

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

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

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

**PAR  
KARINE DE CARUFEL**

**MUTAGENÈSE PAR LA TECHNOLOGIE DU TRANSPOSOME  
CHEZ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE***

**Avril 2008**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les gens avec lesquels j'ai travaillé durant la réalisation de mes travaux de maîtrise:

Le Dr. Marc Sirois

L'équipe du laboratoire, Valérie Ouellet, Vincent Roy, Jean-François Schmouth, Kim Després, Annet Lavallée, Marie-Édith Nepveu-Traversy et Jean-François Vermette

L'équipe du laboratoire du Dr. Éric Asselin

L'équipe du laboratoire du Dr. Marc Beauregard

L'équipe du laboratoire du Dr. Carlos Reyes-Moreno

Et j'ai une pensée toute spéciale à ceux qui ont été là pour moi tout au long de ma maîtrise et qui m'ont aidé chacun à leur manière à me réaliser pleinement:

Mon conjoint Sylvain

Mon fils Raphaël

Mes parents

Et mon grand ami que j'ai eu le plaisir et la chance de connaître durant mon baccalauréat en biochimie, David Joly

Merci à vous tous!

## RESUME

La pleuropneumonie porcine est une maladie qui engendre d'importantes pertes économiques dans l'industrie de l'élevage de porc. Cette maladie est causée par la bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'infection et une des façons de lutter efficacement contre cette maladie est d'étudier les gènes de virulence de la bactérie. La mutagenèse aléatoire par transposition constitue l'approche expérimentale utilisée dans cette étude pour déterminer les facteurs de virulence chez App. Cette méthode permet de connaître indirectement la fonction du gène interrompu par l'insertion du transposon. Un gène interrompu implique une fonction perdue. L'obtention de plusieurs mutants portant le transposon à des endroits différents est souhaitable pour une plus large analyse du génome de la bactérie. Dans un premier temps, nous avons testé le transposon commercial EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2> de la compagnie Epicentre ayant une résistance à la kanamycine. Nous pensions obtenir des mutants spontanés chez App avec la kanamycine. C'est pourquoi, nous avons construit un transposon sur mesure possédant une autre résistance à un antibiotique, la tétracycline. Cependant, seulement 6 mutants ont été obtenus en 3 essais avec le transposon commercial dont 4 ont été caractérisés par séquençage. Bien que les résultats soient insuffisants, il ne semble pas avoir de sites préférentiels «hot-spots» mais peut-être une tendance du transposon à s'insérer dans l'ARN ribosomiale 16S et 23S. Alors, contrairement aux appréhensions du départ, il y a peu de mutants spontanés mais les mutants de transposition sont peu nombreux avec EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2>. Ensuite, le transposon construit portant une résistance chromosomique à la tétracycline (tet<sup>R</sup>) et une mutation au site *Sau3AI* a été testé chez App. Le transposon désigné AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> s'est avéré beaucoup plus efficace que le transposon commercial. Nous avons obtenu 114 colonies sur milieu sélectif dont seulement 13 ne semblaient pas avoir le transposon lorsque testés par détection PCR. L'ADN de 42 mutants ayant intégré le transposon à l'intérieur de leur génome ont été séquencés. Après analyse, 34 mutants montraient des sites d'insertion (répétition directe de 9 pbs) différents et 30 mutants portaient une mutation dans des gènes ayant une fonction différente. Somme toute, le

transposon AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> permet l'analyse de plus de gènes différents par son nombre plus important de mutants par rapport au transposon EZ-Tn5<R6K<sub>γ</sub>ori/KAN-2> original de la compagnie Epicentre. Finalement, 59 mutants restant ayant le transposon construit seront à analyser par séquençage et éventuellement, ils pourront servir à élaborer la banque de mutants nécessaire à l'étude des gènes de la bactérie.

**Mots clés :** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, facteurs de virulence, mutagenèse, transposon, mutants, génomique.

## **IMPLICATION DES AUTEURS DANS L'ARTICLE SCIENTIFIQUE**

J'ai réalisé la majeure partie des travaux de laboratoire mentionnés dans ce document. J'ai également procédé à la rédaction de l'article scientifique sous la supervision de mon directeur de maîtrise, le Dr Marc Sirois.

Jean-François Schmouth, dans le cadre de son projet de fin d'études du baccalauréat en biochimie, a amorcé ce projet de transposition chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Kim Després a aussi participé à des travaux préliminaires concernant la construction du transposon.

Le Dr. Marc Sirois a été le directeur et superviseur des travaux de laboratoire et il a également participé à la rédaction de l'article scientifique dans le but de le soumettre à la revue «BMC Microbiology».

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>II</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>III</b>
<b>IMPLICATION DES AUTEURS DANS L'ARTICLE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>XII</b>
<b>CHAPITRE I INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 La pleuropneumonie porcine .....	1
1.2 La bactérie : <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	2
1.3 Les facteurs de virulence .....	3
1.3.1 Les polysaccharides de surface .....	4
1.3.2 Les fimbriaes .....	5
1.3.3 Les toxines Apx.....	5
1.3.4 Les systèmes d'acquisition du fer.....	6
1.3.5 Les autres facteurs de virulence .....	7
1.4 L'identification des facteurs de virulence par mutagenèse.....	8
1.4.1 Le principe .....	8
1.4.2 Mutagenèse dirigée.....	9
1.4.3 Mutagenèse aléatoire .....	9
<b>CHAPITRE II LA TRANSPOSITION .....</b>	<b>11</b>
2.1 Introduction à la transposition.....	11
2.1.1 Les séquences d'insertion (IS) .....	11
2.1.2 Les transposons composites (Tn) .....	12
2.1.3 La transposition réplivative .....	13
2.1.4 La transposition non-réplivative.....	14
2.2 La transposition chez <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	14

<b>CHAPITRE III LA TRANSPOSITION PAR LA TECHNIQUE</b>	
<b>TRANSPOSOME.....</b>	<b>16</b>
3.1 Le principe .....	16
3.2 La technique.....	17
3.2.1 Le transposome.....	17
3.2.2 L'électroporation .....	18
3.2.3 Construction d'une banque de clones .....	19
3.2.4 Identification du gène muté.....	19
3.2.5 Essaie de pathogénicité.....	21
<b>CHAPITRE IV PROBLEMATIQUE.....</b>	<b>23</b>
4.1 Les hypothèses de recherche.....	24
4.2 Les objectifs .....	24
<b>CHAPITRE V ARTICLE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>26</b>
5.1 Construction of a Transposome System for Mutagenesis in <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	26
5.2 Résumé .....	27
5.3 Abstract.....	28
5.4 Background.....	30
5.5 Methods .....	31
5.5.1 Bacterial strains and plasmids.....	31
5.5.2 Growth conditions and media .....	31
5.5.3 DNA techniques .....	32
5.5.4 Preparation of electrocompetent <i>A. pleuropneumoniae</i> cells and electroporation protocol.....	32
5.5.5 Identification of transposition mutants.....	33
5.6 Results.....	33
5.6.1 Construction of the AppTet <sup>R</sup> EZ Tn5 .....	33
5.6.2 Transposition in <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	34
5.6.3 Identification of disrupted genes.....	35
5.7 Discussion.....	36



5.8	Author's contribution .....	37
5.9	Acknowledgments .....	37
5.10	References .....	38
5.11	Figure legends .....	41
<b>CHAPITRE VI DISCUSSION .....</b>		<b>46</b>
6.1	Transposition avec le transposon EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2> .....	46
6.1.1	Efficacité du transposon EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2> .....	46
6.2	Séquençage des mutants EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2> .....	47
6.3	Mutagenèse par transposition avec le transposon sur mesure AppEZ-Tn5 tet <sup>R</sup> .....	48
6.3.1	Efficacité du transposon AppEZ-Tn5 tet <sup>R</sup> .....	49
6.4	Séquençage des mutants AppEZ-Tn5 tet <sup>R</sup> .....	50
6.4.1	Premier essai de transposition .....	50
6.4.2	Deuxième essai de transposition .....	52
6.5	Limite de la technique .....	54
6.6	Perspective de recherche .....	54
<b>CHAPITRE VII CONCLUSION .....</b>		<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>58</b>

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1: Principaux facteurs de virulence au niveau de la membrane d'App et éléments libérés par la cellule lors de l'infection (5). ..... 3
- Figure 1.2: A) La molécule LPS montrant les 3 parties i) l'antigène-O ii) le corps oligosaccharide central contenant le Kdo et iii) la partie ancrée à la membrane le lipide A. B) image de la molécule LPS montrant sa position avec la membrane et l'eau environnant. Tirée de: <http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/> ..... 4
- Figure 2.1: Insertion du transposon. L'ADN cible est coupé de manière à obtenir des bouts cohésifs (intercalés). Ensuite, le transposon à l'aide de la transposase se lie à l'ADN simple brin et finalement, l'ADN polymérase comble l'autre brin de l'extrémité 5'→3' ..... 12
- Figure 3.1: Transposition aléatoire de EZ-Tn5 à l'aide de la transposase et répétitions directes de 9 pb de chaque côté du site insertion. Tirée de: <http://www.epibio.com/pdftechlit/169pl047.pdf> ..... 17
- Figure 3.2: Le transposome : L'ADN du transposon en mauve lié à la transposase dimérique. (un monomère orange et l'autre en jaune). Tirée de : Hoffman, L and Jendrisak, J, Epicentre Forum 6(3) :1,1999 ..... 18
- Figure 3.3: La transposase EZ-Tn5 reconnaît spécifiquement les ME du transposon EZ-Tn5. La formation du complexe transposome se fait exclusivement en absence de  $Mg^{+2}$ . Tirée de : [http://www.epibio.com/intro\\_selection\\_guide\\_invivo\\_transposomics.a.sp](http://www.epibio.com/intro_selection_guide_invivo_transposomics.a.sp) ..... 18
- Figure 3.4: Transposition par la technique du transposome. Électroporation du transposome dans la bactérie à muter, récupération des mutants ayant le transposomes et analyse de ceux-ci. Tirée de : [http://www.epibio.com/intro\\_selection\\_guide\\_invivo\\_transposomics.a.sp](http://www.epibio.com/intro_selection_guide_invivo_transposomics.a.sp) ..... 20

Figure 3.5: Digestion de l'ADN génomique du mutant, ligation de l'ADN digéré et récupération des ADN circulaires contenant le transposon. Tirée de : <a href="http://www.epibio.com/pdftechlit/155p1047.pdf">http://www.epibio.com/pdftechlit/155p1047.pdf</a> .....	21
Figure 5.1: Scheme of the transposome AppEZ-Tn5 tet <sup>R</sup> organization .....	41

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Les toxines Apx secrétées par les différents sérotypes d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	6
Table 5.1: Primers used in this work.....	42
Table 5.2: Sequencing result of the transposon mutant.....	43
Tableau 6.1: Site d'insertion et localisation de la mutation pour chaque mutant .....	48
Tableau 6.2 : Résultats de séquençage des mutants obtenus au premier essai de transposition.....	51

## LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
App	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
CAMP	Une hémolyse coopérative avec la beta-hémolytique de <i>Staphylococcus aureus</i>
CPS	Polysaccharides capsulaires
Plasmide F	Facteur de sexualité ou de fertilité
HfIK	High féquency of lysogenation
IS	Séquences d'insertion
kan <sup>R</sup>	Gène de résistance à la kanamycine
Kdo	Acide 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonique
LPS	Lipopolysaccharides de surface
ME	Mosaic end (répétition inversée)
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide ou facteur 5
OMP	Outer Membrane Protein (protéines de membrane externe)
PCR	Polymerase chain reaction

RTX	Repeats in toxin
Sod	Superoxides dismutase
STM	Signature-tag mutagenesis
Tet <sup>R</sup>	Gène de résistance à la tétracycline
Tn	Transposon composite
TBPs	Transferrin-binding protein

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1 La pleuropneumonie porcine

Globalement, l'industrie de l'élevage est très vulnérable par rapport aux infections microbiennes. Plusieurs bactéries sont responsables de maladies ravageuses nuisant à l'industrie telles que *Pasteurella multocida* causant le choléra de la volaille, *Pasteurella haemolytica* engendrant la pneumonie chez le mouton, entre autres, et finalement, *Actinobacillus pleuropneumoniae* provoquant la pleuropneumonie porcine. D'ailleurs, la pleuropneumonie porcine a provoqué de sévères pertes dans l'industrie de l'élevage et de l'alimentation au Canada et partout à travers le monde. Alors, l'étude de la bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) est d'intérêt mondial au niveau de la santé animale et de l'économie de l'industrie porcine.

App est un parasite obligatoire de l'appareil respiratoire porcine. Il ne survit pas longtemps dans l'environnement; ainsi, la transmission de la maladie se fait par contact direct avec un porc infecté ou par les aérosols dans l'air (1). De plus, la bactérie semble affecter spécifiquement le porc. La pleuropneumonie survient chez les porcs de tous âges mais le stress semble être un facteur qui augmente l'incidence de la maladie (2). Dépendamment du sérotype, de l'immunité du porc et du nombre de bactéries, l'infection peut être aiguë, suraiguë et chronique. Les deux premières présentent plusieurs ou tous les signes cliniques suivant : une forte fièvre, une diminution de la fréquence de respiration, une anorexie, des vomissements, diarrhée et une détresse respiratoire (3). Les derniers signes avant la mort sont les hémorragies provenant des lésions pulmonaires se manifestant au niveau de la bouche et du nez.

Présentement, les cas de pneumonie par *Actinobacillus pleuropneumoniae* sont traités par antibiotiques. Évidemment, il serait préférable d'agir au niveau de la prévention. Il n'existe pas encore de vaccin efficace capable d'induire une réaction

immunitaire suffisante afin de prévenir des infections chez le porc (4). Puisque plusieurs éléments sont impliqués dans l'infection et qu'il existe plusieurs sérotypes de la bactérie, il est difficile d'induire artificiellement une réponse immunitaire protectrice contre l'ensemble des sérotypes (5). C'est pourquoi il est important d'étudier la bactérie et les facteurs de virulence dans le but ultime de comprendre les mécanismes de virulence de cette bactérie et d'établir des méthodes d'analyse génomique afin d'avoir les outils pour la combattre.

