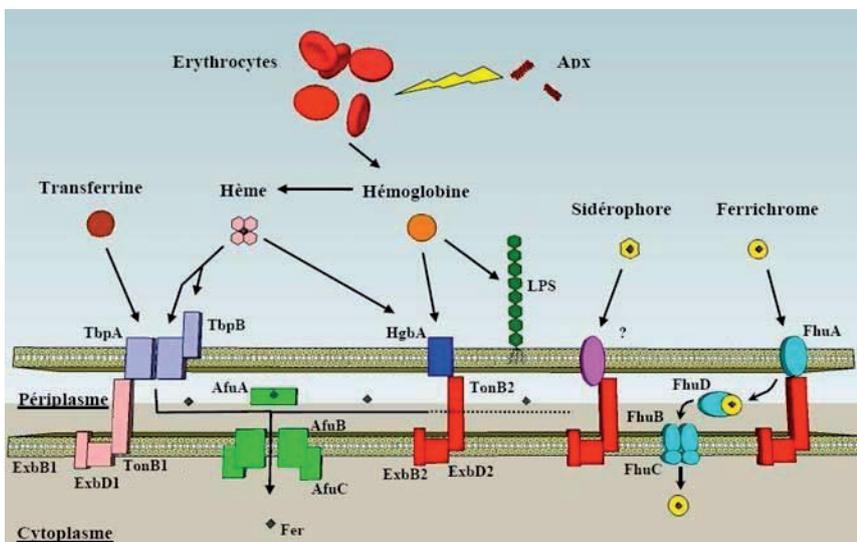
La capsule polysaccharidique, lorsqu'elle est synthétisée, intervient dans l'adhérence aux surfaces, fournit une protection contre les mécanismes de défense de l'hôte (fixation du complément, opsonophagocytose, protection contre les radicaux libres produits dans les macrophages et PMNs...) et contre certains antibiotiques. Ainsi, il a été démontré que la résistance d'*A. pleuropneumoniae* aux effets bactéricides d'un sérum (immunisé ou non) et à une opsonophagocytose médiée par le complément pourrait être liée à la capsule (Rycroft et Cullen, 1990 ; Thwaites et Kadis, 1993 ; Ward et Inzana, 1994). Des souches mutantes  $\Delta cps5ABC$  acapsulaires du sérotype 5 d'*A. pleuropneumoniae* sont effectivement tuées en présence de sérum (immun ou non), tandis que les mêmes souches capsulées ne le sont pas (Thwaites et Kadis, 1993 ; Ward et Inzana, 1994 ; Ward *et al.*, 1998). Une capsule épaisse n'empêche pas la liaison et l'activation du complément mais, en liant les anticorps dirigés contre la capsule à une distance significative de la membrane cellulaire, elle limite le dépôt de C9, un composant du complexe d'attaque membranaire (Ward et Inzana, 1994).

### 2.4. Les fimbriae

Les fimbriae sont des appendices bactériens impliqués dans des phénomènes d'adhérence qui, à ce titre, peuvent jouer un rôle primordial tout au long de l'infection (Andersen, 1990). Des fimbriae intactes et sous-unitaires ont été purifiées des sérotypes 1, 2, 7 et 12 d'*A. pleuropneumoniae* et le séquençage de leur extrémité N-terminale a montré que leurs 12 premiers acides aminés sont identiques à ceux des sous-unités fimbriaires de nombreuses autres bactéries (Zhang *et al.*, 2000). De plus, une réaction croisée se produit entre des préparations de ces fimbriae intactes et un antisérum dirigé contre la sous-unité fimbriaire de type IV de *Moraxella bovis* (Zhang *et al.*, 2000). Ces adhésines ont donc été classées dans la famille des fimbriae de type IV.

Leur production par *A. pleuropneumoniae* semble être régulée par les conditions de croissance *in vivo*. En effet, il

**Figure 3 :** Les différentes stratégies de récupération, par *Actinobacillus pleuropneumoniae*, du fer libre ou associé à la transferrine, l'hémoglobine et l'hème. La bactérie peut récupérer le fer en liant la transferrine via le récepteur TbpA (mauve). En association avec le complexe TonB1/ExbB1/ExbD1 (rose) ou TonB2/ExbB2/ExbD2 (rouge) fournissant l'énergie nécessaire, ils vont transmettre l'ion métallique à la protéine périplasmique AfuA (vert clair). Grâce aux toxines Apx, l'hémoglobine est libérée des érythrocytes et peut être captée par le récepteur de membrane externe HgbA (bleu foncé) et, peut-être, à partir du LPS (vert foncé). Son ion ferrique sera alors transmis via le complexe TonB2/ExbB2/ExbD2 (rouge) à AfuA. L'hème peut être capté par les récepteurs TbpB (mauve) et HgbA, et son fer transmis de la même façon à AfuA. Le fer libre peut être capté par des ferrichromes sécrétés dans le milieu extracellulaire. Le ferrichrome est alors capté par le récepteur FhuA (bleu ciel), transféré par le complexe TonB2/ExbB2/ExbD2 à la protéine périplasmique FhuD (bleu ciel) puis intégré dans le cytoplasme via les protéines FhuBC localisées dans la membrane interne (bleu ciel). D'autres types de sidérophore pourraient être captés par des récepteurs de membrane externe (rose). Enfin, la protéine AfuA associée au fer va être captée par le complexe AfuBC (vert clair) qui va faire entrer l'ion métallique dans le cytoplasme de la bactérie (Bosse *et al.*, 2002).



a été mis en évidence que la transcription du cluster *apfABCD* codant pour la fimbriae de type IV (Stevenson *et al.*, 2003) est étroitement régulée par un promoteur sensible aux conditions de culture et est activée par un contact de la bactérie avec les cellules épithéliales pulmonaires porcines ou lors d'infections expérimentales de porcs (Boekema *et al.*, 2004a). Les niveaux d'expression des fimbriae d'isolats provenant des cavités nasales, des amygdales et des poumons sont comparables, ce qui pourrait indiquer que le taux d'expression fimbriaire serait équivalent dans ces trois sites anatomiques (Utrera et Pijoan, 1991).

Le gène *apfA* code pour une pré-piline d'environ 16 kDa qui est réduite à 14,5 kDa lorsqu'elle subit le clivage de sa séquence signal par la peptidase ApfD pour donner la piline mature qui sera polymérisée par la suite (Stevenson *et al.*, 2003). Les 30 premiers résidus

de ApfA, contenant le peptide signal N-terminal, montrent une forte identité avec les autres membres du groupe A de la famille des fimbriae de type IV (Stevenson *et al.*, 2003). Les résidus cystéyls C-terminaux sont également hautement conservés formant, dans les autres fimbriae de type IV, des ponts disulfures qui produisent une boucle importante d'un point de vue fonctionnel (Stevenson *et al.*, 2003).

## 2.5. Les systèmes de captation du fer et d'autres nutriments

Le fer est essentiel pour la croissance bactérienne. Sa disponibilité plus ou moins grande régule également l'expression de nombreux facteurs de virulence. Dans les sécrétions exocrites de l'hôte, le fer extracellulaire est lié à des glycoprotéines comme la lactoferrine ou la transferrine. La majorité du fer intracellulaire est,

quant à elle, séquestrée par des protéines contenant de l'hème comme l'hémoglobine. Les stratégies d'acquisition du fer mises en place par les bactéries pour survivre dans l'hôte, sont multiples depuis la production de sidérophores chélatant directement le fer libre jusqu'à l'utilisation directe des protéines de l'hôte (la lactoferrine, la transferrine, l'hémoglobine, l'hème libre, l'hémine, l'hématine...) afin de leur soutirer leur fer.

### 2.5.1. Récupération de la transferrine

*A. pleuropneumoniae* est capable d'utiliser spécifiquement la transferrine porcine comme unique source de fer (Niven *et al.*, 1989 ; Gonzalez *et al.*, 1990). Plusieurs expériences montrent que la capacité d'utiliser le fer lié à la transferrine est nécessaire à la multiplication et à la persistance d'*A. pleuropneumoniae* dans les voies respiratoires porcines.

Les différents éléments du système de captation du fer via la transferrine comprennent les gènes *tbpBA* et, directement en amont de ceux-ci, les gènes *exbBD* (Tonpitak *et al.*, 2000). Les gènes *tbpBA* sont co-transcrits avec les gènes *exbBD* (Gonzalez *et al.*, 1995 ; Tonpitak *et al.*, 2000). Leur transcription se fait sous la forme d'un ARNm polycistronique et est induite lorsque le milieu est déplété en fer (Tonpitak *et al.*, 2000). TbpA (~ 100 kDa) et TbpB (~ 60 kDa) (Daban *et al.*, 1996 ; Medrano *et al.*, 1997 ; Kim et Lee, 2006) ont été identifiées comme des protéines de la membrane externe possédant une affinité pour le lobe C de la transferrine porcine (Gonzalez *et al.*, 1990 ; Ricard *et al.*, 1991). TbpA (Tbp1, TfbB) forme un canal transmembranaire pour le transport du fer au travers de la membrane externe (figure 3) (Gonzalez *et al.*, 1995 ; Daban *et al.*, 1996 ; Wilke *et al.*, 1997). TbpB (Tbp2, TfbA) semble être une lipoprotéine qui s'ancre dans la membrane externe (figure 3) (Gerlach *et al.*, 1992 ; Gonzalez *et al.*, 1995 ; Fuller *et al.*, 1998). L'expression de TbpB est particulièrement importante dans la phase aiguë de l'infection et diminue au cours de la maladie (Hennig *et al.*, 1999). Une interaction entre ces deux protéines serait nécessaire pour une utilisation optimale de la transferrine porcine comme unique source de fer (figure 3) (Gonzalez *et al.*, 1995 ; Fuller *et al.*, 1998 ; Litt *et al.*, 2000). Elles semblent jouer un rôle important dans la

virulence puisque des souches  $\Delta tpbB$ ,  $\Delta tpbA$  et  $\Delta tpbB\Delta tpbA$  n'induisent pas la maladie lors d'une infection par aérosol (Baltes *et al.*, 2002).