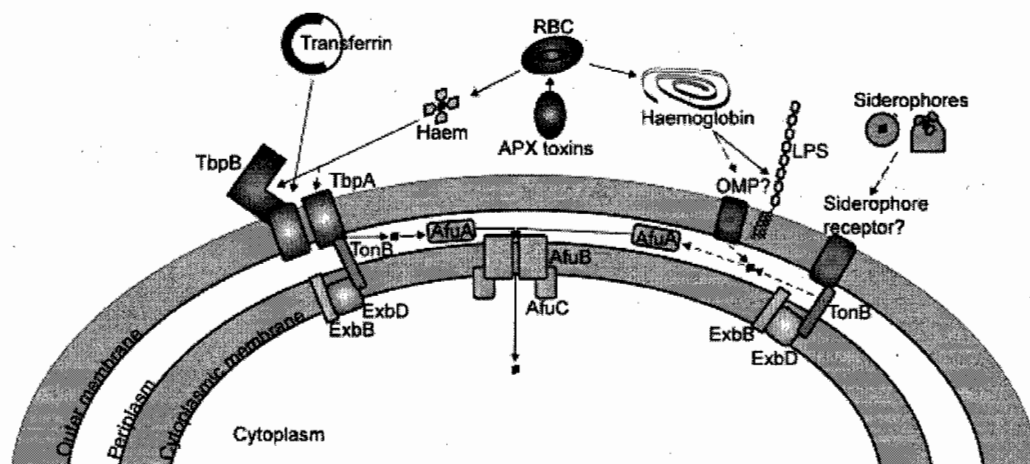
## 1.2 La bactérie : *Actinobacillus pleuropneumoniae*

*Actinobacillus pleuropneumoniae*, est un petit coccobacille capsulé immobile, Gram négatif et non sporulé de la famille des *Pasterellaceae* (6). Il existe 2 biotypes : un NAD (nicotinamide adénine dinucléotide ou facteur V) dépendant et un autre NAD indépendant car il peut produire son propre NAD en présence de nucléotides pyrimidines ou leurs précurseurs (7). Le biotype I comprend les sérotypes 1 à 12 et 15 et les sérotypes 13 et 14 font partie du biotype II (8). Les sérotypes, eux, se différencient par leur surface de polysaccharides antigéniques. Les sérotypes 1 et 5 ont chacun 2 sous-catégories, 1a et 1b, et 5a et 5b respectivement, qui se différencient par des variantes mineures au niveau des structures de polysaccharides (9). C'est d'ailleurs les sérotypes 1, 5 et 7 qui sont prédominants au Canada tandis que le sérotype 2 se retrouve principalement dans les pays européens (10). De plus, il est à noter que tous les sérotypes sont hémolytiques et produisent une hémolyse coopérative (réactions «CAMP») avec la beta-hémolytique de *Staphylococcus aureus* en plus de produire l'uréase. Finalement, tous les sérotypes causent la même maladie mais certains sont plus virulents que d'autres. Les sérotypes appartenant au biotype I semblent plus virulents que ceux du biotype II. La différence de virulence entre les sérotypes est attribuée à la production de certains facteurs de virulence de types différents selon le sérotype. Les facteurs de virulence sont très importants dans l'étude de la bactérie et plusieurs ont été répertoriés jusqu'à présent.



### 1.3 Les facteurs de virulence

Plusieurs protéines de surface intervenant directement ou indirectement dans la virulence d'App ont été découvertes à travers quelques études. Quelques-unes sont illustrées sur la figure 1.1. Il y a tout d'abord les lipopolysaccharides de surface (LPS) qui ont un rôle dans l'adhérence. Puis, il y a les toxines Apx qui ont un rôle hémolytique permettant la libération de l'hème et de l'hémoglobine provenant de l'hôte. Ainsi, le système d'acquisition de fer entre en jeu afin de récupérer le fer nécessaire à l'implantation de la bactérie chez l'hôte par l'entremise des protéines de membrane externe (OMP) liant l'hémoglobine et les protéines liant les transferrines porcines (TBPs) et les sidérophores bactériens.

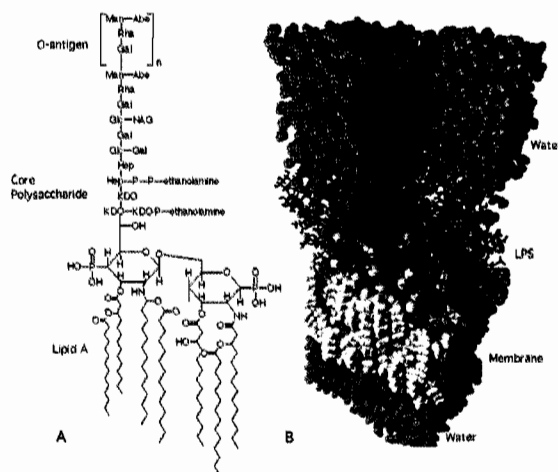


**Figure 1.1: Principaux facteurs de virulence au niveau de la membrane d'App et éléments libérés par la cellule lors de l'infection (5).**

Il y a évidemment d'autres facteurs intervenant dans l'infection qui ne sont pas illustrés dans la figure précédente tels que les superoxydes dismutases, l'enzyme uréase et les fimbriaes. Les différents facteurs sont décrits plus en détail lors des prochaines sections.

### 1.3.1 Les polysaccharides de surface

Les LPS et les polysaccharides capsulaires (CPS) se retrouvent en surface de la bactérie et jouent un rôle important dans la virulence. Tout d'abord, les LPS sont responsables de l'adhérence de la bactérie aux cellules du tractus respiratoire du porc (11) et jouent aussi un rôle dans la stimulation du système immunitaire de l'hôte. Les LPS sont divisés en 3 régions: le lipide A, l'oligosaccharide central contenant l'acide 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo) et des résidus heptoses; l'antigène O, un polysaccharide contenant des unités répétitives (voir figure 1.2) (12)



**Figure 1.2: A) La molécule LPS montrant les 3 parties i) l'antigène-O ii) le corps oligosaccharide central contenant le Kdo et iii) la partie ancrée à la membrane le lipide A. B) image de la molécule LPS montrant sa position avec la membrane et l'eau environnant. Tirée de: <http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/>**

Pour ce qui est des CPS de surface, ils permettent aux bactéries d'adhérer aux cellules respiratoires du porc et surtout, ils constituent la capsule protectrice contre la phagocytose. Ainsi, la surface de polysaccharides donne le caractère virulent de la bactérie par sa contribution à l'implantation et la résistance de celle-ci chez l'hôte.

### 1.3.2 Les fimbriaes

Tout comme les LPS, les fimbriaes sont impliqués dans l'adhérence des bactéries à l'hôte mais également de l'adhérence des bactéries entre-elles. Plusieurs types de pathogènes possèdent des fimbriaes et il est établi que ceux-ci ont un rôle dans l'adhérence de la bactérie à l'hôte (13). Alors, les fimbriaes sont considérés comme facteurs de virulence. Jusqu'à présent, les sérotypes 1, 2, 7 et 12 possèdent des fimbriaes car ils ont été purifiés (14). Cependant, il n'est pas établi que les autres sérotypes n'en possèdent pas. Par ailleurs, les fimbriaes sont exprimés dans des conditions *in vivo* de croissance donc semblent importants lors de l'implantation de la bactérie dans le système respiratoire du porc (15).

### 1.3.3 Les toxines Apx

*Actinobacillus pleuropneumoniae* sécrète aussi des toxines qui peuvent être des protéases nécrosantes ou des toxines hémolytiques et cytotoxiques de type RTX «Repeats in ToXin», les toxines Apx. Les RTX contiennent des répétitions de nonapeptides riches en glycines qui sont activées par acylation. Les RTX (ApxI à ApxIV) provoquent non seulement des perforations de la membrane cellulaire des cellules phagocytaires, mais ils engendrent également une bouffée oxydative à l'intérieur de celle-ci, ce qui la détruit (16). Bien que les différents sérotypes se différencient par leur surface polysaccharide, ils diffèrent également au niveau des combinaisons de toxines libérées (voir tableau 1.1). Le degré de virulence du sérotype varie selon les toxines Apx sécrétées. Les sérotypes les plus virulents étant ceux sécrétant les toxines Apx I et Apx II tels que les sérotypes 1 et 5 retrouvés notamment au Québec (16). La toxine Apx IV, quant à elle, se retrouve chez tous les sérotypes.

**Tableau 1.1: Les toxines Apx sécrétées par les différents sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae***

Toxines	Activité		Sérotypes
	Hémolytique	cytotoxique	
ApxI	forte	forte	1, 5a, 5b, 9, 10, 11
ApxII	faible	modérée	Tous sauf 10
ApxIII	aucune	forte	2, 3, 4, 6, 8
ApxIV	faible	ND <sup>a</sup>	Tous

Les informations du tableau proviennent de J.T. Bossé et al. 2002

<sup>a</sup> non déterminée

Finalement, le rôle principal des toxines Apx est de détruire les cellules sanguines du porc, ce qui permet la libération de l'hémoglobine et l'hème de l'hôte. Ainsi, le fer peut être récupéré par le système d'acquisition du fer.

#### 1.3.4 Les systèmes d'acquisition du fer

La capacité d'un pathogène à s'établir dans l'organisme hôte dépend en grande partie de sa capacité d'acquérir ses éléments essentiels dans son environnement. Le fer est un élément essentiel à la survie et à l'implantation de l'organisme pathogène chez l'hôte.

Les protéines liant les transférines («Transferrin-binding protein»: Tbps) sont souvent impliquées dans l'importation du fer contenu dans les transferrines, l'hémoglobine de l'hôte ou des sidérophores microbiens (voir figure 1.1). Ce système de transport comporte deux protéines périphériques avec la protéine TbpA d'environ 100 kDa et la lipoprotéine TbpB d'environ 60 kDa associées au système de transfert membranaire interne TonB-ExbB-ExbD utilisant le gradient de protons (17). La partie TbpB varie dépendamment du sérotype, ce qui induit une réponse immunitaire spécifique au sérotype (18). Finalement, les Tbps apportent la spécificité à l'infection car elles se lient uniquement aux transférines porcines.

Les protéines liant l'hémoglobine, une de 75-kDa et l'autre de 105-kDa, sont des OMPs «Outer Membrane Protein» très utiles pour l'apport en fer provenant de l'hémoglobine de l'hôte. En milieu restreint en fer, la première lie l'hème et l'autre semble être une protéine liant l'hémoglobine HgBA, étant donné la haute homologie avec ce type de protéines chez les *Pasteurellaceae* (19).

Chez plusieurs bactéries, il existe un opéron codant pour des protéines du système d'acquisition de l'hydroxamate ferrique dont quatre gènes sont identifiés: *fhuC*, *fhuD*, *fhuB* et *fhuA*. L'expression de ce système n'est pas régulée par le fer (20). Le gène *fhuA* code pour un OMP FhuA de 77-kDa, le récepteur de ferrichrome, tandis que le gène *fhuD* code pour une protéine périplasmique de 35,6-kDa responsable de la translocation de l'hydroxamate ferrique de la membrane interne à la membrane externe. Pour terminer, les protéines FhuC (28,5-kDa) et FhuB (69,4 kDa) sont associées à la membrane cytoplasmique et impliquées au niveau du système de transport ABC de l'hydroxamate ferrique. Les sérotypes 1 à 12 d'App semblent avoir les 4 gènes *fhu* lorsque testés positifs par PCR et par transfert Southern (21). Plus particulièrement, le gène *fhuA* s'exprime *in vivo* par App et la protéine générée prend le fer nécessaire à la cellule spécifiquement au niveau des ferrichromes (20).

Finalement, les protéines impliquées dans l'importation du fer à la bactérie sont des facteurs de virulence indirects car elles permettent à la bactérie de s'établir chez l'hôte et ainsi créer l'infection.

### 1.3.5 Les autres facteurs de virulence

En plus des CPS et LPS, les superoxydes dismutases (Sod), l'ammoniac et les protéines liées au stress sont des facteurs permettant la survie de la bactérie en présence des macrophages de l'hôte. En ce qui concerne, les superoxydes dismutases, elles agissent plus particulièrement au niveau des radicaux superoxydes libérés par les neutrophiles et les macrophages (22). Elles transforment ces radicaux en peroxyde

d'hydrogène et ensuite, la catalase le transforme en eau. Chez *App*, la protéine périplasmique SodC a un rôle dans la dismutation des radicaux superoxydes mais lorsque le gène *sodC* est muté, le mutant demeure pathogène (23). Cela suggère que les superoxydes dimutases ont un rôle dans la virulence mais ne sont pas essentiels à l'infection. Par contre, l'uréase semble être très importante dans l'implantation de l'infection. En fait, l'enzyme transforme l'urée en ammoniac et ce dernier inhibe la fusion des phagosomes-lysosomes et augmente le pH des lysosomes à l'intérieure des macrophages. Cela a pour effet de diminuer l'activité de l'acide hydrolase qui dégrade, normalement à pH acide, les composants cellulaires glucidiques, lipidiques, protéiques ou les acides nucléiques (24). De plus, les macrophages causent un stress chez le pathogène qui engendre une production de protéines telles que DnaK qui sont impliquées dans un système de chaperonnes. Ce système est impliqué dans la conservation des protéines dans leur conformation originale empêchant ainsi la dégradation des protéines bactériennes et permettant de ce fait, la survie de la bactérie (25). Finalement, des protéases ont été mises en évidence pour leur rôle dans la dégradation des immunoglobulines IgA et IgG provenant de l'immunité du porc (26).

## **1.4 L'identification des facteurs de virulence par mutagenèse**

### **1.4.1 Le principe**

Il existe plusieurs techniques utiles pour vérifier le degré d'implication d'un gène dans la virulence. La mutagenèse est une technique utilisée qui nous permet de façon indirecte de trouver la fonction d'un gène et plus particulièrement leur rôle dans la virulence bactérienne. Plusieurs gènes de virulences sont connus, la mutagenèse permet d'en mettre d'autres en évidence.

Les organismes montrent, de façon naturelle dans l'environnement, peu de variation dans le génome. Les variations sont souvent le fruit de recombinaisons homologues qui permettent l'échange d'allèles sans toutefois réorganiser le génome. D'autres sources de variations proviennent de l'environnement, tels que les virus et les

plasmides (ADN circulaire autonome) ou de séquences d'ADN linéaire qui se déplace de façon autonome dans le génome (transposon).

D'ailleurs, des méthodes de laboratoire se sont inspirées de ces mutations naturelles bactériennes afin de créer volontairement des mutations chez les bactéries à des endroits déterminés ou à des endroits aléatoires. Cette technologie repose sur un principe simple; il s'agit de muter un gène pour empêcher son expression donc, abolir sa fonction. Ainsi, nous pouvons établir la fonction du gène en déterminant la fonction perdue par le mutant créé.