### 2.5.2. Récupération du fer à partir de l'hémoglobine

Certains isolats d'*A. pleuropneumoniae* sont capables d'utiliser l'hémoglobine et l'hème de différentes espèces animales comme unique source de fer pour leur croissance tandis que d'autres isolats en sont incapables (Deneer et Potter, 1989 ; Belanger *et al.*, 1995 ; Archambault *et al.*, 2003). L'hémoglobine est relâchée des érythrocytes par les toxines Apx (Frey *et al.*, 1993a) et peut être décomposée par des protéases aboutissant à la libération de l'hème (Negrete-Abascal *et al.*, 1994 ; Garcia-Cuellar *et al.*, 2000).

Des protéines de la membrane externe ont été impliquées dans la liaison de l'hémoglobine porcine (figure 3) (Belanger *et al.*, 1995 ; Archambault *et al.*, 1997 ; Archambault *et al.*, 1999). En effet, des expériences utilisant un mutant acapsulaire ont indiqué que ces molécules de surface liant l'hémoglobine sont plus exposées en l'absence des polysaccharides capsulaires (Archambault *et al.*, 1999). Il a aussi été démontré que des conditions de restriction en fer pouvaient promouvoir l'expression de ces récepteurs à hémoglobine (Archambault *et al.*, 1999 ; Archambault *et al.*, 2003). Ainsi, une protéine de membrane externe de 75 kDa dont l'expression est régulée par le fer, liant l'hémoglobine et l'hème, a été mise en évidence et pourrait être apparentée à des protéines de nombreuses bactéries Gram négatives telles que des protéines de membrane externe, de transport ainsi que des récepteurs TonB dépendants (Archambault *et al.*, 2003). Un autre récepteur à l'hémoglobine porcine nommé HgbA (105 kDa), localisé dans la membrane externe (figure 3), codé par le gène *hgbA*, surexprimé lors d'une déplétion en fer (Srikumar *et al.*, 2004 ; Deslandes *et al.*, 2007) et conservé parmi tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*, semble jouer un rôle dans l'infection puisqu'un mutant isogénique  $\Delta hgbA$  montre une virulence réduite chez le porc par rapport à la souche parentale (Shakarji *et al.*, 2006). Comme les récepteurs TbpA et TbpB, HgbA aurait aussi la capacité de lier l'hème (Pawelek et Coulton, 2004).

Le lipide A purifié du LPS, de même que ses constituants en acide gras, lient également l'hémoglobine porcine purifiée *in vitro* (Belanger *et al.*, 1995). Toutefois, des souches mutées pour le LPS ne sont pas altérées dans la fonction récupératrice du fer à partir de l'hémoglobine (Archambault *et al.*, 1999).

### 2.5.3. Récupération du fer à partir de sidérophores

Un récepteur à ferrichrome (sidérophore de type hydroxamate), FhuA (75 kDa), a été identifié dans la membrane externe de tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (figure 3) et est codé par le gène *fhuA* dont l'expression n'est pas exacerbée lors d'une restriction en fer (Mikael *et al.*, 2002 ; 2003). Un mutant délété pour *fhuA* est incapable d'acquérir le ferrichrome (Mikael *et al.*, 2003) mais l'infection produite par une telle souche n'est pas atténuée par rapport à la souche parentale (Baltes *et al.*, 2003b). Le gène *fhuA* codant pour le récepteur se localise dans l'opéron *fhuCDBA* où FhuD (35,6 kDa) est une protéine périplasmique (figure 3) responsable de la translocation de l'hydroxamate ferrique de la membrane externe vers la membrane interne. FhuC (28,5 kDa) et FhuB (69,4 kDa) sont des protéines associées à la membrane cytoplasmique (figure 3) qui internalisent l'hydroxamate ferrique (Mikael *et al.*, 2002).

En conditions de restriction en fer, l'expression des gènes d'un possible complexe *yfeABCD*, un autre système d'acquisition de fer chélaté, ont été détectés ainsi que celle des gènes codant pour un système du type entérobactine (Deslandes *et al.*, 2007). Il semble qu'*A. pleuropneumoniae* soit également capable d'acquérir le fer à partir des sidérophores d'autres bactéries (Diarra *et al.*, 1996).

### 2.5.4. Transfert du fer libre depuis les récepteurs de haute affinité de la membrane externe vers le cytoplasme bactérien

Une fois la molécule liée à son récepteur, le fer qui lui est associé est libéré dans le périplasma par le complexe ExbBDTonB (figure 3) (Moeck et Coulton, 1998; Beddek *et al.*, 2004). Les protéines ExbB et ExbD sont des protéines intégrales localisées dans la membrane interne d'*A. pleuropneumoniae* (figure 3) qui ancrent la protéine TonB dans le périplasma sous

forme d'un dimère (Chang *et al.*, 2001). La liaison d'un ligand à l'un des récepteurs de haute affinité en surface décrits précédemment, induit des changements conformationnels constituant un signal perçu dans le périplasma par le complexe ExbBDTonB qui libère alors l'énergie nécessaire au transport du fer au travers de la membrane externe (figure 3) (Moeck et Coulton, 1998).

La protéine Fur (Hsu *et al.*, 2003) est associée à la régulation des systèmes de récupération du fer (Gonzalez *et al.*, 1995) et un mutant isogénique  $\Delta fur$  d'*A. pleuropneumoniae* montre une expression constitutive de TbpB et ExbB, des problèmes de croissance *in vitro* et une réduction de virulence lors d'une infection des porcs par aérosol (Jacobsen *et al.*, 2005b). Par ailleurs, l'inoculation par aérosol d'un mutant isogénique d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta exbB$  est incapable d'évoquer une réponse immunitaire humorale détectable, probablement parce qu'il ne colonise pas suffisamment longtemps l'appareil respiratoire (Baltes *et al.*, 2001).

Un gène *tonB1* se retrouve en amont des gènes *exbB1D1tpbBA* et pourrait être localisé sur le même transcrite issu d'un promoteur régulé par le fer, aboutissant à la formation d'un système TonB1 (Tonpitak *et al.*, 2000 ; Beddek *et al.*, 2004). Un second système TonB2 existe, issu du cluster *exbB2D2tonB2* (figure 3) (Beddek *et al.*, 2004 ; Deslandes *et al.*, 2007). Ce dernier est essentiel à la croissance *in vitro* lorsque la seule source de fer est l'hème, l'hémoglobine porcine ou le ferrichrome (Beddek *et al.*, 2004). Lorsque le fer est fourni sous forme de transferrine porcine, aucun des mutants associés à TonB1 ou TonB2 ne sont viables (Beddek *et al.*, 2004). TonB2 semble jouer un rôle plus important que TonB1 puisque des mutants *tonB2* sont hautement atténués dans un modèle d'infection aiguë, contrairement à *tonB1* (Beddek *et al.*, 2004).

Enfin, le système AfuABC (*Actinobacillus* Ferric Uptake), codé par le locus *afuABC*, est un système indépendant des précédents qui interviendrait dans le transport du fer, sous sa forme ferrique, au travers de la membrane cytoplasmique (figure 3) (Chin *et al.*, 1996). Dans ce complexe ABC liant l'ATP, AfuA est une protéine périplasmique qui capture le fer libre, tandis que AfuB et AfuC se

localisent dans la membrane cytoplasmique et forment l'appareil de translocation du fer dans le cytoplasme. AfuB, hautement hydrophobe, est une protéine intégrale et AfuC, hydrophile, est exposée à la lumière cytoplasmique (figure 3) (Chin *et al.*, 1996).

#### 2.5.5. Récupération d'autres nutriments

Le fer n'est pas le seul nutriment limitant pouvant affecter la capacité de survie d'*A. pleuropneumoniae* dans le tractus respiratoire. Récemment, il est apparu qu'un opéron codant pour un système de transport de type ABC (*cbi-KLMQO*) semble nécessaire à l'acquisition du nickel (Bosse *et al.*, 2001) qui n'est disponible qu'à de très faibles concentrations chez les mammifères et qui est requis pour l'activité uréase chez *A. pleuropneumoniae*. L'insertion d'un transposon dans le gène *cbi-K* d'*A. pleuropneumoniae* n'affecte pas le taux de croissance *in vitro* par rapport à celui de la souche parentale (Bosse *et al.*, 2001). Néanmoins, ce mutant est uréase-négatif dans des conditions limitantes en nickel et est incapable d'établir une infection suite à l'inoculation d'une faible dose en aérosol (Bosse *et al.*, 2001). La contribution du nickel à la virulence d'*A. pleuropneumoniae* est liée à son rôle dans l'activité uréasique. En effet, une mutation dans l'opéron uréase mène à des niveaux similaires d'atténuation (Bosse *et al.*, 2001). Toutefois, il est possible que le nickel soit requis pour d'autres fonctions (Ahn *et al.*, 2006).

## 2.6. Les protéases

Negrete-Abascal et ses collaborateurs (Negrete-Abascal *et al.*, 1994) ont concentré, à partir des surnageants de culture d'*A. pleuropneumoniae*, plusieurs protéines (de 50 à plus de 200 kDa) montrant une activité protéolytique modérée contre les immunoglobulines A (IgAs) monomériques porcines, mais pas contre les immunoglobulines G (IgGs). Ces différentes protéases dégradent également l'hémoglobine porcine, humaine et bovine mais moins efficacement (Negrete-Abascal *et al.*, 1994). Par la suite, ce groupe purifia une des protéines de haute masse moléculaire (> 200 kDa) et montra qu'il s'agissait d'oligomères d'une métalloprotéase de 47 kDa conservée dans tous les sérotypes (Negrete-Abascal *et al.*, 1998). Contrairement à leur première

étude, cette protéine purifiée montra une activité protéolytique *in vitro* à la fois contre les IgAs et les IgGs porcines, ainsi que vis-à-vis de l'hémoglobine et de la gélatine porcines (Negrete-Abascal *et al.*, 1998). Cette protéase se retrouve en périphérie (active) et à l'intérieur (inactive) de vésicules de 20 à plus de 200 nm de diamètre, formées et libérées de la membrane externe (Negrete-Abascal *et al.*, 2000). Toutes ces données suggèrent qu'il est possible que la dégradation des immunoglobulines porcines observée de manière récurrente (Kilian, 1976 ; Negrete-Abascal *et al.*, 1994 ; Negrete-Abascal *et al.*, 1998) soit due à une activité protéolytique non spécifique plutôt qu'à une activité protéasique ciblant les IgAs. On ne sait pas encore clairement si *A. pleuropneumoniae* est capable de produire une protéase contre des immunoglobulines qui pourrait interférer avec l'opsonophagocytose.