#### **1.4.2 Mutagenèse dirigée**

La mutagenèse dirigée est une mutation qui vise un gène connu qu'on veut étudier. Souvent, avec les bactéries, le mode de mutation utilisé est la conjugaison. Cette dernière est basée sur la recombinaison homologue donc dirigée dans le génome bactérien par reconnaissance de séquences. Ce processus naturel est sexuel et nécessite un contact préalable entre bactéries de sexe différent : une bactérie « mâle », la bactérie donatrice et une bactérie « femelle », réceptrice. Le mâle possède le plasmide F (facteur de sexualité ou de fertilité) qui lui permet de synthétiser des pilis sexuels et de donner la polarité au chromosome. Par la suite, l'ADN simple brin s'intègre à l'endroit précis où se retrouve la séquence homologue correspondant au gène à muter. Le transfert d'ADN chromosomique est à sens unique, orienté, progressif et quelquefois total. Expérimentalement, ce processus peut être possible à l'aide d'un plasmide et de souches possédant le gène F conférant la capacité de transférer du matériel génétique à l'aide d'un pili.

#### **1.4.3 Mutagenèse aléatoire**

La mutagenèse aléatoire, quant à elle, implique la mutation d'un gène inconnu ciblé au hasard. Ce type de mutation permet d'étudier des nouveaux gènes susceptibles

d'avoir une fonction de virulence. L'étude des mutants engendrés par ce genre de méthode peut révéler, de façon indirecte, des gènes impliqués dans l'infection. Autrement dit, un mutant ayant perdu sa virulence porte une mutation au niveau d'un gène important pour son pouvoir infectieux. La transposition est la méthode de mutagenèse aléatoire la plus appropriée pour l'étude de bactéries. C'est un outil remarquable pour caractériser et manipuler un génome bactérien. Elle nous permet d'interrompre un gène, de l'identifier et de le caractériser. Il existe plusieurs méthodes de transposition et de types de transposons, et l'efficacité de ceux-ci diffère selon l'espèce bactérienne étudiée.



## CHAPITRE II

### LA TRANSPOSITION

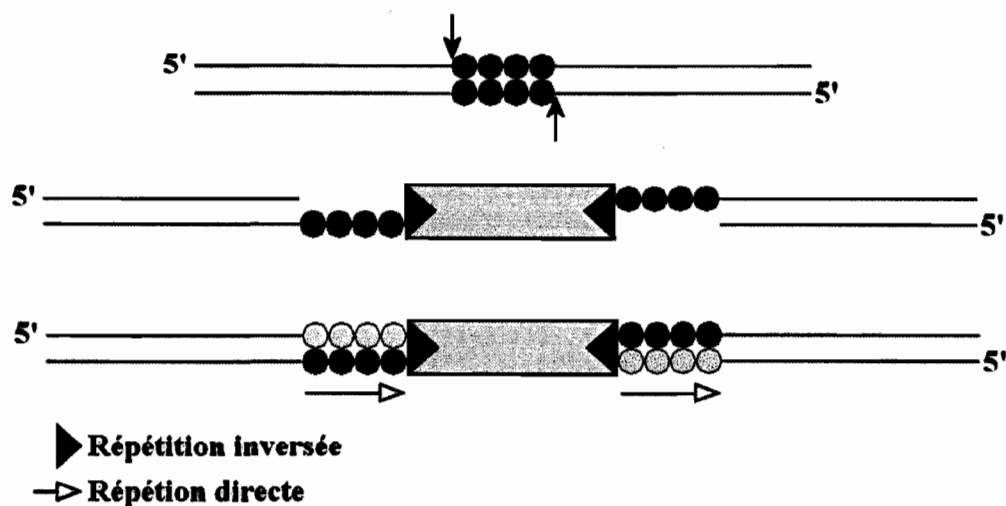
#### 2.1 Introduction à la transposition

Le principe général de la transposition consiste en un transfert d'une séquence discrète, par elle-même, d'un endroit du génome vers un autre. De façon naturelle, le transposon est un segment d'ADN qui est encadré de séquences répétitives inversées qui sont reconnues par une ou des protéines responsables de la transposition appelées transposases. Normalement, la séquence transférée code pour la transposase, ce qui permet sa propre transposition. L'insertion du transposon se fait souvent de façon aléatoire mais quelques fois on observe des endroits plus susceptibles d'accueillir des transposons, désignés « hot-spots » (points chauds). Certaines insertions ne génèrent pas de répétitions directes lorsqu'elles sont le résultat d'une transposition conjugative, c'est-à-dire qui implique une reconnaissance d'une séquence homologue au site d'insertion.

##### 2.1.1 Les séquences d'insertion (IS)

Les séquences d'insertion sont les transposons les plus simples. Ils se déplacent de façon autonome dans le génome et leurs séquences ne codent que pour les protéines nécessaire à leur propre transposition : les transposases. De plus, les IS sont encadrées de courtes répétitions inversées. Lors de la transposition au site d'insertion, l'ADN de l'hôte est dupliqué de 7 à 14 paires de bases. Le nombre de paires de bases est constant pour un transposon donné. L'ADN cible est coupé de façon à créer des bouts cohésifs et le transposon, quant à lui, porte des coupures franches à ses extrémités. Ensuite, l'ADN polymérase répare les bases manquantes et ainsi la duplication engendre une répétition directe de chaque côté du transposon inséré. Ce phénomène constitue une sorte de signature de la transposition. Par exemple, IS903 est un transposon de 1 057-pb entouré de répétitions inversées aux extrémités de 18-pb et engendre une duplication de 9-pb lors

de son insertion (27). La figure 2.1 illustre bien l'insertion du transposon à bouts francs au site cible et sa liaison aux extrémités simple-brins de l'ADN cible. L'autre brin est ensuite complété et lié au reste de l'ADN. La séquence d'insertion IS903 a été utilisée chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (28).



**Figure 2.1: Insertion du transposon. L'ADN cible est coupé de manière à obtenir des bouts cohésifs (intercalés). Ensuite, le transposon à l'aide de la transposase se lie à l'ADN simple brin et finalement, l'ADN polymérase comble l'autre brin de l'extrémité 5'→3'.**

### 2.1.2 Les transposons composites (Tn)

En plus d'avoir les éléments nécessaires à leur transposition, les transposons portent un marqueur de résistance à un antibiotique. Les transposons composites (Tns), quant-à-eux, portent des IS de chaque côté (les bras) de la résistance à l'antibiotique. Ces transposons sont évidemment plus importants en taille. Chaque bras des Tns de chaque côté se termine par des répétitions inversées comme les IS simples. Certains Tns portent des IS identiques de chaque côté du marqueur tel que Tn9 (répétition directe de IS1) ou Tn903 (répétition inversée). Dans ce dernier cas, les répétitions inversées sont essentielles et la transposase doit être présente en *cis* sur le transposon (29, 30). Par ailleurs, les transposons Tn5 et Tn10 ont des IS qui ne sont pas identiques, ils ont donc

des bras différents. Dans ces transposons, une seule IS est fonctionnelle. Une extrémité ayant une IS fonctionnelle peut se déplacer seule ou en entraînant avec elle le reste du transposon. Donc, les transposons de type Tn9 ou Tn903 bénéficient des deux extrémités pour se transposer tandis que les transposons de type Tn5 et Tn10 dépendent de leur extrémité fonctionnelle (31). De plus, une IS est plus susceptible de se transposer seule. Une sélection par le marqueur de résistance à un antibiotique est alors nécessaire pour augmenter la fréquence de transposition du transposon composite entier.

Les transposons composites Tn5, Tn9 et Tn10 ont été testés chez *Escherichia coli* et des milliers d'insertions dans son chromosome ont été obtenues, mais des sites préférentiels ont été obtenus. Pour Tn10, les sites préférentiels sont des palindromes imparfaits de 9-pb (32). Pour ce qui est de Tn9, il s'intègre préférentiellement dans les séquences riches en AT (33). Finalement, le Tn5 apparaît avoir une préférence pour les séquences riches en GC car des paires de GC sont souvent trouvées à chaque extrémité de la courte répétition directe (duplication) (34). Également, certaines études indiquent une tendance du transposon à s'insérer dans les régions d'ADN super-enroulées sans toutefois avoir des sites préférentiels d'insertions (35).

### 2.1.3 La transposition répllicative

La transposition répllicative implique la duplication du transposon. Ainsi, la copie du transposon est insérée dans l'ADN cible et non le transposon original, qui lui, reste à son point de départ. Ce type de transposition implique une transposase qui interagit avec les extrémités du transposon d'origine et une résolvasse qui intervient au niveau de la copie du transposon. Le mode de déplacement des transposons de la famille des TnA est un exemple de transposition répllicative. Ce type de transposition n'est pas impliqué pour le transposon à l'étude.

#### 2.1.4 La transposition non-réplivative

La transposition non-réplivative implique la coupure du transposon à chaque extrémité puis son déplacement jusqu'au site d'insertion sur l'ADN de l'hôte. Ce mécanisme de « couper-coller » est, entre autres, utilisé par les transposons de type Tn5 et Tn10 (36). Ce dernier mode de transposition est abondamment utilisé pour l'étude de la virulence chez les bactéries et incluant *Actinobacillus pleuropneumoniae* (37).

### 2.2 La transposition chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Chez App, la transposition a permis d'identifier plusieurs gènes importants dans l'infection du porc. Notamment, Rioux et al (38) ont utilisé le transposon mini-Tn10 kan<sup>R</sup>. Ils ont obtenu plusieurs mutants au niveau des gènes impliqués dans la structure et la fonction des LPS ce qui a permis de caractériser les composantes de ces derniers. Entre autres, le mutant ayant le gène *galU* muté a permis de démontrer l'importance du noyau oligosaccharique complet pour l'adhérence de la bactérie à l'hôte. Effectivement, le gène *galU* code pour l'UTP- $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate uridylyltransférase impliquée dans la biosynthèse du noyau : lorsqu'il est inactivé, l'adhérence et la virulence de la bactérie sont significativement moins importantes que pour la souche mère. De plus, le transposon mini-Tn10 a permis d'identifier le gène responsable de la biosynthèse de l'antigène-O. Le mutant au niveau de ce gène a été testé chez des porcs sains et il était aussi virulent que la souche mère : l'antigène-O ne semble pas être un élément clé dans l'infection (39). Également, Rioux et al (40) ont généré un mutant au niveau des CPS en inactivant le gène *cpxC* à l'aide du transposon mini-Tn10. Ce gène étant impliqué dans le transport des CPS à travers la membrane interne, le mutant est dépourvu de capsule. Lorsque soumis à des tests de virulence, le mutant acapsulé adhère plus que la souche sauvage à une coupe de la trachée du porc mais celui-ci est totalement avirulent chez un porc sain. Cette étude a ainsi permis de démontrer le rôle protecteur des CPS lors de l'infection du porc et a néanmoins démontré que les CPS ne sont pas impliqués au niveau de l'adhérence de la bactérie aux tissus de l'hôte. De plus, un mutant uréase

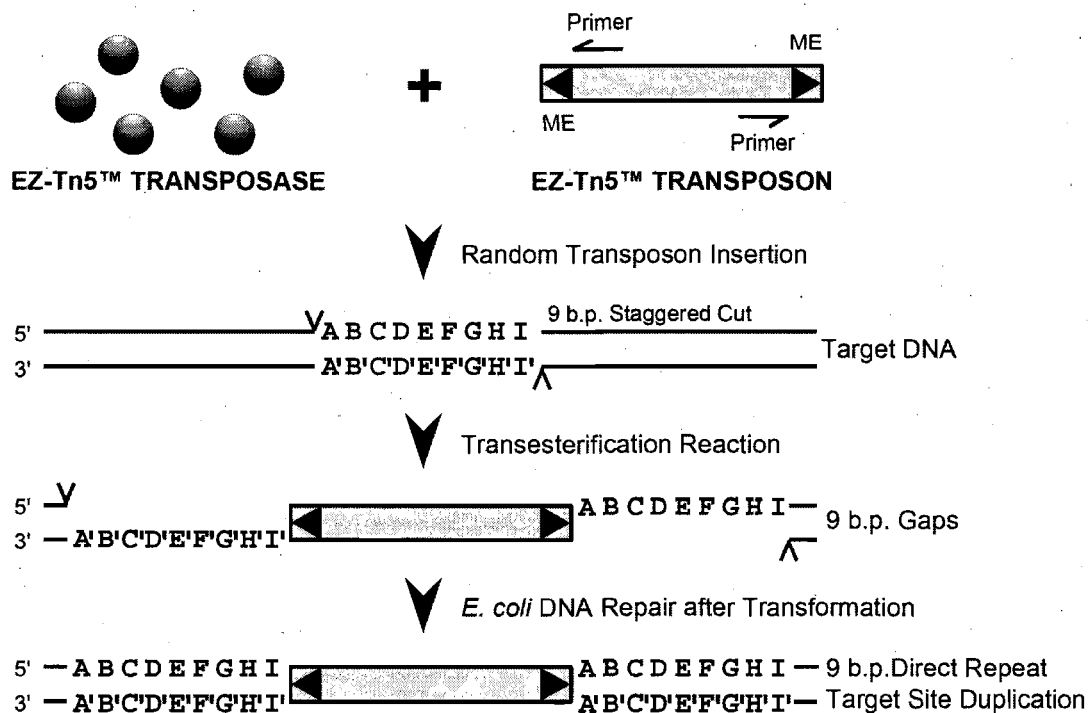
négalif a été généré par transposition ce qui a permis de connaître le degré d'implication de l'uréase dans le développement de la pleuropneumonie porcine. Les mutants uréase négatifs sont éliminés beaucoup plus rapidement chez l'hôte que le type sauvage et en faible dose, ils ne peuvent causer la maladie. L'uréase semble donc importante dans la survie de la bactérie (41, 42). De plus, par transposition STM «signature-tag mutagenesis», il a été démontré que la protéine liée au stress, DnaK, est essentielle à la survie d'App dans le système respiratoire (25).

## CHAPITRE III

### LA TRANSPOSITION PAR LA TECHNIQUE TRANSPOSOME

#### 3.1 Le principe

La transposition se fait à l'aide d'un transposome, qui est un complexe transposon/transposase comprenant un fragment d'ADN borné de chaque côté des séquences répétitives inversées (séquences de reconnaissance) et une enzyme, la transposase. Les séquences de reconnaissance permettent l'insertion aléatoire de l'ADN dans le génome et l'enzyme rend possible l'insertion. La compagnie Epicentre Biotechnologies a développé le transposon EZ-Tn5 qui peut contenir n'importe quel marqueur à l'intérieur de ses deux séquences inversées de 19-pb («mosaic end»: ME) (43). Leur système est basé sur le transposon Tn5 *in vitro* hyperactif de Gorysh et Reznikoff (36). Selon EPICENTRE, la fréquence de transposition avec EZ-Tn5 serait 1000 fois plus élevée qu'avec le transposon Tn5 sauvage. La transposition typique EZ-Tn5 requiert quatre composantes : 1) la transposase EZ-Tn5, 2) le transposon EZ-Tn5, 3) l'ADN cible et 4) la présence de magnésium ( $Mg^{2+}$ ). L'insertion du transposon dans l'ADN cible à l'aide de la transposase est hautement aléatoire par le mécanisme de transposition non réplivative et résulte d'une duplication de 9-pb à chaque extrémité du transposon (voir figure 3.1) (36, 44).

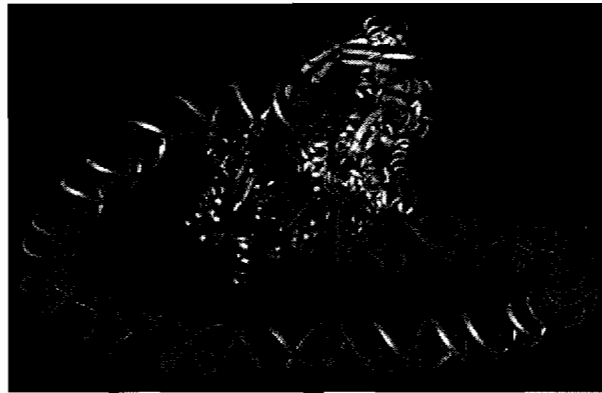


**Figure 3.1: Transposition aléatoire de EZ-Tn5 à l'aide de la transposase et répétitions directes de 9 pb de chaque côté du site insertion. Tirée de: <http://www.epibio.com/pdftechlit/169pl047.pdf>**

## 3.2 La technique

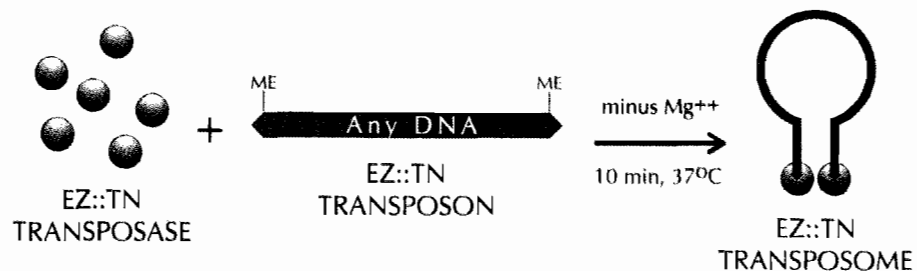
### 3.2.1 Le transposome

Le transposome est le complexe formé du transposon et de la transposase. La structure en 3-dimensions du transposon procaryote Tn5 lié à la transposase a été étudiée par Davies et al (45) à 2,3 Å de résolution (figure 3.2). En absence de  $Mg^{2+}$ , la protéine est dimérique et chaque extrémité double brin d'ADN est liée aux deux sous-unités de la protéine de manière à ce que les extrémités du transposon soient dirigées vers le site actif de l'enzyme (45). Afin de bien comprendre, l'illustration du principe de la fabrication du transposome est en figure 3.3.



**Figure 3.2: Le transposome : L'ADN du transposon en mauve lié à la transposase dimérique. (un monomère orange et l'autre en jaune). Tirée de : Hoffman, L and Jendrisak, J, Epicentre Forum 6(3) :1,1999**

Ce complexe en absence de magnésium empêche le processus de transposition *in vitro*. Alors, il augmente la transposition active à l'intérieur de la cellule, qui elle, contient le magnésium nécessaire à l'ouverture du transposon et de son insertion dans le génome (46).



**Figure 3.3: La transposase EZ-Tn5 reconnaît spécifiquement les ME du transposon EZ-Tn5. La formation du complexe transposome se fait exclusivement en absence de  $Mg^{+2}$ . Tirée de : [http://www.epibio.com/intro\\_selection\\_guide\\_in\\_vivo\\_transposomics.asp](http://www.epibio.com/intro_selection_guide_in_vivo_transposomics.asp)**

### 3.2.2 L'électroporation

Avant l'apparition du transposome, tous les systèmes de transposition étaient applicables seulement *in vivo*, ce qui impliquait l'introduction d'un vecteur suicide



codant pour la transposase à l'intérieur de la cellule hôte (47). Cette façon de procéder comportait des limites techniques. Tout d'abord, l'incidence de la mutation finale par transposition est réduite car la probabilité du transfert du plasmide s'ajoute à la probabilité de la transposition à l'intérieur de la cellule. Par ailleurs, dans ce procédé, la présence du gène de la transposase à l'intérieur du transposon rend instable la transposition car l'enzyme peut s'exprimer dans les générations subséquentes et engendrer de nouvelles insertions. Justement, le problème de stabilité est contourné en utilisant l'électroporation du transposome avec la transposase directement. De plus, la technique d'électroporation avec Tn5 ne demande pas de connaître et de caractériser les facteurs de l'hôte nécessaire à l'expression de la transposase pour la transposition car la transposase est elle-même injectée avec le transposon dans la cellule (46).

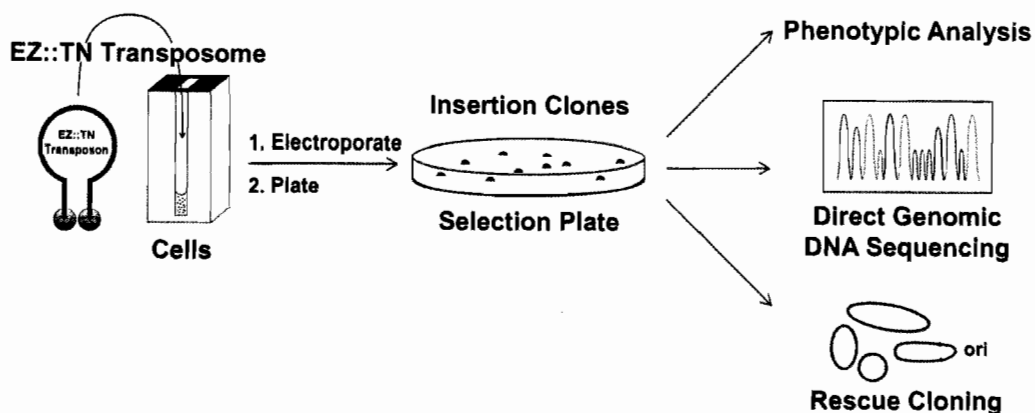
### **3.2.3 Construction d'une banque de clones**

Les bactéries mutantes contenant le transposon sont sélectionnées sur le milieu contenant l'antibiotique, en l'occurrence la kanamycine pour le Tn5. Tous les mutants constituent la banque nécessaire à des éventuels essais de pathogénicité. Il est évidemment essentiel de vérifier la présence du transposon. Des amorces spécifiques au gène de résistance sont alors souvent utilisées par PCR (Polymerase Chain Reaction) afin de confirmer la transposition.

### **3.2.4 Identification du gène muté**

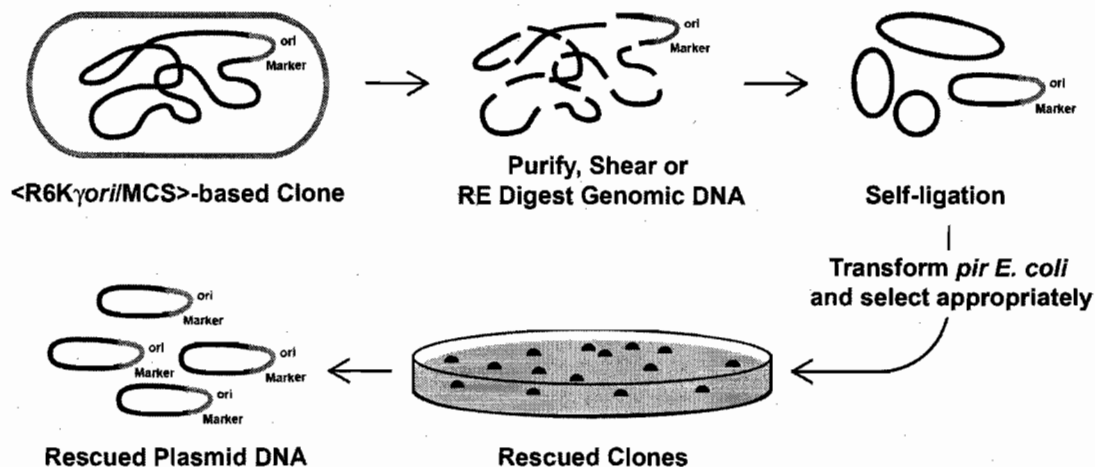
Pour les systèmes de mutagenèse par transposition, il y a souvent des origines de réplication conditionnelles à l'intérieur du transposon en plus de la résistance à l'antibiotique. Le Tn5 porte le gène de résistance à la kanamycine et contient l'origine *R6K $\gamma$*  qui servira lors de la récupération des clones (48). Comme illustré en figure 3.4, le transposome et les cellules compétentes (les bactéries à muter) sont déposés à l'intérieur de la cuvette d'électroporation. Ensuite, le courant passe à travers de la cuvette afin de rendre possible l'incorporation du transposome dans les cellules. Le mélange est

recupéré et reconditionné avec un milieu de culture riche pour être étendu sur un milieu sélectif contenant l'antibiotique. Les clones obtenus peuvent être analysés par séquençage ou du point de vue phénotypique. Cependant, l'analyse de la séquence d'ADN total contenant le transposon est très difficile, une séquence circulaire plus courte contenant le transposon donne des résultats beaucoup plus précis au séquençage.



**Figure 3.4: Transposition par la technique du transposome. Électroporation du transposome dans la bactérie à muter, récupération des mutants ayant le transposomes et analyse de ceux-ci. Tirée de : [http://www.epibio.com/intro\\_selection\\_guide\\_in\\_vivo\\_transposomics.asp](http://www.epibio.com/intro_selection_guide_in_vivo_transposomics.asp)**

Pour ce faire, une étape de récupération de clones «rescue cloning» est préférable. Tout d'abord, l'ADN génomique de chaque clone, contenant le transposon avec l'origine de réplique R6K<sub>ori</sub>, est extrait. Ensuite, tel qu'illustré en figure 3.5, cet ADN est digéré par un enzyme de restriction coupant fréquemment à l'intérieur du génome et ligaturé de manière à obtenir des bouts d'ADN circulaire. L'ADN circulaire est inséré dans *Escherichia coli* ayant le gène *pir* nécessaire à la réplique des bouts d'ADN contenant l'origine R6K donc le transposon. Ainsi, les colonies obtenues sur le milieu sélectif contiennent l'ADN de l'hôte avec le transposon circulaire. Finalement, à partir des plasmides le séquençage peut se faire à l'aide d'amorces s'hybridant à l'intérieur du transposon vers l'extérieur donc vers l'ADN hôte interrompu par le transposon.



**Figure 3.5: Digestion de l'ADN génomique du mutant, ligation de l'ADN digéré et récupération des ADN circulaires contenant le transposon.**  
Tirée de : <http://www.epibio.com/pdftechlit/155pl047.pdf>

### 3.2.5 Essai de pathogénicité

Les mutants obtenus par mutagenèse par transposition sont souvent introduit chez l'hôte afin d'en vérifier leur caractère pathogène. La technique STM «signature-tagged mutagenesis» est une méthode de transposition facilitant l'analyse des mutants obtenus car elle implique le marquage du transposon à l'aide d'une étiquette «tag». Chaque mutant porte une étiquette différente afin de les identifier. Alors, la perte d'un mutant, c'est-à-dire la disparition de celui-ci après son insertion dans l'hôte, implique que le gène interrompu par le transposon était essentiel à la survie de la bactérie. Autrement dit, l'étiquette manquante correspond au mutant portant un gène essentiel muté. Ainsi, cette technique est utile pour identifier les gènes nécessaires à la croissance et la survie de l'organisme chez l'hôte. D'ailleurs, les techniques du transposon Tn10 et STM ont été utilisées chez *Actinobacillus pleuropneumoniae* afin de déterminer des gènes de survie durant l'infection de son hôte, le porc (37). Cette étude a permis d'évaluer 2064 mutants Tn10 par inoculation dans les voies respiratoires du porc, ce qui a rendu possible l'isolement des mutants atténués et par la suite, permis de mettre en lumière la fonction des gènes des lipopolysaccharides et de la capsule.

Par ailleurs, les mutants obtenus par mutagenèse peuvent être évalués pour leur caractère pathogène chez des organismes hôtes de remplacement tels que *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum* et même avec des cultures de macrophages alvéolaires. *C. elegans* est un organisme relativement facile à utiliser car il permet la visualisation en microscopie de la pathogénicité par contact direct avec l'agent infectieux. Ce nématode possède une protection dermique imparfaite qui laisse pénétrer une partie des bactéries. Ces dernières peuvent également entrer par la bouche du nématode, se rendre aux intestins et même le tuer (49). D'ailleurs, *C. elegans* a été utilisé comme modèle avec *Salmonella typhimurium*, un pathogène humain (50). Il est quand même nécessaire d'utiliser d'autres organismes car ce dernier ne possède qu'une immunité innée qui ne suscite pas de cellules phagocytaires. Par ailleurs, l'utilisation de macrophages alvéolaires et de l'amibe *Dictyostelium discoideum* qui ont tous deux la faculté de faire la phagocytose pourrait être une autre option (51). Il a été démontré que les toxines Apx libérées par *A. pleuropneumoniae* lui permettaient de survivre plus de 90 minutes avec les macrophages; ainsi, la capacité des toxines de tuer les phagocytes a été mise en évidence (52). D'autres facteurs de virulence connus d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sont par ailleurs impliqués dans la survie de la souche avec les macrophages dont la capsule et les lipopolysaccharides (LPS) (53). En ce qui concerne *D. discoideum*, l'avantage est que ces organismes unicellulaires, normalement retrouvés dans le sol, sont faciles à cultiver et très efficaces dans la phagocytose. Alors, il est possible de voir les résultats de survies ou de mort cellulaire plus rapidement (54). Finalement, ces microorganismes sont des modèles utiles pour évaluer des gènes bactériens impliqués dans la virulence, que ce soit par toxicité des produits sécrétés dans l'environnement par la bactérie ou par contact direct avec l'agent pathogène.