Une métalloprotéase à zinc de 24 kDa, présente dans tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*, a été clonée et exprimée en *E. coli* (Garcia-Cuellar *et al.*, 2000). La forme oligomérique du peptide recombinant clive le collagène, la gélatine et l'actinine *in vitro*. Cette protéase est probablement différente du complexe [Ca, Zn] métalloprotéase (> 200 kDa) décrit par Negrete-Abascal et collaborateurs qui dégrade aussi la gélatine, puisque des anticorps dirigés contre cette protéine ne reconnaissent pas la protéase recombinante de 24 kDa (Negrete-Abascal *et al.*, 1998).

Certains sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* sont capables de sécréter, *in vitro* et *in vivo*, une métalloprotéase indépendante du zinc (101 kDa), appartenant à la famille des aminopeptidases, qui possède un haut degré d'identité avec des aminopeptidases d'autres bactéries Gram négatives, suggérant un rôle dans la pathogénèse de la pleuropneumonie (Garcia Gonzalez *et al.*, 2004).

## 2.7. Le métabolisme bactérien

*A. pleuropneumoniae* persiste au sein des séquestres pulmonaires, donc dans des conditions anoxiques, grâce à l'expression de gènes intervenant dans un métabolisme de type anaérobique (Baltes et Gerlach, 2004). Par ailleurs, il a également été démontré que ces gènes surexprimés en anaérobiose le sont aussi lorsque le milieu de culture

est supplémenté par le fluide de lavage bronchoalvéolaire de porcs infectés par *A. pleuropneumoniae* (Baltes *et al.*, 2003a ; Baltes et Gerlach, 2004 ; Baltes *et al.*, 2004 ; Jacobsen *et al.*, 2005a).

La délétion du gène *arcA*, intervenant dans le système ArcAB facilitant l'adaptation métabolique anaérobique, atténue significativement *A. pleuropneumoniae* et réduit sa survie à long terme à la surface d'épithéliums non altérés et dans les séquestres pulmonaires (Buettner *et al.*, 2007). Cette délétion n'affecte pas la croissance et la survie de la bactérie en anaérobiose mais semble inhiber l'autoaggrégation anaérobique et la formation d'un biofilm (Buettner *et al.*, 2007). Dans les séquestres nécrotiques, en conditions anaérobiques, HlyX, l'homologue du régulateur de la fumarate-nitrate réductase (FNR) (MacInnes *et al.*, 1990 ; Green et Baldwin, 1997), est surexprimé aussi (Baltes *et al.*, 2007). Il entraîne une augmentation de l'expression des gènes de la DMSO réductase (DmsA) et de l'aspartate-ammonium lyase (AspA) (Baltes *et al.*, 2005). Différentes expériences ont montré que la mutation de *hlyX* (Baltes *et al.*, 2005) et la délétion des gènes *dmsA* (Baltes *et al.*, 2003a) et *aspA* (Jacobsen *et al.*, 2005a) entraînent une forte atténuation d'*A. pleuropneumoniae*, laquelle devient incapable de persister dans l'épithélium pulmonaire sain et les cryptes des amygdales.

L'activité uréasique, liée à l'acquisition du nickel, peut être considérée comme un mécanisme d'acquisition de nutriment par lequel il y aurait production d'ammoniaque (Bosse et MacInnes, 1997), une source d'azote préférée par de nombreuses bactéries mais qui inhibe aussi la fusion phagosome-lysosome et élève le pH intralysosomal dans les macrophages, provoquant une diminution de l'activité de l'hydrolase acide (Gordon *et al.*, 1980). Des mutants uréase-négatifs d'*A. pleuropneumoniae* sont encore capables de causer une maladie aiguë chez des animaux inoculés avec de hautes doses infectieuses (Tascon Cabrero *et al.*, 1997 ; Bosse et MacInnes, 2000 ; Baltes *et al.*, 2001). Toutefois, les mutants uréase-négatifs sont éliminés plus rapidement que la souche sauvage et ils ne sont pas capables d'établir l'infection si la dose d'inoculation est faible (Bosse et MacInnes, 2000 ; Baltes *et al.*, 2001 ; Bosse *et al.*, 2001). Un mutant isogé-

nique d'*A. pleuropneumoniae*  $\Delta$ ureC produit une infection identique à celle de la souche parentale dans la phase aiguë de la maladie. Cependant, trois semaines après l'infection, ce mutant n'est plus isolé du tissu pulmonaire sain contrairement à la souche parentale (Baltes *et al.*, 2001). De plus, la réponse immunitaire locale révèle un nombre significativement plus élevé de lymphocytes B spécifiques d'*A. pleuropneumoniae* dans le fluide du lavage broncho-alvéolaire (FLBA) des porcs infectés avec le mutant  $\Delta$ ureC que dans celui des animaux infectés par la souche parentale, ce qui implique que l'activité uréase d'*A. pleuropneumoniae* peut induire une inhibition de la réponse immunitaire locale suffisante pour permettre la persistance de la souche parentale uréase-positif (Baltes *et al.*, 2001).

Les gènes *aroA* et *aroQ* interviennent dans les voies métaboliques associées aux acides aminés aromatiques et à l'acide folique (Hernanz Moral *et al.*, 1999 ; Ingham *et al.*, 2002). Il a été montré qu'une souche *knock-down* pour le gène *aroA* et une autre pour *aroQ* deviennent respectivement, non virulente et moins virulente, à des doses  $10^4$  fois supérieures à la dose connue pour induire la pleuropneumonie alors que les animaux infectés avec les souches parentales développent la maladie (Garside *et al.*, 2002 ; Ingham *et al.*, 2002).

Une pauvreté du milieu en acides aminés branchés (AABCs) (leucine, isoleucine et valine) induit, *in vitro* et *in vivo*, plusieurs promoteurs selon un (des) mécanisme(s) peu connus (Fuller *et al.*, 1999 ; Wagner et Mulks, 2006). La protéine Lrp (*Leucine-responsive regulatory protein*) est un régulateur global qui a été associé, chez *E. coli*, à la régulation de nombreux gènes dont certains impliqués dans la biosynthèse des AABCs : Lrp active *ilvI*, un gène dont le produit est impliqué dans la biosynthèse des AABCs (Ricca *et al.*, 1989 ; Platko *et al.*, 1990). Le même type de régulation semble se produire au sein d'*A. pleuropneumoniae* lors d'une restriction en AABCs (Wagner et Mulks, 2007) mais son importance dans la virulence n'est pas connue.

## 2.8. Les flagelles

*A. pleuropneumoniae* a longtemps été considérée comme une bactérie immobile et non flagellée. Il a cependant été démontré qu'elle pouvait produire des

flagelles constitués d'une flagelline de 65 kDa montrant 100 % d'identité, dans sa partie N-terminale, avec les flagellines de *E. coli*, *Salmonella* et *Shigella*, codées par le gène *fliC* (Negrete-Abascal *et al.*, 2003). L'importance de ces flagelles dans la pathogenèse n'est pas connue.

## 2.9. Le biofilm

La plupart des isolats d'*A. pleuropneumoniae* sont capables de former *in vitro* des biofilms tenaces sur des surfaces abiotiques (Kaplan et Mulks, 2005). Ces biofilms sont connus pour attacher fermement la masse bactérienne aux surfaces sous-jacentes (Sutherland, 2001) et jouer un rôle dans la pathogenèse de nombreuses infections chroniques (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). De plus, ils génèrent un micro-environnement contenant, notamment, des nutriments, des enzymes sécrétées et de l'ADN, qui fournit une protection contre les mécanismes de défense de l'hôte et contre des antibiotiques (Sutherland, 2001). Les biofilms d'*A. pleuropneumoniae* contiennent surtout un polysaccharide riche en hexosamine, le PGA qui est un polymère linéaire de résidus N-acétyl-D-glucosamine liés en  $\beta$  (1,6), et constitue le substrat de la dispersine B et d'une glycosyl hydrolase libérant le biofilm (Kaplan *et al.*, 2004). Le gène qui code pour la glycoside-transférase spécifique des PGA, *pgaC*, est présent dans tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et sa mutation entraîne l'impossibilité de produire les biofilms *in vitro* (et donc d'adhérer) et une augmentation de la sensibilité à l'ampicilline, ce qui peut avoir une importance dans la colonisation et la pathogenèse (Izano *et al.*, 2007).

## 2.10. Les autres facteurs de virulence potentiels

*A. pleuropneumoniae* adhère efficacement, de façon  $Ca^{2+}$ -dépendante, au collagène pulmonaire porcin de différents types (I, III, IV et V), en partie grâce à une protéine de la membrane externe de 60 kDa qui serait également capable de lier le fibrinogène mais pas la fibronectine, ni la laminine (Enriquez-Verdugo *et al.*, 2004).