## CHAPITRE IV

### PROBLEMATIQUE

Bien que la transposition a déjà été utilisée avec succès chez App, le transposon mini-Tn10 kan<sup>R</sup> a montré des sites préférentiels d'insertion, ce qui a eu pour conséquence d'engendrer une redondance de mutants donc une moins grande diversité de gènes à étudier en plus de l'impossibilité de saturer le chromosome d'App (25, 55). De plus, ce système de mini-transposon implique une conjugaison, c'est-à-dire un transfert d'un plasmide contenant le transposon et le gène de la transposase d'une souche donneuse à une souche réceptrice. Par conséquent, la souche doit pouvoir exprimer la résistance à l'antibiotique du transposon et doit également exprimer le gène de la transposase pour que la transposition ait lieu. À ce titre, Tascon et al (56) ont utilisé le mini-Tn5 kan<sup>R</sup> mais aucun mutant n'a été obtenu car la résistance à la kanamycine de Tn5 ne serait pas exprimée chez App (56). Tel que mentionné précédemment, le Tn5 ne semble pas avoir une séquence précise d'insertion préférentielle mais plutôt une tendance à s'insérer lorsqu'il y a une paire G-C. Par ailleurs, le problème se situerait également au niveau de l'expression de la transposase. Il existe une alternative au transposon Tn5 avec la résistance à la kanamycine provenant du Tn903 s'exprimant dans plusieurs hôtes bactériens et qui n'implique pas la conjugaison, donc n'implique pas l'expression de la transposase. Ce transposon est le EZ-Tn5<R6Kγori/KAN-2> de la compagnie Epicentre Biotechnologies. La transposition avec le EZ-Tn5<R6Kγori/KAN-2> a été testée chez plusieurs microorganismes avec succès. Plus particulièrement, Dorsey et al (57) ont obtenu des milliers de mutants dont la plupart portaient le transposon à des endroits différents sur le génome de la bactérie *Acinetobacter baumannii*. Le transposon semble s'insérer de façon aléatoire dans le chromosome de cette souche (57). Le caractère aléatoire du transposon a également été démontré chez *Francisella tularensis* par Kawula et al (58) et, en plus, ils ont mis en évidence la stabilité de l'insertion du transposon dans le chromosome pendant 270 générations (repiquages). Finalement, chez *Rickettsia prowazekii*, la transposase du mini-Tn5 n'est pas exprimée alors que plusieurs mutants spontanés croissent sur le milieu sélectif

contenant de la kanamycine. Pour solutionner ce problème, Qin et al (59) ont construit, à l'aide du système pMOD-3 (Epicentre Biotechnologies), un transposon sur mesure de type EZ-Tn5 avec une résistance à la rifampine. La technologie transposome a aussi été testée avec succès chez d'autres bactéries telles que *Escherichia coli* K12, *Salmonella typhimurium* et *Proteus vulgaris* (46).

#### 4.1 Les hypothèses de recherche

La technologie de mutagenèse par transposition permettrait d'établir une banque de mutants et éventuellement d'identifier et caractériser les facteurs de virulence exprimés chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Cependant, l'efficacité de cette technologie n'a pas encore été démontrée chez cette bactérie. Alors, dans un premier temps, nous proposons de vérifier l'efficacité de ce système de transposition chez App. Toutefois, le transposon EZ-Tn5 porte une résistance à la kanamycine, ce qui n'est pas idéal pour l'étude d'App. Effectivement, nous avons observé plusieurs mutants de résistance spontanés à la kanamycine en culture sur gélose. Nous prévoyons donc obtenir des mutants de résistance spontanés en plus des mutants de transposition sur milieu sélectif ce qui rendrait la sélection complexe. Nous proposons ainsi d'utiliser un autre gène de résistance à un antibiotique, un gène de résistance à la tétracycline *tet<sup>R</sup>* chromosomique, afin de réduire substantiellement les mutants spontanés. Nous prévoyons avec ce transposon modifié obtenir des mutants ayant intégré le transposon dans leur ADN, mais également obtenir un nombre moins important de mutants spontanés. Finalement, sachant que l'efficacité des transposons diffère chez une espèce bactérienne donnée, l'utilisation de deux transposons permettraient davantage d'évaluer la transposition chez App.

#### 4.2 Les objectifs

Pour ce faire, l'efficacité d'un transposome commercial ayant la résistance à la kanamycine, EZ-Tn5<R6Kγori/KAN-2> et une version modifiée de celui-ci, le AppEZ-

Tn5 tet<sup>R</sup>, sera évaluée par des essais de transposition chez App. Finalement, nous voulons obtenir des mutants issus de la transposition chez App pour ensuite les caractériser par séquençage. Ces mutants pourront permettre de construire une banque nécessaire à l'étude de la virulence.

## 5.2 Résumé

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) est l'agent causal de la pleuropneumonie porcine qui engendre de sérieuses pertes économiques à travers le monde. Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'infection et il est important de bien les connaître afin de comprendre le mécanisme d'implantation de la bactérie chez l'hôte. Certains facteurs de virulence sont déjà connus tel que les toxines Apx, les LPS, la capsule et les éléments intervenant dans le système d'acquisition du fer. Pour l'étude des gènes d'une bactérie, une banque de mutants est très utile pour mieux comprendre la fonction des gènes et le mécanisme d'infection. La méthode de mutagenèse par transposition est un bon outil de construction de banque génomique. Il existe une nouvelle technologie basée sur le transposon de type Tn5 qui permet d'électroporer le complexe transposon-transposase (transposome) directement dans la cellule. Étant donné la faible efficacité du transposome de type Tn5 chez App, un nouveau transposon de type Tn5 avec une résistance à la tétracycline chromosomique ( $tet^R$ ) d'App a été construit. Le transposon AppEZ-Tn5  $tet^R$  construit a subi une mutation au niveau du site Sau3AI afin de l'inactiver. Après 4 essais de transposition avec le nouveau transposon, nous avons obtenu 114 colonies sur milieu sélectif dont seulement 13 ne semblaient pas avoir le gène  $tet^R$  lorsque testés par PCR. 36 mutants différents ont été caractérisés et 34 montrent des sites d'insertion différents et les gènes interrompus codent pour un total de 29 fonctions différentes. Le transposon semble alors fonctionnel et aléatoire chez App. Il pourra ainsi être très utile à la construction d'une banque de mutants nécessaire à l'étude de la bactérie.

**Mots clés :** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, facteurs de virulence, mutagenèse, transposon, mutants, génomique.



### 5.3 Abstract

**Background:** An important resource for the genome-wide analysis of gene function in complete sequenced bacterium is the availability of comprehensive mutant libraries, and transposon mutagenesis remains a valuable strategy for creating such libraries. Among different mutagenesis studies, a Tn10-based transposition system for *A. pleuropneumoniae* was described and used with success. Nevertheless, non-randomness of mini-Tn10 was described: specific limitations were highlighted, especially concerning spontaneous mutations leading to kanamycine resistance and hot-spot target sequences concerns. In order to be able to obtain saturation mutagenesis in *A. pleuropneumoniae*, we investigated new transposition technologies.

**Results:** As expected, the use of the commercial EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2> transposome kit yielded only a few mutants within a mass of spontaneous Kan<sup>R</sup> mutants. Following those results, we constructed an *A. pleuropneumoniae* custom-made transposon using EZ-Tn5 pMOD-3 <R6K $\gamma$  ori/MCS> Transposon Construction vector in which we inserted a chromosomal tet<sup>R</sup> gene originating from an *A. pleuropneumoniae* field isolate. We then modify the single *Sau3AI* site in the transposon sequence of pMod-3 in order to optimize plasmid DNA rescue via the R6K *ori* located on the transposon. Inactivation of the *Sau3AI* site was orchestrated via site-directed mutagenesis. The final transposon was designated AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup>, including the abolished *Sau3AI* site. Following mutagenesis experiments, sequence determination showed that transposon-insertion in the *A. pleuropneumoniae* chromosome occurred randomly. Nucleotide sequence comparisons indicated that the AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> transposon was inserted at different sites in the genome of *A. pleuropneumoniae* strain 4074. The identification of the site of transposon insertion also allowed the confirmation of the duplication of 9 bp in the target sequence, which constitutes the signature of Tn5 transposition mechanism.

**Conclusions:** In this study, we report the construction of an AppEZ-Tn5 tetracycline resistant transposon for insertionnal mutagenesis in *A. pleuropneumoniae*.

This work demonstrates the promising potential of a new Tn5-based transposon for saturation mutagenesis that could lead to deciphering *A. pleuropneumoniae* pathogenesis.

**Keywords :** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, virulence factors, mutagenesis, transposon, mutants, genomics.

## 5.4 Background

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is a Gram-negative bacterium, facultatively anaerobic belonging to the *Pasteurellaceae* family (1). It is the etiologic agent of swine pleuropneumonia, a highly contagious respiratory infection, which causes substantial economic losses throughout the world, wherever intensive production exists. *A. pleuropneumoniae* is considered an obligate parasite of the porcine respiratory tract (2). Fifteen serotypes have been described, based mainly on capsular polysaccharides (3). In North America, serotype 1, 5 and 7 are the most predominant (4). All serotypes are able to cause disease but some serotypes are more virulent than others (5). Even if several virulence factors have already been described, including multiple Apx toxins, lipopolysaccharides (LPS), capsule, and iron uptake systems, pathogenesis mechanism of the bacterium remains to be elucidated (6). *A. pleuropneumoniae* represents a most interesting model organism because 1- it is a specific pathogen of swine and 2- its pathogenicity is ruled by multifactorial virulence factors.

An important resource for the genome-wide analysis of gene function in complete sequenced bacterium is the availability of comprehensive mutant libraries, and transposon mutagenesis remains a valuable strategy for creating such libraries.

Among different mutagenesis studies, a Tn10-based transposition system for *A. pleuropneumoniae* was described (7) and used with success (8, 9, 10). Specific limitations were highlighted, especially concerning spontaneous mutations leading to kanamycine resistance (9, 10) and hot-spot target sequences concerns (11). Non-randomness of mini-Tn10 was also described in other *Pasteurellaceae* (12, 13).

In order to be able to obtain saturation mutagenesis in *A. pleuropneumoniae*, we investigated new transposon technologies. Tn5-based transposase and transposon DNA complexes have been electrotransformed in *E. coli* (14) to directly generate insertions into the chromosomal DNA. The system uses a hyperactive Tn5 transposase variant (15)

and an optimized transposon DNA with mosaic ends (16). Transposome complexes are very stable in the absence of magnesium. Once in the cytoplasm of the bacterial cell, the transposome complex is activated by magnesium and typical Tn5 transposition occurs (14). Recently, EZ-Tn transposome systems were successfully used to create random libraries in various bacterial species as *Stenotrophomonas maltophilia* (17), *Mycobacterium bovis* (18), and *Rhodococcus equi* (19).

In this study, we report the construction of an AppEZ-Tn5 tetracycline resistant transposon for insertion mutagenesis in *A. pleuropneumoniae*. This work demonstrates the promising potential of a new Tn5-based transposon for saturation mutagenesis that could lead to deciphering *A. pleuropneumoniae* pathogenesis.

## 5.5 Methods

### 5.5.1 Bacterial strains and plasmids.

*A. pleuropneumoniae* reference strain 4074 (serotype 1) was used as recipient strain for transposon mutagenesis. *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) was used for current cloning experiments while *E. coli* EC100D *pir-116* (Epicentre) was used for plasmid (origin R6K $\gamma$ ) rescue to isolate inactivated-genes.

### 5.5.2 Growth conditions and media

*A. pleuropneumoniae* strains were grown on tryptic Soy Agar (Difco Laboratories) plates supplemented with 100  $\mu$ g NAD per ml at 37°C in normal atmosphere conditions. Transpositional mutants were selected with 2  $\mu$ g/ml of tetracycline. Tryptic Soy Broth supplemented with 1% vol/vol Isovitalex was used for *A. pleuropneumoniae* liquid cultures.

### 5.5.3 DNA techniques

Restriction and modification enzymes were purchased from New England Biolabs. Plasmid DNA was prepared with the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). EZ-Tn5 pMod-3 transposon construction vector, EZ-Tn5 transposase and Type One Restriction Inhibitor were purchased from Epicentre Biotechnologies (Madison, USA). Routine PCR reactions were performed with *Taq* DNA polymerase (NEB) while the tet<sup>R</sup> gene and the AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> sequence were amplified with Platinum *pfx* DNA polymerase (Invitrogen) for better synthesis accuracy. Genomic DNA of *A. pleuropneumoniae* tetracycline mutants for plasmide rescue was prepared using the AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad laboratories). All sequencing reactions were outsourced to the Plate-forme d'Analyses Biomoléculaires of University Laval (Quebec, Canada). DNA and protein sequences were analysed by BlastN/Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and compared with GenBank database. Inactivation of the EZ-Tn5 transposon *Sau3AI* site was made with the Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer instructions.

### 5.5.4 Preparation of electrocompetent *A. pleuropneumoniae* cells and electroporation protocol.

Four ml of precultured *A. pleuropneumoniae* cells were inoculated in a 250 ml flask containing 36 ml of supplemented Tryptic Soy Broth and incubated with moderate agitation for 2 h at 37°C. Cells were harvested by centrifugation (5000 g) at 4°C for 10 min., washed twice in one volume of ice-cold Nanopure (millipore) purified H<sub>2</sub>O. Finally, bacterial cell pellet was resuspended in a minimal volume of purified H<sub>2</sub>O in order to obtain a final volume of 200 µl of concentrated cells. Electrocompetent cells were hold on ice until electroporation or for a maximum of 30 min. Aliquots (40 µl) of concentrated electrocompetent cells were transferred to a ice-colded, 1,5 ml microcentrifuge tube containing 1 µl of transposon / transposase complex-transposome App tet<sup>R</sup>EZ-TN (25 ng of transposon DNA and 1U of transposase). The bacteria-DNA mixture was placed between the electrodes of a ice-chilled electroporation Cuvette (0.1

cm gap; Bio-Rad) and subjected to a single, high-voltage pulse (1,8 KV) generated and delivered by the *E. coli* Pulser (Bio-Rad Laboratories). After the pulse delivery, the bacterial cells were immediately removed from the cuvette and inoculated into 1 ml of supplemented TSB without antibiotics and incubated for 1h at 37°C with agitation (100 rpm) to allow expression of antibiotic resistance. After incubation, the transformants were selected on TSA plates with 2 µg/ml of tetracycline (100 µl per plate) and incubate for 48 to 72 hours at 37°C. Transposition efficiency was calculated as the number of App tet<sup>R</sup> EZ-TN transformants per µg of transposome DNA.

### 5.5.5 Identification of transposition mutants.

All tet<sup>R</sup> colonies were selected and replicate on tetracycline supplement TSA plates and replicate on blood-agar plates (TSA medium with 5% defibrinated sheep blood) to verify hemolysis and absence of growth (since *A. pleuropneumoniae* needs factor V which is non-accessible in blood-agar plates).

## 5.6 Results

### 5.6.1 Construction of the AppTet<sup>R</sup> EZ Tn5

As expected, the use of the EZ-Tn5<R6Kγori/KAN-2> yielded only a few mutants within a mass of spontaneous Kan<sup>R</sup> mutants (data not shown). Following those results, we constructed an *A. pleuropneumoniae* custom-made transposon using EZ-Tn5 pMOD-3 <R6Kγ ori/MCS> Transposon Construction vector. A chromosomal tet<sup>R</sup> gene was isolated from an *A. pleuropneumoniae* field isolate and further characterized (to be published elsewhere). The complete resistance gene was PCR amplified with *Taq* polymerase using the primers Ctetpro-F and B1-A (Table 5.1). Primers were designed in order to include the gene's natural promoter. Amplicons (possessing 3'A overhangs) were cloned into the pDrive vector using the PCR cloning kit (Qiagen) and transformed in *E.coli* DH5α. Cells were plated on TSA tetracycline 10µg/ml and incubated O/N at

37°C. Presence of numerous tet<sup>R</sup> transformant colonies showing plasmid content with the predicted insert size (2271 bp) confirmed the functionality of the tet<sup>R</sup> gene promoter region. The recombinant tet<sup>R</sup> pDrive vector was digested with *Eco*RI to generate a 2288 bp fragment corresponding to the *A. pleuropneumoniae* chromosomal tet<sup>R</sup> gene. The restriction fragment was cloned into the unique *Eco*RI site of the MCS of pMod-3<R6K *ori*/MCS>. The resulting construction was transformed in *E.coli* DH5 $\alpha$  and checked for tetracycline resistance. Before going forward with the transposition experiments, we had to modify the single *Sau*3AI site in the transposon sequence of pMod-3 <R6K *ori*/MCS> (Figure 5.1). This sequence modification was crucial considering the practical aspect of using *Sau*3AI to digest *A. pleuropneumoniae* genomic DNA (previous observations, data not shown) in order to benefit the plasmid DNA rescue via the R6K *ori* located on the transposon (Figure 5.1). Inactivation of the *Sau*3AI (5'GATC3') site was orchestrated by substitution of nucleotide A (position 2377 of the transposon) for nucleotide T via site-directed mutagenesis and using primers Sau Mut For and Sau Mut Rev (Table 5.1). The final transposon (designated AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup>, including the abolished *Sau*3AI site), harbored on pMod-3 <R6K *ori* /MCS> was completely sequenced to confirm the identity of the tet<sup>R</sup> gene and the *Sau*3AI site inactivation. Finally, the transposon was amplified with PCR using the primers pMOD<sup>TM</sup><MCS> Forward PCR Primer and pMOD<sup>TM</sup><MCS> Reverse PCR Primer (Table 5.1).

### 5.6.2 Transposition in *A. pleuropneumoniae*

We tested the strain *A. pleuropneumoniae* reference strain 4074 (serotype 1) to obtain mutants by the custom-made transposome system (AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup>). Four separate and independent experiments were conducted and yielded a mean of 25 tet<sup>R</sup> clones per  $\mu$ g of transposon DNA. This is in contrast to plasmid electrotransformation efficiency in *A. pleuropneumoniae*, which yields approximately 10<sup>6</sup> transformants/ $\mu$ g of DNA (20). The relative limited number of transformants may be due to the low electrotransformation rate of *A. pleuropneumoniae* in comparison of that of *E.coli*, which was consistently reported to be in the range of 10<sup>9-10</sup> transformants/ $\mu$ g of DNA (21). To confirm that the tetracycline resistance observed was caused by a transposon

event, all colonies were screened by PCR amplification of the tet<sup>R</sup> gene. Primer Tetchr-For and Tetchr-Rev (Table 5.1) were used to detect a 989 bp intragenic fragment and reveal the presence of transposon in the *A. pleuropneumoniae* genome. Of the 114 tet<sup>R</sup> colonies obtained, only 13 showed no amplification products when tested with the tet<sup>R</sup> gene primers. To check stability of the construct, we cultured 10 *A. pleuropneumoniae* mutants for more than 15 passages. The last 5 subcultures were performed without antibiotic selection. PCR amplification of a transposon internal fragment of the subculture mutants showed the presence of the integral transposon fragment in their chromosome. To verify that the resistance mutants were due to *bona fide* insertions, we proceed to determine the DNA sequence of the flanking regions to the inserted transposon in using the primers SqFP pMOD<sup>TM</sup><MCS> Forward sequencing Primer and SqFP pMOD<sup>TM</sup><MCS> Reverse sequencing Primer (Table 5.1).

### 5.6.3 Identification of disrupted genes.

To identify specific insertion sites, plasmid rescue cloning was employed. The transposon constructed in this study contains the R6ky origin. By digesting the chromosomal DNA (*A. pleuropneumoniae* strain 4074 is plasmid-free) with a restriction enzyme that at the same time does not cut within the transposon and cuts frequently in the target bacteria chromosome (*Sau3AI* in *A. pleuropneumoniae*), it is possible to generate fragments containing the whole transposon and contiguous bacterial sequence than can be self-ligated and transformed into the *E.coli pir+* strain, supporting replication of the R6Ky origin. Thirty-six individual PCR-positive mutant colonies were selected for rescue cloning. DNA sequencing of the recombinant plasmids obtained was determined using divergent primers to end-sequence the cloned transposon-sequence.

Sequence determination and analysis showed that insertion-site where different for 34 of the 36 mutants characterized (Table 5.2). The sequence determination demonstrates unequivocally that the insertions are on different DNA fragments and are



therefore independent. Furthermore, it indicates that the insertion sites are randomly distributed around the genome.

Sequence determination showed that transposon-insertion in the *A. pleuropneumoniae* chromosome occurred randomly (Table 5.2). Nucleotide sequence comparison indicated that the AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> transposon was inserted at 34 different sites in the genome of *A. pleuropneumoniae* strain 4074 coding for 29 gene function. The identification of the site of transposon insertion also allowed the confirmation of the duplication of 9 bp in the target sequence, which constitutes the signature of Tn5 transposition mechanism.

## 5.7 Discussion

Our work describes the application of a new transposon system for *A. pleuropneumoniae*. To our knowledge, this is the second report of Tn5-based transposon mutagenesis in a bacterial species member of the *Pasteurellaceae* (22). This custom AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> should be useful for the study of other *Pasteurellaceae*, and possibly be useful to achieve saturation mutagenesis. Original wild-type Tn5 is not active in *Pasteurellaceae* (personal observations), while the transposome system allows to overcome transposase expression in the target cells: in addition, the modified EZ-Tn5 transposase inserts randomly and at a frequency approximately 1000 times greater than the wild-type Tn5 transposon (14).

Our AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> transposon provides a rapid and straightforward technology for the *in vivo* mutagenesis and target identification in *A. pleuropneumoniae*. Successful Tn10-based mutagenesis has already been reported in *A. pleuropneumoniae* (7, 8, 9), although in some instance, showing sequence preference recognition by the Tn10 transposase (10,11). Fuller and al. (10) found multiple Tn-10 based transposon insertions in the rRNA genes of *A. pleuropneumoniae*. Other reports showed Tn10-based transposition target preference in various *Pasteurellaceae* strain (12, 13). Our results

(Table 5.2) showed no such target specificity. In fact, sequence determination of transposition sites suggested the randomness of the AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> transposon, even taking in account the multiplicity of the rDNA operons targets per *A. pleuropneumoniae* cell.

Considering the limited number of transformants obtained with the present transposome system, it would be necessary to carry out numerous electrotransformations to accomplish saturation of the *A. pleuropneumoniae* genome. However, given the ease of the experimental procedures, it should not be considered a disadvantage, and in fact ensure independent mutants pools. To assess randomness, we compared our sequencing results to the public *A. pleuropneumoniae* sequence database. As shown in Table 5.2, each insertion occurred at a different site on the *A. pleuropneumoniae* chromosome, and there were no clustering at any particular region of the chromosome. Future purpose is to create a comprehensive mutant library for downstream analysis: this requires random and stable insertions within the genome. Improvement of the yield of mutants (electroporation method, different antibiotic resistance gene, etc.) to adapt the mutagenesis system to large-scale analysis is under investigation.

## **5.8 Author's contribution**

KDC carried most of the experimental elements of this study and was assisted by JFS and JS-J. MS conceived the study and MS and FWH participated in its design and helped to draft the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

## **5.9 Acknowledgments**

This work was supported by grants to M.S. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Canadian Network on Swine Bacterial Diseases) and from the Conseil de Recherche en Pêcheries et Agriculture du Québec. We thank Kim Després for her technical work.

## 5.10 References

1. Dewhirst FE, Paster BJ, Olsen I, Fraser GJ. **Phylogeny of the *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S ribosomal ribonucleic acid sequences.** Zentralbl Bakteriол. 1993 Jun;279(1):35-44.
2. D.J. Taylor, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, in : B.E. Shaw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling, D.J. Taylor (Eds.), **Diseases of Swine**, Blackwell Science, Oxford,1999, pp. 343-354.
3. Blackall PJ, Klaasen HL, van den Bosch H, Kuhnert P, Frey J. **Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15.** Vet Microbiol. 2002 Jan 3;84(1-2):47-52
4. Jacques M. **Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Can J Vet Res. 2004 Apr;68(2):81-5.
5. Frey J. **Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins.** Trends Microbiol. 1995 Jul;3(7):257-61.
6. Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS, Langford PR. ***Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection.** Microbes Infect. 2002 Feb;4(2):225-35.
7. Tascon RI, Rodriguez-Ferri EF, Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Barbosa I, Berche P, Vazquez-Boland JA. **Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative.** J. Bacteriol. 1993 Sep;175(17):5717-22.
8. Tascón RI, Vázquez-Boland JA, Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Barbosa I, Rodríguez-Ferri EF. **The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from**

**mutational analysis.** Mol Microbiol. 1994 Oct;14(2):207-16.

9. Rioux S, Galarneau C, Harel J, Frey J, Nicolet J, Kobisch M, Dubreuil JD, Jacques M. **Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1.** Can J Microbiol. 1999 Dec;45(12):1017-26.

10. Fuller TE, Martin S, Teel JF, Alaniz GR, Kennedy MJ, Lowery DE. **Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model.** Microb Pathog. 2000 Jul;29(1):39-51.

11. Bender J, Kleckner N. **Tn10 insertion specificity is strongly dependent upon sequences immediately adjacent to the target-site consensus sequence.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Sep 1;89(17):7996-8000.

12. Fuller TE, Kennedy MJ, Lowery DE. **Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis.** Microb Pathog. 2000 Jul;29(1):25-38.

13. Ojha S, Sirois M, Macinnes JJ. **Identification of *Actinobacillus suis* genes essential for the colonization of the upper respiratory tract of swine.** Infect Immun. 2005 Oct;73(10):7032-9.

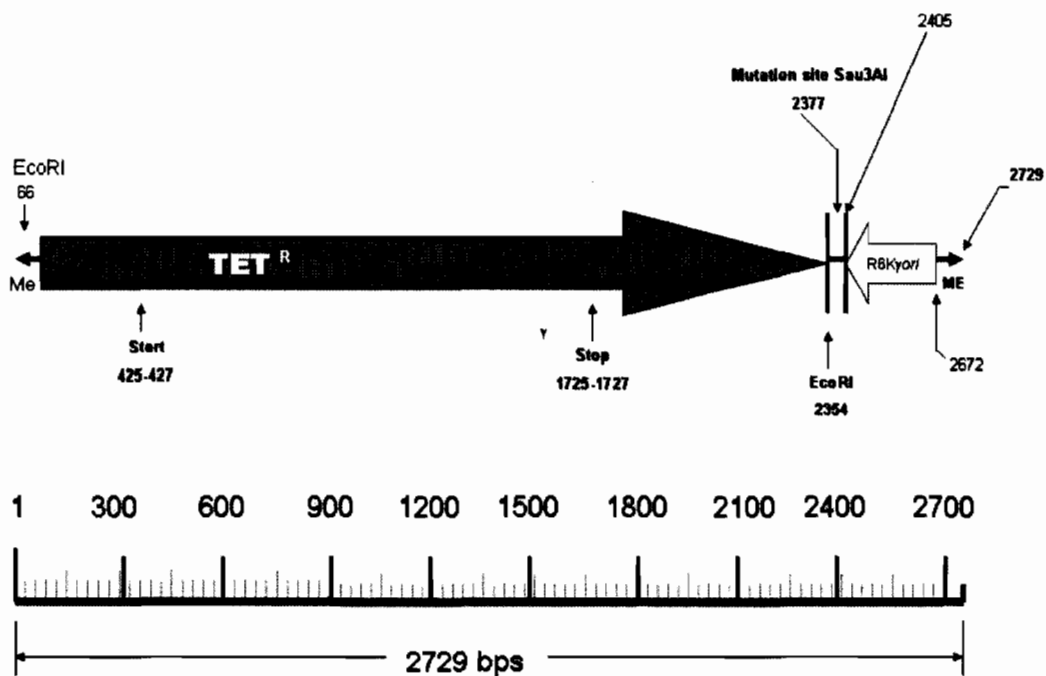
14. Goryshin IY, Jendrisak J, Hoffman LM, Meis R, Reznikoff WS. **Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes.** Nat Biotechnol. 2000 Jan;18(1):97-100.

15. Zhou M, Bhasin A, Reznikoff WS. **Molecular genetic analysis of transposase-end DNA sequence recognition: cooperativity of three adjacent base-pairs in specific interaction with a mutant Tn5 transposase.** J Mol Biol. 1998 Mar 13;276(5):913-25.

16. Goryshin IY, Reznikoff WS. **Tn5 in vitro transposition.** J Biol Chem. 1998 Mar 27;273(13):7367-74.
17. Huang TP, Somers EB, Wong AC. **Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*.** J Bacteriol. 2006 Apr;188(8):3116-20.
18. Stewart GR, Patel J, Robertson BD, Rae A, Young DB. **Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification.** PLoS Pathog. 2005 Nov;1:269-78.
19. Miranda-Casoluengo R, Duffy PS, O'Connell EP, Graham BJ, Mangan MW, Prescott JF, Meijer WG. **The iron-regulated iupABC operon is required for saprophytic growth of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* at low iron concentrations.** J Bacteriol. 2005 May;187(10):3438-44.
20. Lalonde G, Miller JF, Tompkins LS, O'Hanley P. **Transformation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and analysis of R factors by electroporation.** Am J Vet Res. 1989 Nov;50(11):1957-60.
21. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. **High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.** Nucleic Acids Res. 1988 Jul 11;16(13):6127-45
22. Post DM, Mungur R, Gibson BW, Munson RS Jr. **Identification of a novel sialic acid transporter in *Haemophilus ducreyi*.** Infect Immun. 2005 Oct;73(10):6727-35.