Une analyse SCOTS (*Selective Capture of Transcribed Sequences*) réalisée à la fin de la phase aiguë de la pleuropneumonie (sept jours après inoculation) a permis d'identifier une

modification de l'expression de 46 gènes au sein du génome d'*A. pleuropneumoniae*, pouvant être répartis en six groupes fonctionnels (Baltes et Gerlach, 2004) : des protéines sécrétées, de surface, du métabolisme, de régulation, de stress et de transport. Parmi ceux-ci, quatre gènes non exprimés *in vitro* sont activés *in vivo* : la toxine ApxIV (Schaller *et al.*, 1999), le transporteur ABC ApaA (30 kDa) (Martin et Mulks, 1999), la petite sous-unité du récepteur à transferrine TbpB (Gerlach *et al.*, 1992) et la sous-unité catalytique de la DMSO réductase (Baltes *et al.*, 2003a). Certaines séquences identifiées, déjà impliquées dans la virulence par STM (*Signature-Tagged Mutagenesis*) (Fuller *et al.*, 2000 ; Sheehan *et al.*, 2003), codent pour une GMP synthase, la protéine d'échange « thiol : pont disulfure » DsbA, une protéine de synthèse du cofacteur de la molybdoptérine et une protéine de membrane externe semblable à PomA de *Pasteurella multocida* (Baltes et Gerlach, 2004). Certains des gènes non identifiés sont apparentés à des gènes qui ont été impliqués dans la virulence d'autres bactéries (Baltes et Gerlach, 2004) : (i) une protéine de type fimbriaire, similaire à FlpD d'*Haemophilus ducreyi*, nécessaire à la formation de microcolonies et à la virulence chez l'homme ; (ii) une diadénosine tétraphosphatase qui joue un rôle dans l'invasion de *Salmonella* sp. et (iii) une adhésine autotransporteuse de haut poids moléculaire exprimée par les souches encapsulées d'*Haemophilus influenzae* et homologue à son adhésine Hia (St Geme *et al.*, 1996; Baltes et Gerlach, 2004). Des adhésines autotransporteuses n'ont pas encore été caractérisées chez *A. pleuropneumoniae* ; cependant plusieurs gènes potentiels y correspondant existent dans sa banque de données génomique (GenBank NZ\_AACK01000066 et NZ\_AACK01000041) (Baltes et Gerlach, 2004).

Une autre analyse SCOTS suggère que 36 gènes d'*A. pleuropneumoniae* sont potentiellement exprimés *in vivo* dans les tissus pulmonaires nécrosés, 21 jours après l'infection (Baltes *et al.*, 2007). Trois de ces gènes, celui codant pour le facteur d'élongation EF-Tu, l'ubiquinone réductase et l'ARN polymérase B ont déjà été décrits comme étant exprimés sept jours après l'infection (Baltes et Gerlach, 2004). Une analyse STM a également détecté

que l'ubiquinone réductase et la DnaK (élément d'un système chaperon pouvant intervenir dans la protection de la bactérie lors de la phagocytose par les macrophages) auraient, *in vivo*, une activité essentielle pour *A. pleuropneumoniae* (Fuller *et al.*, 2000 ; Sheehan *et al.*, 2003). La majorité des gènes identifiés jouent un rôle dans le transport des nutriments, le métabolisme énergétique ou la synthèse d'acides nucléiques et de composants bactériens (Baltes *et al.*, 2007). Le gène ayant probablement le plus d'influence directe sur la pathogénie d'*A. pleuropneumoniae* est le gène *aasP* dont la transcription dépend de HlyX en conditions anaérobiques (Baltes *et al.*, 2007). Il code pour AasP (104 kDa), une protéase autotransportée « *subtilisine-like* » (Baltes *et al.*, 2007). Celle-ci est très semblable à d'autres protéases telle que SphB1 de *B. pertussis* qui sert à la maturation d'autres autotransporteurs (Coutte *et al.*, 2001). Ces protéines, identifiées dans un grand nombre de bactéries Gram négatives, partagent des particularités structurales : une séquence N-terminale nécessaire pour le transport Sec-dépendant au travers de la membrane interne, le « *passenger domain* » qui est la portion sécrétée de la protéine, et la portion translocatrice qui s'insère dans la membrane externe formant un pore pour médier le passage du « *passenger domain* » à l'extérieur de la cellule (Henderson *et al.*, 2004). Le rôle de AasP reste à clarifier.

La localisation périplasmique de la [Cu, Zn] superoxyde dismutase (SodC) suggère un rôle dans la transformation des radicaux superoxydes produits à l'extérieur de la bactérie par les PMNs (Langford *et al.*, 1996). Cependant, des mutants isogéniques pour *sod-C* restent capables de causer une pleuropneumonie aiguë (Ward *et al.*, 1998 ; Rioux *et al.*, 1999 ; Rioux *et al.*, 2000 ; Sheehan *et al.*, 2000).

Le gène *ohr*, présent uniquement dans les sérotypes 1, 9 et 11, surexprimé *in vivo*, code pour une réductase d'hydroperoxyde organique, enzyme qui pourrait jouer un rôle dans la détoxification des hydroperoxydes organiques générés durant l'infection (Shea et Mulks, 2002), soit directement au sein du phagosome, soit issus de l'interaction des radicaux oxygénés avec la membrane bactérienne (Miller et Britigan, 1997). Cette protéine de défense peut donc jouer un rôle dans la virulence de la bactérie.

### 3. CONCLUSIONS

La pleuropneumonie porcine à *A. pleuropneumoniae* est une affection majeure, fréquente et répandue mondialement dans les élevages porcins. Elle est responsable de pertes économiques conséquentes et d'un usage intensif d'antibiotiques. L'étude des facteurs de virulence de la bactérie déployés au cours de la pathogénie est donc d'une importance majeure pour l'établissement d'une thérapie et d'une prophylaxie optimales. Les armes les plus destructrices d'*A. pleuropneumoniae* sont ses exotoxines Apx car, à elles seules, elles parviennent à reproduire la maladie et les lésions tandis que des souches mutées ne produisant plus ces toxines, perdent leur virulence. Malgré leur importance, les seules connaissances disponibles des mécanismes cytotoxiques mis en jeu découlent des caractéristiques générales relatives à la famille des toxines RTX, dont elles font partie. Il est primordial que des études portant sur l'identification de la liaison potentielle de ces toxines à des récepteurs des cellules porcines soient entreprises car la caractérisation de cette interaction létale constitue une clé importante dans la lutte contre cette bactérie. Par ailleurs, les LPS semblent également jouer un rôle dans la pathogénèse, mais de moindre importance, en intervenant dans l'adhérence et dans la protection vis-à-vis du complément. D'autres facteurs de virulence, mineurs, sont décrits : la capsule polysaccharidique, les fimbriae, les systèmes de capture du fer (à partir de la transferrine, de l'hémoglobine et de sidérophores) et d'autres nutriments, des protéases, certaines voies métaboliques, des flagelles et le biofilm. Enfin, des études SCOTS ont révélé que d'autres gènes pouvaient avoir un rôle à jouer dans le développement de la pleuropneumonie porcine.

**Title : « *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence factors, the porcine pleuropneumonia etiologic agent »**