## 5.11 Figure legends

### Transposome EZ-Tn5 tet<sup>R</sup> (2729 bps)



**Figure 5.1: Scheme of the transposome AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> organization**

**Table 5.1: Primers used in this work**

<b>Primers</b>	<b>Sequence 5'-3'</b>	<b>Reference</b>
Ctetpro-F	GGGGAAA TCCTGCCGCT TTT	This work
B1-A	GCTGTTAAGCTAACTTGTGG	This work
Sau Mut for	CGGTACCCGGGGTTCCTCTAGAGTCG	This work
Sau Mut Rev	CGACTCTAGAGGAACCCCGGGTACCG	This work
pMOD <sup>TM</sup> <MCS> Forward PCR Primer	ATTCAGGCTGCGCAACTGT	Epicentre
pMOD <sup>TM</sup> <MCS> Reverse PCR Primer	GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG	Epicentre
Tet chr forward	GGAGCGTAGATAAAGGCACA	This work
Tet chr reverse	CCCAAGCAATATTTCCCGCT	This work
SqFP pMOD <sup>TM</sup> <MCS> Forward sequencing Primer	GCCAACGACTACGCACTAGCCAAC	Epicentre
SqRP pMOD <sup>TM</sup> <MCS> Reverse sequencing Primer	GAGCCAATATGCGAGAACACCCGAGAA3	Epicentre

**Table 5.2: Sequencing result of the transposon mutant**

Mutant	Insertion Site <sup>a</sup>	Identity <sup>b</sup>	Gene- Function disrupted
AT1.4.1	5'GGTTAAACC3'	665/677 (98%)	<i>leuC</i> - 3-isopropylmalate dehydratase large subunit 2
AT1.7.3	5'CCCCAAATC3'	736/743 (99%)	rRNA-16S ribosomal RNA
AT1.8.3	5'ATCCGAATC3'	739/743 (99%)	rRNA-16S ribosomal RNA
AT1.9.3	5'GAGTATCAC3'	929/941 (98%)	rRNA-23S ribosomal RNA
AT1.10.2	5'ATCCAACCG3'	745/751 (99%)	rRNA-16S ribosomal RNA
AT1.11.1	5'GGGGAGATT3'	291/295 (98%)	hypothetical protein (YP_001054490.1) <sup>c</sup>
AT1.12.2	5'GGGGAGATT3'	203/203 (100%)	<i>truD</i> - ARNt pseudouridine synthetase
AT1.13.1	5'ATACAGTAC3'	688/690 (99%),	<i>wecC</i> - UDP-N-acetyl-D-mannosamine déhydrogénase <i>wecB</i> - UDP-N-acétylglucosamine 2-épimérase
AT1.14.3	5'ATACAGTAC3'	431/439 (98%)	<i>Pta</i> - phosphate acetyltransferase
AT1.15.1	5'ATACAGTAC3'	544/585 (92%)	hypothetical protein (YP_001053796.1) <sup>c</sup>
AT1.16.1	5'GCCTAAAAC3'	261/261 (100%)	<i>afuB</i> - Ferric transport system permease protein fbpB
AT1.17.1	5'ATCCGCAAG3'	732/746 (98%)	rRNA-16S ribosomal RNA
AT2.1.4	5'ATCATTCAC3'	739/743 (99%)	rRNA-16S ribosomal RNA
AT2.2.2	5'CTAGTTGAC3'	880/887 (99%)	rRNA-16S ribosomal RNA



---

AT2.3.5	5'CTGCATAAC3'	551/560 (98%)	<i>trpH</i> - Protéine TrpH Protéine TrpH
AT2.5.4	5'AGACAACGT3'	632/634 (99%)	<i>Smf</i> - Protéine smf
AT2.6.3	5'AACCATTAC3'	428/429 (99%)	<i>GlmU</i> - Protéine bifonctionnelle GlmU
AT2.7.3	5'CGTTTACTA3'	911/961 (94%)	<i>oadB</i> - oxaloacetate decarboxylase beta chain <i>phnA</i> - alkylphosphonate uptake protein
AT2.8.3	5'ATCCAACCG3'	745/751 (99%)	rRNA-16S ribosomal RNA
AT2.9.1	5'ATCGTGAAA3'	739/743 (99%)	<i>recD</i> - exodeoxyribonuclease V alpha chain rRNA-23S ribosomal RNA
AT2.10.1	5'AACCATTAC3'	390/392 (99%)	<i>hflK</i> - protein HflK
AT2.13.1	5'TCCTTGCAC3'	925/949 (97%)	<i>torD</i> - Trimethylamine-N-oxide reductase precursor
AT2.15.1	5'GATATATTC3'	770/783 (98%)	rRNA-23S ribosomal RNA
AT2.16.3	5'GTTCGGATC3'	931/943 (98%)	<i>nanE</i> - Putative N- acetylmannosamine-6-phosphate 2- epimerase <i>nanK</i> - putative N-acetylmannosamine kinase
AT2.17.3	5'ATAAAATTC3'	616/654 (94%)	<i>prfA</i> - Peptide chain release factor 1 (RF-1)
AT2.18.1	5'GGGTAAGCT3'	908/917 (99%)	hypothetical protein (YP_001054402.1) <sup>c</sup> <i>ulaA</i> - ascorbate-specific permease IIC component UlaA

---

---

AT2.19.1	5'GTAAATCC3'	510/511 (99%)	<i>napF</i> - ferredoxin-type protein NapF
AT2.20.2	5'GTGATGTAG3'	450/452 (99%)	<i>Lgt</i> - Prolipoprotein diacylglyceryl transferase
AT2.21.1	5'CCTCGTATG3'	530/544 (97%)	<i>sucA</i> - 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
AT2.22.3	5'CCTCTTAAG3'	559/563 (99%)	<i>nlpI</i> - lipoprotein NlpI-like precursor <i>Pnp</i> - polyribonucleotide nucleotidyltransferase
AT2.26.3	5'GCAAATGA3'	849/892 (95%)	hypothetical protein (YP_001053997.1) <sup>c</sup>
AT2.27.3	5'GAACACATT3'	399/405 (98%)	<i>rbsK</i> - ribokinase
AT2.28.3	5'TCCTACTAT3'	693/748 (92%)	<i>ubiF</i> - 2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase
AT2.29.1	5'GTAAAGTTA3'	217/219 (99%)	<i>lacZ</i> - beta-galactosidase
AT2.31.3	5'GGATTGTGC3'	552/555 (99%)	<i>prfC</i> - peptide chain release factor 3
AT2.32.1	5'ATCTCTACC3'	550/557 (98%)	<i>scrR</i> - Sucrose operon repressor (Scr operon regulatory protein)

---

<sup>a</sup> Bases indicate a 9-bp duplication that flanks each side of the inserted transposon.

<sup>b</sup> Potential genes and functions were predicted by Blastp and Blastx searches.

<sup>c</sup> Protein identity

## CHAPITRE VI

### DISCUSSION

#### 6.1 Transposition avec le transposon EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2>

Nous voulions d'abord tester le transposon EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2> afin de vérifier son utilité pour la mutagenèse chez *A. pleuropneumoniae*.

##### 6.1.1 Efficacité du transposon EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2>

Nous avons testé le transposon EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2> en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, il s'agissait d'introduire le complexe transposon/transposase dans *A. pleuropneumoniae* 4074 par électrotransformation (procédure décrite en détail dans le manuscrit du Chapitre III). Sur milieu sélectif contenant de la kanamycine [50 ug/mL], nous avons obtenu 8 colonies kan<sup>R</sup> pour 3 essais d'électroporation dont 6 mutants ont été confirmés comme étant des transposants lorsque testés par PCR. En utilisant la méthode de « plasmid rescue », nous avons pu déterminer les séquences flanquantes au transposon de 4 des 6 mutants. L'important pour le séquençage est que l'enzyme de restriction coupe fréquemment l'ADN génomique d'App mais qu'il ne coupe pas à l'intérieur du transposon. Autrement dit, l'ADN circulaire doit être composé d'un fragment d'ADN génomique suffisamment petit et contenir le transposon intact pour qu'il puisse se répliquer adéquatement, efficacement et de façon stable dans la cellule d'*E. coli* pir-116. Avec ce transposon EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2>, nous avons choisi l'enzyme de restriction *Eco*RI car le profil de digestion montre un grand nombre de fragments et il ne coupe pas à l'intérieur du transposon. Bien que l'enzyme *Sau*3AI génère un profil plus intéressant, le transposon EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2> possède un site de restriction *Sau*3AI dans sa séquence. En utilisant une enzyme reconnaissant 6 paires de bases, il est possible que le fragment généré par *Eco*RI, lors de la digestion de l'ADN génomique des mutants, ait été trop grand pour constituer un plasmide stable. Ainsi, l'utilisation de cet enzyme ne diminue

pas l'efficacité de la transposition mais diminue l'efficacité de l'analyse des mutants obtenus avec ce transposon. Cela représente un désavantage pour cette technique.

Somme toutes, les résultats sont décevants en terme d'efficacité. Les mutants sont difficiles à obtenir. Pour ce qui est de l'aspect aléatoire du transposon, l'analyse par séquence pourra n'en dire davantage.

## 6.2 Séquençage des mutants EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2>

Les données de séquençage obtenues nous ont donné des informations préliminaires sur l'efficacité du transposon. Le mutant K1.1 montre une insertion au niveau du gène *fkpA*. Fuller et al (25) à l'aide de la technique de transposition STM de type Tn10 ont d'ailleurs identifié la protéine issue de ce gène comme étant une protéine périplasmique avec une activité de peptidylpropyl isomérase de la famille FK506. Ce mutant est intéressant car le gène *fkpA* est déjà reconnu comme étant un élément important pour la survie de *Salmonella typhimurium* (60). Le mutant K2.1 présente une insertion au niveau du gène codant pour l'ARN ribosomial 16S alors que les deux derniers K3.1 et K4.1 présentent une insertion au niveau du gène codant pour la synthèse de l'ARN ribosomial 23S. Bien que les deux mutants K3.1 et K4.1 semblent porter le transposon au même endroit, lorsque nous analysons les répétitions directes de 9 pb de chaque côté du transposon qui correspond au site d'insertion du transposon, les sites d'insertion semblent différents pour tous les mutants (voir tableau 6.1).

**Tableau 6.1: Site d'insertion et localisation de la mutation pour chaque mutant**

Mutant	Site d'insertion	Identité	Gène interrompu - Protéine identifiée chez AppL20
K1.1	5'GCCCCACGC3'	786/794 (98%)	<i>fkpA</i> - putative FKBP- type peptidyl-prolyl cis- trans isomerase
K2.1	5'AACCGCAGG3'	841/854 (98%)	ARN ribosomal 16s
K3.1	5'GTCTAAGCC3'	850/860 (98%)	ARN ribosomal 23s
K4.3	5'GATTAGCAC3'	943/962 (98%)	ARN ribosomal 23s

Par ailleurs, comme prévu, plusieurs mutants spontanés sont capables de croître sur un milieu contenant la kanamycine. D'ailleurs, l'étalement de cellules d'App sans transposon (contrôle négatif) montrait parfois plusieurs dizaines de colonies avec une concentration de 50 µg de kanamycine/mL. Cependant, le problème est beaucoup plus important lorsque nous réduisons la concentration de kanamycine à 40 µg/mL. Nous obtenons beaucoup de colonies pour chaque essai de transposition mais les contrôles négatifs présentent autant de colonies. La récupération des mutants ayant le transposon est beaucoup plus laborieuse car ils se retrouvent parmi plusieurs mutants à résistance spontanée. Une concentration d'antibiotique plus élevées permet de réduire le nombre de mutants de résistance spontanée et de récupérer seulement les mutants ayant le transposon. Cependant, l'augmentation des concentrations d'antibiotique rend la croissance des cellules plus difficile. D'ailleurs, nous avons construit un transposon sur mesure contenant le gène de résistance à la tétracycline chromosomique d'App afin de faciliter la récupération de mutants de transposon et afin d'obtenir peut-être une meilleure efficacité que le transposome original.

### 6.3 Mutagenèse par transposition avec le transposon sur mesure AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup>

Afin d'accroître l'efficacité de la mutagenèse via la technologie transposome chez *A. pleuropneumoniae*, nous avons construit un transposon sur mesure désigné AppEZ-

Tn5 tet<sup>R</sup>. Nous avons d'une part inséré un gène de résistance à la tétracycline provenant d'une souche sauvage d'*A. pleuropneumoniae*. Puis, nous avons inactivé le site *Sau3AI* du transposon par mutagenèse dirigée.

### 6.3.1 Efficacité du transposon AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup>

En testant notre construction (AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup>) chez *A. pleuropneumoniae*, nous avons obtenu au total 114 mutants en quatre essais dont seulement 13 ne répondaient pas positivement au test PCR de détection du gène *tet<sup>R</sup>*. Les 42 mutants de transposition issus des deux premiers essais ont été séquencés (voir section 6.4). L'efficacité d'une transposition par transposome dépend en grande partie de la préparation des cellules électrocompétentes. De plus, certains essais ont été faits avec les mêmes préparations de cellules ce qui donnait le même écart entre les résultats de transpositions fait avec le EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2> et AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup>. Donc, ce n'est pas la préparation des cellules qui a influencé sur l'efficacité du transposon et cela signifie que le transposon sur mesure est vraiment plus efficace.

Le gène de résistance à l'antibiotique apparaît être l'élément du transposon qui augmente l'efficacité de la transposition. La kanamycine est un antibiotique bactéricide, donc rendant en principe la survie des bactéries plus difficile. Par contre, les mutants spontanés chez App semblent plus faciles à obtenir avec cet antibiotique. L'antibiotique tétracycline semble plus sélectif par son absence de mutants spontanés dans les contrôles négatifs malgré le fait que l'antibiotique est bactériostatique, affectant la croissance bactérienne sans les tuer (61). Cependant, il est important de mentionner que la résistance à la tétracycline provient du chromosome d'App ce qui rend la résistance efficace en une seule copie. Dans les deux cas, l'antibiotique inhibe la synthèse protéique en se fixant à la sous-unité 30s du ribosome bactérien; la kanamycine agit en provoquant des erreurs de lecture de l'ARNm et la tétracycline agit plutôt au niveau de la fixation de l'aminoacyl-ARNt (61).

## 6.4 Séquençage des mutants AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup>

Nous avons procédé au séquençage pour tous les mutants des deux premiers essais obtenus, afin de déterminer le caractère aléatoire d'insertion du transposon. Cela signifie que 42 mutants au total ont été analysés par séquençage.