#### **Summary :**

Porcine pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* is a frequent and highly infectious disease generating significant economic losses related to deficiency in zootechnical profits and intensive use of antibiotics. This synthesis aims to review the bacterium elements necessary to pathogenesis development. At first time, we describe activation, secretion and cytotoxic action of Apx toxins, recognized as *A. pleuropneumoniae* major virulence factors. Then, we develop the other ones which are the lipopolysaccharides, the polysaccharidic capsule, the fimbriae, iron and other nutrients capture systems, various proteases, installation of certain metabolic ways, flagella and the biofilm.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABUL-MILH M., PARADIS S.E., DUBREUIL J.D., JACQUES M. Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 4983-4987.
- AHN B.E., CHA J., LEE E.J., HAN A.R., THOMPSON C.J., ROE J.H. Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.*, 2006, **59**, 1848-1858.
- ANDERSEN B.M. Bacterial adhesion: an important pathogenetic factor. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.*, 1990, **110**, 1534-1538.
- ANDERSEN C., KORONAKIS E., HUGHES C., KORONAKIS V. An aspartate ring at the TolC tunnel entrance determines ion selectivity and presents a target for blocking by large cations. *Mol. Microbiol.*, 2002, **44**, 1131-1139.
- ARCHAMBAULT M., OLIVIER M., FOIRY B., DIARRA M.S., PARADIS S.-E., JACQUES M. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. *J. Endotoxin. Res.*, 1997, **4**, 53-65.
- ARCHAMBAULT M., RIOUX S., JACQUES M. Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, **173**, 17-25.
- ARCHAMBAULT M., LABRIE J., RIOUX C.R., DUMAS F., THIBAUT P., ELKINS C., JACQUES M. Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Vet. Res.*, 2003, **67**, 271-277.
- ARGOS P. A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 1988, **16**, 9909-9916.
- BAKAS L., OSTOLAZA H., VAZ W.L., GONI F.M. Reversible adsorption and nonreversible insertion of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin into lipid bilayers. *Biophys. J.*, 1996, **71**, 1869-1876.
- BAKAS L., VEIGA M.P., SOLOAGA A., OSTOLAZA H., GONI F.M. Calcium-dependent conformation of *E. coli*  $\alpha$ -haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1368**, 225-234.
- BALAKRISHNAN L., HUGHES C., KORONAKIS V. Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 2001, **313**, 501-510.
- BALSALOBRE C., SILVAN J.M., BERGLUND S., MIZUNOE Y., UHLIN B.E., WAI S.N. Release of the type I secreted  $\alpha$ -haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2006, **59**, 99-112.
- BALTES N., TONPITAK W., GERLACH G.F., HENNIG-PAUKA I., HOFFMANN-MOUJAHID A., GANTER M., ROTHKOTTER H.J. *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 472-478.
- BALTES N., HENNIG-PAUKA I., GERLACH G.F. Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, **209**, 283-287.
- BALTES N., HENNIG-PAUKA I., JACOBSEN I., GRUBER A.D., GERLACH G.F. Identification of dimethyl sulfoxide reductase in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its role in infection. *Infect. Immun.*, 2003a, **71**, 6784-6792.
- BALTES N., TONPITAK W., HENNIG-PAUKA I., GRUBER A.D., GERLACH G.F. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 siderophore receptor FhuA is not required for virulence. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003b, **220**, 41-48.
- BALTES N., GERLACH G.F. Identification of genes transcribed by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in necrotic porcine lung tissue by using selective capture of transcribed sequences. *Infect. Immun.*, 2004, **72**, 6711-6716.
- BALTES N., KYAW S., HENNIG-PAUKA I., GERLACH G.F. Lack of influence of the anaerobic [NiFe] hydrogenase and L-1,2 propanediol oxidoreductase on the outcome of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *Vet. Microbiol.*, 2004, **102**, 67-72.
- BALTES N., N'DIAYE M., JACOBSEN I.D., MAAS A., BUETTNER F.F., GERLACH G.F. Deletion of the anaerobic regulator HlyX causes reduced colonization and persistence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine respiratory tract. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 4614-4619.
- BALTES N., BUETTNER F.F., GERLACH G.F. Selective capture of transcribed sequences (SCOTS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the chronic stage of disease reveals an HlyX-regulated autotransporter protein. *Vet. Microbiol.*, 2007, **123**, 110-121.
- BANDARA A.B., LAWRENCE M.L., VEIT H.P., INZANA T.J. Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 3320-3328.
- BAUMANN U., WU S., FLAHERTY K.M., MCKAY D.B. Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel  $\beta$  roll motif. *EMBO J.*, 1993, **12**, 3357-3364.
- BECK M., VAN DEN BOSCH J.F., JONGENELEN I.M., LOEFFEN P.L., NIELSEN R., NICOLET J., FREY J. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae* field strains. *J Clin. Microbiol.*, 1994, **32**, 2749-2754.
- BEDDEK A.J., SHEEHAN B.J., BOSSE J.T., RYCROFT A.N., KROLL J.S., LANGFORD P.R. Two TonB systems in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their roles in iron acquisition and virulence. *Infect. Immun.*, 2004, **72**, 701-708.
- BELANGER M., DUBREUIL D., HAREL J., GIRARD C., JACQUES M. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 3523-3530.
- BELANGER M., BEGIN C., JACQUES M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 656-662.
- BENABDELHAK H., KIONTKE S., HORN C., ERNST R., BLIGHT M.A., HOLLAND I.B., SCHMITT L. A specific interaction between the NBD of the ABC-transporter HlyB and a C-terminal fragment of its transport substrate haemolysin A. *J. Mol. Biol.*, 2003, **327**, 1169-1179.
- BENDIXEN P.H., SHEWEN P.E., ROSENDAL S., WILKIE B.N. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes, and testicular cells. *Infect. Immun.*, 1981, **33**, 673-676.
- BENZ R., SCHMID A., WAGNER W., GOEBEL W. Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect. Immun.*, 1989, **57**, 887-895.
- BHAKDI S., MACKMAN N., NICAUD J.M., HOLLAND I.B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.*, 1986, **52**, 63-69.
- BOEHM D.F., WELCH R.A., SNYDER I.S. Calcium is required for binding of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes. *Infect. Immun.*, 1990a, **58**, 1951-1958.
- BOEHM D.F., WELCH R.A., SNYDER I.S. Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect. Immun.*, 1990b, **58**, 1959-1964.
- BOEKEMA B.K., VAN PUTTEN J.P., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N., SMITH H.E. Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2004a, **72**, 691-700.
- BOEKEMA B.K., KAMP E.M., SMITS M.A., SMITH H.E., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N. Both ApxI and ApxII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 are necessary for full virulence. *Vet. Microbiol.*, 2004b, **100**, 17-23.
- BOSSE J.T., MACINNES J.I. Genetic and biochemical analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 4389-4394.
- BOSSE J.T., MACINNES J.I. Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Can. J. Vet. Res.*, 2000, **64**, 145-150.
- BOSSE J.T., GILMOUR H.D., MACINNES J.I. Novel genes affecting urease activity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 1242-1247.
- BOSSE J.T., JANSON H., SHEEHAN B.J., BEDDEK A.J., RYCROFT A.N., KROLL J.S., LANGFORD P.R. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.*, 2002, **4**, 225-235.
- BUETTNER F.F., MAAS A., GERLACH G.F. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* *arcA* deletion mutant is attenuated and deficient in biofilm formation. *Vet. Microbiol.*, 2007.
- CHANG C., MOOSER A., PLUCKTHUN A., WLODAWER A. Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 27535-27540.
- CHANG Y.F., YOUNG R., STRUCK D.K. Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *DNA*, 1989, **8**, 635-647.
- CHANG Y.F., SHI J., MA D.P., SHIN S.J., LEIN D.H. Molecular analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin-III gene cluster. *DNA Cell Biol.*, 1993, **12**, 351-362.
- CHEVALLIER B., DUGOURD D., TARASIUK K., HAREL J., GOTTSCHALK M., KOBISCH M., FREY J. Chromosome sizes and phylogenetic relationships between serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, **160**, 209-216.
- CHIN N., FREY J., CHANG C.F., CHANG Y.F. Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, **143**, 1-6.
- CHO W.S., CHAE C. Genotypic prevalence of *apxIV* in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2001, **13**, 175-177.
- CORTAJARENA A.L., GONI F.M., OSTOLAZA H. Glycophorin as a receptor for *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin in erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 12513-12519.
- CORTAJARENA A.L., GONI F.M., OSTOLAZA H. A receptor-binding region in *Escherichia coli*  $\alpha$ -haemolysin. *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 19159-19163.
- COUTTE L., ANTOINE R., DROBECQ H., LOCHT C., JACOB-DUBUISSON F. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J.*, 2001, **20**, 5040-5048.
- CRUIJSEN T.L., VAN LEENGOED L.A., DEKKER-NOOREN T.C., SCHOEVEERS E.J., VERHEIJDEN J.H. Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 4867-4871.

- CULLEN J.M., RYCROFT A.N. Phagocytosis by pig alveolar macrophages of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 mutant strains defective in haemolysin II (ApxII) and pleurotoxin (ApxIII). *Microbiology*, 1994, **140** (Pt 2), 237-244.
- DABAN M., MEDRANO A., QUEROL E. Cloning, sequencing and expression of the transferrin-binding protein 1 gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biochem. J.*, 1996, **315** (Pt 1), 257-264.
- DELEPELAIRE P., WANDERSMAN C. Protein secretion in gram-negative bacteria. The extracellular metalloprotease B from *Erwinia chrysanthemi* contains a C-terminal secretion signal analogous to that of *Escherichia coli* alpha-hemolysin. *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 17118-17125.
- DENEER H.G., POTTER A.A. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1989, **57**, 798-804.
- DESLANDES V., NASH J.H., HAREL J., COULTON J.W., JACQUES M. Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* under iron-restricted conditions. *BMC Genomics*, 2007, **8**, 72.
- DIARRA M.S., DOLENCE J.A., DOLENCE E.K., DARWISH I., MILLER M.J., MALOUIN F., JACQUES M. Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 853-859.
- DILEEPAN T., KANNAN M.S., WALCHECK B., THUMBIKAT P., MAHESWARAN S.K. Mapping of the binding site for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin within bovine CD18. *Infect. Immun.*, 2005a, **73**, 5233-5237.
- DILEEPAN T., THUMBIKAT P., WALCHECK B., KANNAN M.S., MAHESWARAN S.K. Recombinant expression of bovine LFA-1 and characterization of its role as a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Microb. Pathog.*, 2005b, **38**, 249-257.
- DILEEPAN T., KANNAN M.S., WALCHECK B., MAHESWARAN S.K. Integrin-EGF-3 domain of bovine CD18 is critical for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin species-specific susceptibility. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007a, **274**, 67-72.
- DILEEPAN T., KACHLANY S.C., BALASHOVA N.V., PATEL J., MAHESWARAN S.K. Human CD18 is the functional receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 2007b, **75**, 4851-4856.
- DOM P., HAESEBROUCK F., DE BAETSELIER P. Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites. *Am. J. Vet. Res.*, 1992a, **53**, 1113-1118.
- DOM P., HAESEBROUCK F., KAMP E.M., SMITS M.A. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolytins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infect. Immun.*, 1992b, **60**, 4328-4334.
- DOM P., HAESEBROUCK F., KAMP E.M., SMITS M.A. NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains: production of RTX toxins and interactions with porcine phagocytes. *Vet. Microbiol.*, 1994, **39**, 205-218.
- DREYFUS A., SCHALLER A., NIVOLLET S., SEGERS R.P., KOBISCH M., MIELI L., SOERENSEN V., HUSSY D., MISEREZ R., ZIMMERMANN W., INDERBITZIN F., FREY J. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Vet. Microbiol.*, 2004, **99**, 227-238.
- ECONOMOU A., HAMILTON W.D., JOHNSTON A.W., DOWNIE J.A. The *Rhizobium* nodulation gene *nodO* encodes a Ca<sup>2+</sup>-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *EMBO J.*, 1990, **9**, 349-354.
- ENRIQUEZ-VERDUGO I., GUERRERO A.L., SERRANO J.J., GODINEZ D., ROSALES J.L., TENORIO V., DE LA GARZA M. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology*, 2004, **150**, 2391-2400.
- EUZÉBY J.P. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. [en ligne] (07/06/1998) Adresse URL : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/pleuropneumoniae.html>, consulté le 01/12/2007.
- FENWICK B.W., OSBURN B.I., OLANDER H.J. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 1433-1441.
- FREY J., NICOLET J. Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 232-236.
- FREY J., MEIER R., GYGI D., NICOLET J. Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1991a, **59**, 3026-3032.
- FREY J., DEILLON J.B., GYGI D., NICOLET J. Identification and partial characterization of the hemolysin (HlyII) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Vet. Microbiol.*, 1991b, **28**, 303-312.
- FREY J., BOSSE J.T., CHANG Y.F., CULLEN J.M., FENWICK B., GERLACH G.F., GYGI D., HAESEBROUCK F., INZANA T.J., JANSEN R., ET AL. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolytins, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.*, 1993a, **139** (Pt 8), 1723-1728.
- FREY J., BECK M., STUCKI U., NICOLET J. Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene*, 1993b, **123**, 51-58.
- FREY J., HALDIMANN A., NICOLET J., BOFFINI A., PRENTKI P. Sequence analysis and transcription of the apxI operon (hemolysin I) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene*, 1994, **142**, 97-102.

- FREY J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.*, 1995, **3**, 257-261.
- FULLER C.A., YU R., IRWIN S.W., SCHRYVERS A.B. Biochemical evidence for a conserved interaction between bacterial transferrin binding protein A and transferrin binding protein B. *Microb. Pathog.*, 1998, **24**, 75-87.
- FULLER T.E., SHEA R.J., THACKER B.J., MULKS M.H. Identification of *in vivo* induced genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Pathog.*, 1999, **27**, 311-327.
- FULLER T.E., MARTIN S., TEEL J.F., ALANIZ G.R., KENNEDY M.J., LOWERY D.E. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microb. Pathog.*, 2000, **29**, 39-51.
- GARCIA GONZALEZ O., GARCIA R.M., DE LA GARZA M., VACA S., PANIAGUA G.L., MEJIA R., TENORIO V.R., NEGRETE-ABASCAL E. *Actinobacillus pleuropneumoniae* metalloprotease: cloning and *in vivo* expression. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, **234**, 81-86.
- GARCIA-CUELLAR C., MONTANEZ C., TENORIO V., REYES-ESPARZA J., DURAN M.J., NEGRETE E., GUERRERO A., DE LA GARZA M. A 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin *in vitro*. *Can. J. Vet. Res.*, 2000, **64**, 88-95.
- GARSIDE L.H., COLLINS M., LANGFORD P.R., RYCROFT A.N. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 carrying the defined *aroA* mutation is fully avirulent in the pig. *Res. Vet. Sci.*, 2002, **72**, 163-167.
- GERLACH G.F., ANDERSON C., POTTER A.A., KLASHINSKY S., WILLSON P.J. Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 892-898.
- GONI F.M., OSTOLAZA H. *E. coli* alpha-hemolysin: a membrane-active protein toxin. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1998, **31**, 1019-1034.
- GONZALEZ G.C., CAAMANO D.L., SCHRYVERS A.B. Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 1990, **4**, 1173-1179.
- GONZALEZ G.C., YU R.H., ROSTECK P.R., JR., SCHRYVERS A.B. Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. *Microbiology*, 1995, **141** (Pt 10), 2405-2416.
- GORDON A.H., HART P.D., YOUNG M.R. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature*, 1980, **286**, 79-80.
- GREEN J., BALDWIN M.L. HlyX, the FNR homologue of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, is a [4Fe-4S]-containing oxygen-responsive transcription regulator that anaerobically activates FNR-dependent class I promoters via an enhanced AR1 contact. *Mol. Microbiol.*, 1997, **24**, 593-605.
- GYGI D., NICOLET J., HUGHES C., FREY J. Functional analysis of the Ca(2+)-regulated hemolysin I operon of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 3059-3064.
- HALL-STOODLEY L., COSTERTON J.W., STOODLEY P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, **2**, 95-108.
- HARDIE K.R., ISSARTEL J.P., KORONAKIS E., HUGHES C., KORONAKIS V. *In vitro* activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptide. *Mol. Microbiol.*, 1991, **5**, 1669-1679.
- HENDERSON I.R., NAVARRO-GARCIA F., DESVAUX M., FERNANDEZ R.C., ALA'ALDEEN D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004, **68**, 692-744.
- HENNIG I., TEUTENBERG-RIEDEL B., GERLACH G.F. Downregulation of a protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen during the course of infection. *Microb. Pathog.*, 1999, **26**, 53-63.
- HERNANZ MORAL C., CASCON SORIANO A., SANCHEZ SALAZAR M., YUGUEROS MARCOS J., SUAREZ RAMOS S., NAHARRO CARRASCO G. Molecular cloning and sequencing of the *aroA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use in a PCR assay for rapid identification. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 1575-1578.
- HIGHLANDER S.K., CHIDAMBARAM M., ENGLER M.J., WEINSTOCK G.M. DNA sequence of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin gene cluster. *DNA*, 1989, **8**, 15-28.
- HSU Y.M., CHIN N., CHANG C.F., CHANG Y.F. Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae fur* gene and its role in regulation of ApxI and AfuABC expression. *DNA Seq.*, 2003, **14**, 169-181.
- IDRIS U.E., HARMON B.G., UDEZE F.A., KADIS S. Pulmonary lesions in mice inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin and lipopolysaccharide. *Vet. Pathol.*, 1993, **30**, 234-241.
- INGHAMA., ZHANGY., PRIDEAUX C. Attenuation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by inactivation of *aroQ*. *Vet. Microbiol.*, 2002, **84**, 263-273.
- INZANA T.J., MA J., WORKMAN T., GOGOLEWSKI R.P., ANDERSON P. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 1880-1889.
- INZANA T.J., TODD J., MA J.N., VEIT H. Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. *Microb. Pathog.*, 1991, **10**, 281-296.
- INZANA T.J., TODD J., VEIT H.P. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect. Immun.*, 1993, **61**, 1682-1686.

- ISSARTEL J.P., KORONAKIS V., HUGHES C. Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature*, 1991, **351**, 759-761.
- IZANO E.A., SADOVSKAYA I., VINOGRADOV E., MULKS M.H., VELLIYAGOUNDER K., RAGUNATH C., KHER W.B., RAMASUBBU N., JABBOURI S., PERRY M.B., KAPLAN J.B. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb. Pathog.*, 2007, **43**, 1-9.
- JACOBSEN I., HENNIG-PAUKA I., BALTES N., TROST M., GERLACH G.F. Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence. *Infect. Immun.*, 2005a, **73**, 226-234.
- JACOBSEN I., GERSTENBERGER J., GRUBER A.D., BOSSE J.T., LANGFORD P.R., HENNIG-PAUKAI, MEENS J., GERLACH G.F. Deletion of the ferric uptake regulator Fur impairs the in vitro growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2005b, **73**, 3740-3744.
- JACQUES M., LABRIE J., ST MICHAEL F., COX A.D., PARADIS M.A., DICK C.P., KLOPFENSTEIN C., BROES A., FITTIPALDI N., GOTTSCHALK M. Isolation of an atypical strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 with a truncated lipopolysaccharide outer core and no O-antigen. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 3522-3525.
- JANSEN R., BRIAIRE J., KAMP E.M., SMITS M.A. Comparison of the cytolysin II genetic determinants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 630-636.
- JANSEN R., BRIAIRE J., KAMP E.M., GIELKENS A.L., SMITS M.A. Structural analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin I (ApxI) operon. *Infect. Immun.*, 1993a, **61**, 3688-3695.
- JANSEN R., BRIAIRE J., KAMP E.M., GIELKENS A.L., SMITS M.A. Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin III (ApxIII) gene. *Infect. Immun.*, 1993b, **61**, 947-954.
- JANSEN R., BRIAIRE J., VAN GEEL A.B., KAMP E.M., GIELKENS A.L., SMITS M.A. Genetic map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin (Apx) operons: characterization of the ApxIII operons. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 4411-4418.
- JANSEN R., BRIAIRE J., SMITH H.E., DOM P., HAESEBROUCK F., KAMP E.M., GIELKENS A.L., SMITS M.A. Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 27-37.
- JEANNOTTE M.E., ABUL-MILH M., DUBREUIL J.D., JACQUES M. Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to phosphatidylethanolamine. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 4657-4663.
- JENSEN A.E., BERTRAM T.A. Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, 1986, **51**, 419-424.
- JEYASEELAN S., KANNAN M.S., BRIGGS R.E., THUMBİKAT P., MAHESWARAN S.K. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 6131-6139.
- JOLIE R.A., MULKS M.H., THACKER B.J. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.*, 1994, **38**, 329-349.
- KAMP E.M., POPMA J.K., ANAKOTTA J., SMITS M.A. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 3079-3085.
- KAMP E.M., VERMEULEN T.M., SMITS M.A., HAAGSMA J. Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 4063-4065.
- KAMP E.M., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N., VAN LEENGOED L.A., SMITS M.A. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 4350-4354.
- KAPLAN J.B., VELLIYAGOUNDER K., RAGUNATH C., ROHDE H., MACK D., KNOBLOCH J.K., RAMASUBBU N. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J. Bacteriol.*, 2004, **186**, 8213-8220.
- KAPLAN J.B., MULKS M.H. Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 2005, **108**, 89-94.
- KILIAN M. The haemolytic activity of *Haemophilus* species. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]*, 1976, **84B**, 339-341.
- KIM T., LEE J. Cloning and expression of genes encoding transferrin-binding protein A and B from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Protein Expr. Purif.*, 2006, **45**, 235-240.
- KORONAKIS E., HUGHES C., MILISAV I., KORONAKIS V. Protein exporter function and *in vitro* ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol. Microbiol.*, 1995, **16**, 87-96.
- KORONAKIS V., HUGHES C., KORONAKIS E. Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both *Escherichia coli* membranes. *EMBO J.*, 1991, **10**, 3263-3272.
- KORONAKIS V., HUGHES C., KORONAKIS E. ATPase activity and ATP/ADP-induced conformational change in the soluble domain of the bacterial protein translocator HlyB. *Mol. Microbiol.*, 1993, **8**, 1163-1175.
- KORONAKIS V., LI J., KORONAKIS E., STAUFFER K. Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol. Microbiol.*, 1997, **23**, 617-626.

- KORONAKIS V., SHARFF A., KORONAKIS E., LUISI B., HUGHES C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 2000, **405**, 914-919.
- KUME K., NAKAI T., SAWATA A. Interaction between heat-stable hemolytic substance from *Haemophilus pleuropneumoniae* and porcine pulmonary macrophages in vitro. *Infect. Immun.*, 1986, **51**, 563-570.
- LABRIE J., RIOUX S., WADE M.M., CHAMPLIN F.R., HOLMAN S.C., WILSON W.W., SAVOYE C., KOBISCH M., SIROIS M., GALARNEAU C., JACQUES M. Identification of genes involved in biosynthesis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants. *J. Endotoxin. Res.*, 2002, **8**, 27-38.
- LALLY E.T., KIEBA I.R., SATO A., GREEN C.L., ROSENBLOOM J., KOROSTOFF J., WANG J.F., SHENKER B.J., ORTLEPP S., ROBINSON M.K., BILLINGS P.C. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 30463-30469.
- LANGFORD P.R., LOYNDS B.M., KROLL J.S. Cloning and molecular characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 5035-5041.
- LAWRENCE P.K., NELSON W.R., LIU W., KNOWLES D.P., FOREYT W.J., SRIKUMARAN S. beta(2) integrin Mac-1 is a receptor for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine and ovine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2008, **122**, 285-294.
- LIM K.B., WALKER C.R., GUO L., PELLETT S., SHABANOWITZ J., HUNT D.F., HEWLETT E.L., LUDWIG A., GOEBEL W., WELCH R.A., HACKETT M. *Escherichia coli* alpha-hemolysin (HlyA) is heterogeneously acylated in vivo with 14-, 15-, and 17-carbon fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 36698-36702.
- LITT D.J., PALMER H.M., BORRIELLO S.P. *Neisseria meningitidis* expressing transferrin binding proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* can utilize porcine transferrin for growth. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 550-557.
- LUDWIG A., JARCHAU T., BENZ R., GOEBEL W. The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to erythrocytes. *Mol. Gen. Genet.*, 1988, **214**, 553-561.
- LUDWIG A., SCHMID A., BENZ R., GOEBEL W. Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, **226**, 198-208.
- LUDWIG A., BENZ R., GOEBEL W. Oligomerization of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is involved in pore formation. *Mol. Gen. Genet.*, 1993, **241**, 89-96.
- LUQUE I., TARRADAS C., CARRASCO L., TORROELLA E., ARTIGAS C., PEREA A. Effectiveness of doxycycline in the prevention of an experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2000, **47**, 445-451.
- MACINNES J.I., KIM J.E., LIAN C.J., SOLTES G.A. *Actinobacillus pleuropneumoniae* hlyX gene homology with the *fnr* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1990, **172**, 4587-4592.
- MAIER E., REINHARD N., BENZ R., FREY J. Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 4415-4423.
- MARTIN P.R., MULKS M.H. Cloning and characterization of a gene encoding an antigenic membrane protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* with homology to ABC transporters. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1999, **25**, 245-254.
- MASIN J., BASLER M., KNAPP O., EL-AZAMI-EL-IDRISSI M., MAIER E., KONOPASEK I., BENZ R., LECLERC C., SEBO P. Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry*, 2005, **44**, 12759-12766.
- MAUDSLEY J.R., KADIS S. Growth and hemolysin production by *Haemophilus pleuropneumoniae* cultivated in a chemically defined medium. *Can. J. Microbiol.*, 1986, **32**, 801-805.
- MCWHINNEY D.R., CHANG Y.F., YOUNG R., STRUCK D.K. Separable domains define target cell specificities of an RTX hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 1992, **174**, 291-297.
- MEDRANO A., QUEROLE., DABAN M. Cloning and sequencing of the gene encoding the outer-membrane protein Tbp1 from *Actinobacillus pleuropneumoniae* : expression of Tbp1 and Tbp2. *Behring Inst. Mitt.*, 1997, 410-423.
- MENESTRINA G., MACKMAN N., HOLLAND I.B., BHAKDI S. *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **905**, 109-117.
- MENESTRINA G. *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism. *FEBS Lett.*, 1988, **232**, 217-220.
- MENESTRINA G., MOSER C., PELLET S., WELCH R. Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology*, 1994, **87**, 249-267.
- MENESTRINA G., ROPELE M., DALLA SERRA M., PEDERZOLLI C., HUGO F., PELLET S., WELCH R.A. Binding of antibodies to functional epitopes on the pore formed by *Escherichia coli* hemolysin in cells and model membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995a, **1238**, 72-80.
- MENESTRINA G., DALLA SERRA M., PEDERZOLLI C., BREGANTE M., GAMBALE F. Bacterial hemolysins and leukotoxins affect target cells by forming large exogenous pores into their plasma membrane: *Escherichia coli* hemolysin A as a case example. *Biosci. Rep.*, 1995b, **15**, 543-551.

- MIKAEL L.G., PAWELEK P.D., LABRIE J., SIROIS M., COULTON J.W., JACQUES M. Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (*fhu*) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 2002, **148**, 2869-2882.
- MIKAEL L.G., SRIKUMAR R., COULTON J.W., JACQUES M. *fhuA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 2911-2915.
- MILLER R.A., BRITIGAN B.E. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, **10**, 1-18.
- MOAYERI M., WELCH R.A. Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 2233-2239.
- MOECK G.S., COULTON J.W. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol. Microbiol.*, 1998, **28**, 675-681.
- NAGAI S., YAGIHASHI T., ISHIHAMA A. DNA sequence analysis of an allelic variant of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin I (ApxIA) from serotype 10. *Microb. Pathog.*, 1993, **15**, 485-495.
- NAKAHAMA K., YOSHIMURA K., MARUMOTO R., KIKUCHI M., LEE I.S., HASE T., MATSUBARA H. Cloning and sequencing of *Serratia* protease gene. *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 5843-5855.
- NAKAI T., SAWATA A., KUME K. Characterization of the hemolysin produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44**, 344-347.
- NEGRETE-ABASCAL E., TENORIO V.R., SERRANO J.J., GARCIA C., DE LA GARZA M. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.*, 1994, **58**, 83-86.
- NEGRETE-ABASCAL E., TENORIO V.R., GUERRERO A.L., GARCIA R.M., REYES M.E., DE LA GARZA M. Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Can. J. Vet. Res.*, 1998, **62**, 183-190.
- NEGRETE-ABASCAL E., GARCIA R.M., REYES M.E., GODINEZ D., DE LA GARZA M. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **191**, 109-113.
- NEGRETE-ABASCAL E., REYES M.E., GARCIA R.M., VACA S., GIRON J.A., GARCIA O., ZENTENO E., DE LA GARZA M. Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 2003, **185**, 664-668.
- NIVEN D.F., LÉVESQUE M. V-factor-dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 1988, **38**, 319-320.
- NIVEN D.F., DONGA J., ARCHIBALD F.S. Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. *Mol. Microbiol.*, 1989, **3**, 1083-1089.
- OROPEZA-WEKERLE R.L., MULLER S., BRIAND J.P., BENZ R., SCHMIDA., GOEBEL W. Haemolysin-derived synthetic peptides with pore-forming and haemolytic activity. *Mol. Microbiol.*, 1992, **6**, 115-121.
- OSICKA R., PROCHAZKOVA K., SULC M., LINHARTOVA I., HAVLICEK V., SEBO P. A novel "clip-and-link" activity of repeat in toxin (RTX) proteins from gram-negative pathogens. Covalent protein cross-linking by an Asp-Lys isopeptide bond upon calcium-dependent processing at an Asp-Pro bond. *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 24944-24956.
- OSTOLAZA H., BARTOLOME B., ORTIZ DE ZARATE I., DE LA CRUZ F., GONI F.M. Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin *alpha*-haemolysin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, **1147**, 81-88.
- OSTOLAZA H., SOLOAGA A., GONI F.M. The binding of divalent cations to *Escherichia coli alpha*-haemolysin. *Eur. J. Biochem.*, 1995, **228**, 39-44.
- OSTOLAZA H., BAKAS L., GONI F.M. Balance of electrostatic and hydrophobic interactions in the lysis of model membranes by *E. coli alpha*-haemolysin. *J. Membr. Biol.*, 1997, **158**, 137-145.
- OSWALD W., KONINE D.V., ROHDE J., GERLACH G.F. First chromosomal restriction map of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and localization of putative virulence-associated genes. *J. Bacteriol.*, 1999, **181**, 4161-4169.
- PARADIS S.E., DUBREUIL D., RIOUX S., GOTTSCHALK M., JACQUES M. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 3311-3319.
- PARADIS S.E., DUBREUIL J.D., GOTTSCHALK M., ARCHAMBAULT M., JACQUES M. Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors. *Curr. Microbiol.*, 1999, **39**, 313-3320.
- PATTISON I.H., HOWELL D.G., ELLIOT J. A *Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J. Comp. Pathol.*, 1957, **67**, 320-330.
- PAWELEK P.D., COULTON J.W. Hemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: homology modelling reveals regions of potential interactions with hemoglobin and heme. *J. Mol. Graph. Model.*, 2004, **23**, 211-221.
- PERRY M.B., ALTMAN E., BRISSON J.R., BEYNON L.M., RICHARDS J.C. Structural characteristics of the antigen capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains.

- Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.*, 1990, **4**, 299-308.
- PIJOAN C. Effect of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus pleuropneumoniae* toxins on swine alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1986, **13**, 141-149.
- PIMENTA A.L., YOUNG J., HOLLAND I.B., BLIGHT M.A. Antibody analysis of the localisation, expression and stability of HlyD, the MFP component of the *E. coli* haemolysin translocator. *Mol. Gen. Genet.*, 1999, **261**, 122-132.
- PIMENTA A.L., RACHER K., JAMIESON L., BLIGHT M.A., HOLLAND I.B. Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin. *J. Bacteriol.*, 2005, **187**, 7471-7480.
- PLATKO J.V., WILLINS D.A., CALVO J.M. The *ilvIH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. *J. Bacteriol.*, 1990, **172**, 4563-4570.
- POHL S., BERTSCHINGER H.U., FREDERIKSEN W., MANNHEIM W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1983, **33**, 510-514.
- RAMJEET M., DESLANDES V., ST MICHAEL F., COX A.D., KOBISCH M., GOTTSCHALK M., JACQUES M. Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 39104-39114.
- REIMER D., FREY J., JANSEN R., VEIT H.P., INZANA T.J. Molecular investigation of the role of ApxI and ApxII in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Microb. Pathog.*, 1995, **18**, 197-209.
- RICARD M.A., ARCHIBALD F.S., NIVEN D.F. Isolation and identification of a putative porcine transferrin receptor from *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1. *J. Gen. Microbiol.*, 1991, **137**, 2733-2740.
- RICCA E., AKER D.A., CALVO J.M. A protein that binds to the regulatory region of the *Escherichia coli* *ilvIH* operon. *J. Bacteriol.*, 1989, **171**, 1658-1664.
- RIOUX S., BEGIN C., DUBREUIL J.D., JACQUES M. Isolation and characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Curr. Microbiol.*, 1997, **35**, 139-144.
- RIOUX S., GALARNEAU C., HAREL J., FREY J., NICOLET J., KOBISCH M., DUBREUIL J.D., JACQUES M. Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Microbiol.*, 1999, **45**, 1017-1026.
- RIOUX S., GALARNEAU C., HAREL J., KOBISCH M., FREY J., GOTTSCHALK M., JACQUES M. Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb. Pathog.*, 2000, **28**, 279-289.
- RODRIGUEZ BARBOSA J.I., GUTIERREZ MARTIN C.B., TASCÓN R.I., SUAREZ J., RODRIGUEZ FERRI E.F. Evidence obtained with monoclonal antibodies that O antigen is the major antigen responsible for the cross-reactivities between serotypes 4 and 7 of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1995, **2**, 563-568.
- RODRIGUEZ BARBOSA J.I., GUTIERREZ MARTIN C.B., TASCÓN R.I., GONZALEZ O.R., MITTAL K.R., RODRIGUEZ FERRI E.F. Characterization of monoclonal antibodies that recognize common epitopes located on O antigen of lipopolysaccharide of serotypes 1, 9 and 11 of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1996, **16**, 173-181.
- ROSENDAL S., DEVENISH J., MACINNES J.I., LUMSDEN J.H., WATSON S., XUN H. Evaluation of heat-sensitive, neutrophil-toxic, and hemolytic activity of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 1053-1058.
- ROSENDAL S., MACINNES J.I. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1. *Am. J. Vet. Res.*, 1990, **51**, 711-717.
- RYCROFT A.N., CULLEN J.M. Complement resistance in *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* infection of swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1990, **51**, 1449-1453.
- RYCROFT A.N., WILLIAMS D., CULLEN J.M., MACDONALD J. The cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleurotoxin) is distinct from the haemolysin and is associated with a 120 kDa polypeptide. *J. Gen. Microbiol.*, 1991, **137**, 561-568.
- SATRAN P., NEDBALCOVA K. Prevalence of serotypes, production of Apx toxins, and antibiotic resistance in strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in the Czech Republic. *Vet. Med.*, 2002, **47**, 92-98.
- SCHALLER A., KUHN R., KUHNERT P., NICOLET J., ANDERSON T.J., MACINNES J.I., SEGERS R.P., FREY J. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 1999, **145**, 2105-2116.
- SCHULEIN R., GENTSCHEV I., MOLLENKOPF H.J., GOEBEL W. A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet.*, 1992, **234**, 155-163.
- SEAH J.N., KWANG J. Localization of linear cytotoxic and pro-apoptotic epitopes in RTX toxin ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine*, 2004, **22**, 1494-1497.
- SEBUNYA T.N., SAUNDERS J.R. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1983, **182**, 1331-1337.
- SEREBRIN S., ROSENDAL S., VALDIVIESO-GARCIA A., LITTLE P.B. Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae*. *Res. Vet. Sci.*, 1991, **50**, 18-22.
- SHAKARJI L., MIKAEL L.G., SRIKUMAR R., KOBISCH M., COULTON J.W., JACQUES M. Fhva and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their role as virulence determinants. *Can. J. Microbiol.*, 2006, **52**, 391-396.
- SHEA R.J., MULKS M.H. *ohr*, Encoding an organic hydroperoxide reductase, is an *in vivo*-induced gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 794-802.
- SHEEHAN B.J., LANGFORD P.R., RYCROFT A.N., KROLL J.S. [Cu,Zn]-Superoxide dismutase mutants of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* are unattenuated in infections of the natural host. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 4778-4781.
- SHEEHAN B.J., BOSSE J.T., BEDDEK A.J., RYCROFT A.N., KROLL J.S., LANGFORD P.R. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 3960-3970.
- SMITS M.A., BRIAIRE J., JANSEN R., SMITH H.E., KAMP E.M., GIELKENS A.L. Cytolysins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 4497-4504.
- SOLOAGA A., VEIGA M.P., GARCIA-SEGURA L.M., OSTOLAZA H., BRASSEUR R., GONI F.M. Insertion of *Escherichia coli*  $\alpha$ -haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol. Microbiol.*, 1999, **31**, 1013-1024.
- SRIKUMAR R., MIKAEL L.G., PAWELEK P.D., KHAMESSAN A., GIBBS B.F., JACQUES M., COULTON J.W. Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 2004, **150**, 1723-1734.
- ST GEME J.W., 3RD, CUTTER D., BARENKAMP S.J. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 6281-6287.
- STANLEY P., PACKMAN L.C., KORONAKIS V., HUGHES C. Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science*, 1994, **266**, 1992-1996.
- STANLEY P., KORONAKIS V., HUGHES C. Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, **62**, 309-333.
- STENBAEK E.I., HOVIND-HAUGEN K. Detection of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 lipopolysaccharide (LPS) variant. *Vet. Microbiol.*, 1996, **52**, 285-292.
- STEVENSON A., MACDONALD J., ROBERTS M. Cloning and characterisation of type 4 fimbrial genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 2003, **92**, 121-134.
- STINE D.L., HUETHER M.J., MOXLEY R.A., SRIKUMARAN S. *Actinobacillus pleuropneumoniae*-induced thymic lesions in mice and pigs. *Infect. Immun.*, 1991, **59**, 2885-2891.
- SUTHERLAND I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 2001, **147**, 3-9.
- TARIGAN S., SLOCOMBE R.F., BROWNING G.F., KIMPTON W. Functional and structural changes of porcine alveolar macrophages induced by sublytic doses of a heat-labile, hemolytic, cytotoxic substance produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55**, 1548-1557.
- TASCON CABRERO R.I., VAZQUEZ-BOLAND J.A., GUTIERREZ C.B., RODRIGUEZ-BARBOSA J.I., RODRIGUEZ-FERRI E.F. *Actinobacillus pleuropneumoniae* does not require urease activity to produce acute swine pleuropneumonia. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, **148**, 53-57.
- TASCON R.I., VAZQUEZ-BOLAND J.A., GUTIERREZ-MARTIN C.B., RODRIGUEZ-BARBOSA I., RODRIGUEZ-FERRI E.F. The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol. Microbiol.*, 1994, **14**, 207-216.
- THANABALU T., KORONAKIS E., HUGHES C., KORONAKIS V. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.*, 1998, **17**, 6487-6496.
- THOMPSON S.A., WANG L.L., WEST A., SPARLING P.F. *Neisseria meningitidis* produces iron-regulated proteins related to the RTX family of exoproteins. *J. Bacteriol.*, 1993, **175**, 811-818.
- THWAITES R.N., KADIS S. Purification of surface-exposed integral outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their role in opsonophagocytosis. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 1462-1470.
- TONPITAKW., THIEDES., OSWALD W., BALTES N., GERLACH G.F. *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport: a set of *exbBD* genes is transcriptionally linked to the *tbpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 1164-1170.
- TRENT M.S., WORSHAM L.M., ERNST-FONBERG M.L. The biochemistry of hemolysin toxin activation: characterization of HlyC, an internal protein acyltransferase. *Biochemistry*, 1998, **37**, 4644-4652.
- TU A.H., HAUSLER C., YOUNG R., STRUCK D.K. Differential expression of the cytotoxic and hemolytic activities of the ApxIIA toxin from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 2119-2121.
- UDEZE F.A., LATIMER K.S., KADIS S. Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 1987, **48**, 768-773.
- UDEZE F.A., KADIS S. Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin on porcine neutrophil function. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 1558-1567.

- UTRERA V., PIJOAN C. Fimbriae in *A. pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet. Rec.*, 1991, **128**, 357-358.
- VAN DE KERKHOFF A., HAESEBROUCK F., CHIERS K., DUCATELLE R., KAMP E.M., SMITS M.A. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 3905-3907.
- VAN LEENGOED L.A., KAMP E.M., POL J.M. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* to porcine lung macrophages. *Vet. Microbiol.*, 1989, **19**, 337-349.
- VAN LEENGOED L.A., DICKERSON H.W. Influence of calcium on secretion and activity of the cytolytins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 353-359.
- VERZA G., BAKAS L. Location of tryptophan residues in free and membrane bound *Escherichia coli* alpha-hemolysin and their role on the lytic membrane properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1464**, 27-34.
- WAGNER T.K., MULKS M.H. A subset of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in vivo induced promoters respond to branched-chain amino acid limitation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2006, **48**, 192-204.
- WAGNER T.K., MULKS M.H. Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* leucine-responsive regulatory protein and its involvement in the regulation of in vivo-induced genes. *Infect. Immun.*, 2007, **75**, 91-103.
- WANDERSMAN C., DELEPELAIRE P. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 4776-4780.
- WANG R.C., SEROR S.J., BLIGHT M., PRATT J.M., BROOME-SMITH J.K., HOLLAND I.B. Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. *J. Mol. Biol.*, 1991, **217**, 441-454.
- WARD C.K., INZANA T.J. Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 1994, **153**, 2110-2121.
- WARD C.K., LAWRENCE M.L., VEIT H.P., INZANA T.J. Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 3326-3336.
- WELCH R.A. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2001, **257**, 85-111.
- WILKE M., FRANZ B., GERLACH G.F. Characterization of a large transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B*, 1997, **44**, 73-86.
- ZAITSEVA J., JENEWEIN S., OSWALD C., JUMPERTZ T., HOLLAND I.B., SCHMITT L. A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, **33**, 990-995.
- ZECCHINON L., FETT T., DESMECHT D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet. Res.*, 2005, **36**, 133-156.
- 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.*, 2000, **189**, 15-18.