### 6.4.1 Premier essai de transposition

Le premier a mis en évidence un phénomène de prolifération préférentielle. Les mutants AT1.2.1, AT1.3.1 et AT1.4.1 apparaissent comme étant le même mutant qui a eu le temps de se multiplier étant donné qu'ils portent la même mutation (gène *leuC*) et au même site d'insertion (5'GGTTAAACC3'). Cependant, le mutant AT1.4.1 ne possède pas le même pourcentage d'identité et les mêmes bases similaires au gène mais lorsqu'on compare le mutant AT1.4.1 avec les deux autres séquences, il y a identité à 99% sur 631 bases au début du brin séquencé correspondant à l'ADN à proximité du transposon. Également, pour les mutants AT1.5.4 et AT1.6.4, bien qu'ils aient une mutation au même endroit, le gène *mutS*, et au même site d'insertion soit (5'GCTCAAAT3'), les pourcentages d'identité et les bases similaires au gène diffèrent. Néanmoins, il est très probable que les différences d'identité entre ces séquences proviennent d'un brin différent issu d'une digestion partielle. De plus, il est important de mentionner que les séquences de l'ADN des mutants AT1.5.4 et AT1.6.4 sont identiques à 100 % sur 323 bases au même endroit sur le brin lorsque comparé ensemble. Ce qui confirme qu'on est en présence d'une prolifération préférentielle. Finalement, lors de la réception de la séquence, il arrive que certaines bases soient identifiées N car le signal de fluorescence est confus. Cela peut expliquer une légère différence dans le pourcentage d'identité (5 à 10%) si elles sont au milieu de la séquence sinon on évite de l'inclure dans l'analyse.

Par ailleurs, quelques insertions ont été trouvées au niveau de l'ADN ribosomal (ADNr). Nous avons obtenu 4 mutants (AT1.7.3, AT1.8.3, AT1.10.2 et AT1.17.1) ayant le transposon au niveau de l'ARNr 16S ce qui est une proportion acceptable. Cela

s'explique par la présence fortement probable du gène à plusieurs endroits dans le génome et de son activité de réplication élevée à l'intérieur de la cellule qui augmenteraient la probabilité de transposition dans ces gènes. Par contre, quoique semblable, les séquences d'insertion de 9 pb ne sont pas identiques. La partie de séquence qui revient est soit 5'C-----ATG3' ou 5'ATG-----N3' (N= C /G). De plus, un mutant montre une insertion au niveau du gène de l'ARNr 23S qui est fréquent lors de transposition également mais qui n'implique pas du tout la même séquence d'insertion. Cela peut paraître normal étant donné que ce n'est pas le même gène qui est impliqué. Justement, les mutants AT1.11.1 et AT1.12.2 semble avoir la même séquence d'insertion (5'GGGGAGATT3') mais ont une similitude avec 2 gènes codant pour 2 protéines différentes, soit une protéine hypothétique et l'ARNt pseudouridine synthétase D. De plus, 3 autres mutants (AT1.12.2, AT1.13.1 et AT1.14.3) mettent en évidence la même séquence d'insertion (5'ATACAGTAC3') mais pas la même protéine (voir tableau 6.2). Ces dernières données nous amènent à croire qu'il y aurait des séquences préférentielles d'insertion mais globalement les sites d'insertion sont très différents entre eux, mis à part les sites d'insertion dans l'ARN ribosomal.

**Tableau 6.2 : Résultats de séquençage des mutants obtenus au premier essai de transposition**

Mutant	Site d'insertion	identité	Gène interrompu - Protéine identifié chez AppL20
AT1.2.1	5'GGTTAAACC3'	324/327 (99%) 173/173 (100%)	<i>leuC</i> - Large sous-unité 2 de 3-sopropylmalate déhydratase
AT1.3.1	5'GGTTAAACC3'	324/327 (99%) 173/173 (100%)	<i>leuC</i> - Large sous-unité 2 de 3-sopropylmalate déhydratase
AT1.4.1	5'GGTTAAACC3'	665/677 (98%)	<i>leuC</i> - Large sous-unité 2 de 3-sopropylmalate déhydratase
AT1.5.4	5'GCTCAAAT3'	815/842 (96%)	<i>mutS</i> - Protéine MutS repérant les erreurs d'appariements dans l'ADN
AT1.6.4	5'GCTCAAAT3'	294/308 (95%)	<i>mutS</i> - Protéine MutS repérant les



			erreurs d'appariements dans l'ADN
AT1.7.3	5'CCCCAAATC3'	736/743 (99%)	ARN ribosomal 16S
AT1.8.3	5'ATCCGAATC3'	739/743 (99%)	ARN ribosomal 16S
AT1.9.3	5'GAGTATCAC3'	929/941 (98%)	ARN ribosomal 23S
AT1.10.2	5'ATCCAACCG3'	745/751 (99%)	ARN ribosomal 16S
AT1.111	5'GGGGAGATT3'	291/295 (98%)	Protéine hypothétique
AT1.12.2	5'GGGGAGATT3'	203/203 (100%)	<i>truD</i> - ARNt pseudouridine synthétase
AT1.13.1	5'ATACAGTAC3'	688/690 (99%),	<i>wecC</i> - UDP-N-acetyl-D-mannosamine déhydrogénase <i>wecB</i> - UDP-N-acétylglucosamine 2-épimérase
AT1.14.3	5'ATACAGTAC3'	431/439 (98%)	<i>Pta</i> - phosphate acétyltransférase
AT1.15.1	5'ATACAGTAC3'	544/585 (92%)	Protéine hypothétique
AT1.16.1	5'GCCTAAAAC3'	261/261 (100%)	<i>afuB</i> - protéine perméase du système de transport ferrique : fbpB
AT1.17.1	5'ATCCGCAAG3'	732/746 (98%)	ARN ribosomal 16S

#### 6.4.2 Deuxième essai de transposition

Dans cette seconde expérience de mutagenèse, nous avons obtenu une transposition beaucoup plus aléatoire (voir tableau 5.2 de l'article, tous les mutants commençant par AT2...). Lorsque la durée d'incubation est moins importante, soit une heure, nous ne voyons pas le même phénomène de dédoublement que pour l'essai précédent, mis à part les mutants AT2.2.2 et AT2.24.3 (AT2.24.3 n'est pas présenté dans le tableau 5.2 de l'article) qui ont la même séquence d'insertion et le même gène interrompu, soit l'ARN ribosomal 16S. Il y a le même phénomène de duplication pour le gène AT2.16.3 et AT2.23.3 (AT2.23.3 n'est pas présenté dans le tableau 5.2). Il

semble que dans ces deux cas, le mutant se soit dupliqué, ce qui signifie également que la mutation subit soit moins dommageable pour sa croissance par rapport aux autres mutants. Il est possible que les deux sites soient préférentiels bien que chacun de ces sites soit particulier pour les deux mutants correspondants. Ainsi, cette information supplémentaire amène l'idée que les mutations au niveau de l'ARN16S n'affecteraient pas autant la croissance que l'ont ait pu croire suite à l'essai avec le transposon Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2>. Par ailleurs, les essais avec les transposons montrent régulièrement des insertions au niveau de l'ARN ribosomal 23S. D'ailleurs, ce problème amène la saturation de la mutagenèse car plusieurs mutants doivent être obtenus pour avoir quelques mutants portant une mutation différente. D'ailleurs, Fuller et al (25), avait sélectionné 28 mutants dont seulement 13 étaient des séquences uniques. Par contre, avec notre transposon, nous obtenons pour ce deuxième essai 24 séquences d'insertion différentes dont 22 gènes différents pour 26 mutants au total. Cela représente de très bon résultats pour des premiers essais avec ce type de transposon chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Ce transposon serait en fait le plus efficace et le plus aléatoire jusqu'à présent.

Globalement, pour les 42 mutants analysés par séquençage obtenus avec les deux premiers essais, 34 des 36 mutants (tableau 5.2) possèdent leur séquence unique d'insertion. Donc, aucun site préférentiel n'est mis en évidence chez nos mutants. De plus, les gènes mutés sont tous différents sauf pour les ARN ribosomal 16S et 23S; le transposon AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> nous a permis d'obtenir 29 mutants sur 36 portants des mutations sur des gènes différents. En ce qui concerne la tendance du transposon à s'insérer dans les gènes codant pour l'ARN ribosomal, elle s'explique par le nombre de copies d'ADN ribosomal dans le chromosome. Puisque l'ADN ribosomal se retrouve en plusieurs copies, il est plus probable que l'insertion se fasse à ces endroits, d'où les résultats obtenus.

## 6.5 Limite de la technique

De façon générale, nous avons observé que la duplication d'un mutant donné pourrait être minimisée par un temps plus court d'incubation entre l'électroporation et les étalements sur les milieux sélectifs (1 heure). De plus, les insertions préférentielles (« hot-spots ») au niveau de l'ARNr ribosomal 16S et 23S semblent empêcher une saturation chromosomique par le transposon lorsque le transposon mini-Tn10 est utilisé par exemple. Par contre, avec le transposon AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup>, l'insertion semble aléatoire sur le chromosome d'*A. pleuropneumoniae*. La limite la plus importante de cette technique de mutagenèse par transposition est que les gènes essentiels à la survie de la bactérie ne peuvent être isolés, leur inactivation menant à la mort cellulaire. Par contre, un gène essentiel à la survie *in vivo* de la bactérie pourra être mis en évidence par STM «signature-tagged mutagenesis». Cette technique consiste à marquer le transposon d'une étiquette «tag» différente pour chaque mutant afin de les identifier. Ensuite, les mutants sont inoculés chez le porc. Puis, par déduction des étiquettes, les mutants ne se retrouvant pas chez le porc infecté sont identifiés. Finalement, les gènes nécessaires à la survie et l'implantation de la bactérie sont indirectement mis en évidence par ces mutants portant un gène interrompu essentiel à leur survie chez l'hôte.

## 6.6 Perspective de recherche

Dans un premier temps, il faudra déterminer par séquençage le site d'insertion du transposome pour les 59 mutants restant ayant répondu positivement à la détection PCR du gène tet<sup>R</sup>. Ensuite, à partir des résultats de transposition obtenus, il serait utile d'amorcer la construction d'une banque de mutants (2000 à 3000 mutants étant donné qu'on approxime le nombre de gènes à 2700) pour l'étude à l'échelle génomique des gènes de virulence d'App. Cependant, d'autres électroporations sont à prévoir afin de récolter le nombre de mutants nécessaires pour constituer une banque à être testée chez les modèles hôtes simples. Par ailleurs, une étude récente portant sur *Actinobacillus suis* a montré des résultats fort intéressants pour les mutants au niveau de l'ARNr ribosomal

(55). Plusieurs mutants ayant une mutation à des endroits différents sur les gènes de l'ARNr ribosomal montrent un caractère virulent atténué (55). Donc, l'étude de l'implication des gènes codant pour les ribosomes dans la virulence pourrait être envisagée et les mutants portant une mutation à ce niveau pourraient être utiles pour les études futures.

De plus, certains mutants ayant une mutation dans un gène codant pour une protéine hypothétique pourraient être utiles pour l'identification de nouveaux gènes. Le gène muté du mutant AT1.11.1 montre une homologie en partie pour des gènes non identifiés de bactéries pathogènes telles que *Salmonella enterica* (homologie de 213/225 (94%)), *Bacillus anthracis* (homologie de 213/225 (94%)) et *Bacillus cereus* (homologie de 213/225 (94%)). Ainsi, l'analyse de ce mutant pourrait être pertinente dans le but de trouver un facteur de virulence nouveau encore non identifié. D'autre part, les gènes inactivés des mutants AT1.15.1, AT2.18.1 et AT2.26.3 semblent particulier à *Actinobacillus pleuropneumoniae* 4074 et L20 étant donné qu'il n'y a aucune homologie avec d'autres gènes bactériens de la banque de données. Il serait donc important de tenter d'identifier ces gènes particuliers qui pourraient représenter des cibles diagnostiques éventuelles.

En ce qui concerne les gènes codant pour les protéines identifiées chez AppL20, il serait intéressant de tester entre autres le mutant AT1.16.1 ayant le gène *AfuB* codant pour la protéine fbpB intervenant dans le transport du fer (20). Bien qu'elle soit identifiée comme étant un facteur de virulence, aucun mutant au niveau de cette protéine spécifiquement n'a été testé pour donner son degré d'implication dans l'infection. De plus, le mutant AT2.10.1 présente une mutation sur le gène codant pour la protéine HflK «high frequency of lysogenation» se situant normalement au niveau de la membrane. Il serait pertinent de vérifier si le mutant a perdu une fonction importante à sa survie chez l'hôte.

## CHAPITRE VII

### CONCLUSION

L'étude de la virulence d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* demeure un sujet actuel étant donné les pertes économiques importantes engendrées par la maladie que cette bactérie cause. Afin de décortiquer la virulence, l'étude approfondie des facteurs de virulence est nécessaire pour bien connaître le processus d'infection et pour éventuellement éradiquer la maladie.

La technique de transposition a déjà été utilisée chez App. Dans un premier temps, l'objectif était de tester le transposon commercial EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2>. Nous avons constaté la difficulté d'obtenir des mutants avec ce transposon. Néanmoins, nous avons réussi à faire séquencer les gènes interrompus de quatre mutants obtenus. Bien que les résultats soient peu nombreux, ils ont pu nous convaincre de construire un transposon mieux adapté à App.

Ensuite, le deuxième objectif était de construire un transposon sur mesure contenant une résistance à la tétracycline et d'obtenir des mutants de transposition. L'article présenté dans ce mémoire met en évidence une efficacité certaine du transposon comparativement au transposon de type Tn5, tel que le EZ-Tn5<R6K $\gamma$ ori/KAN-2>, chez les *Pasteurellaceae*. De plus, le caractère aléatoire du transposon AppEZ-Tn5 tet<sup>R</sup> a également été démontré dans l'article. Nous avons donc pleinement réalisé notre objectif car en plus d'obtenir des mutants, les sites d'insertion étaient en majorité à des endroits différents dans le génome bactérien.

En comparant les résultats obtenus avec le transposon commercial et celui construit sur mesure, nous pouvons conclure que la résistance à l'antibiotique pour la sélection des mutants joue un rôle dans le fonctionnement de ce transposon. Que ce soit à cause de sa taille ou du mode d'action de l'antibiotique impliqué, il semble que le simple fait de l'avoir remplacé a permis d'obtenir une meilleure efficacité. De plus, l'abolition du site de restriction *sau3A* sur le transposon semble rendre plus facile

l'analyse des mutants. Donc, d'autres transposons pourraient être construit à partir de ce transposon dépourvu de site de restriction *sau3A* et d'une résistance à un antibiotique approprié à l'espèce étudiée.

Finalement, à notre connaissance, nous sommes les premiers à utiliser un transposon dérivé de type Tn5 chez les *Pasteurellaceae*. Notre nouveau transposon deviendra donc un outil utile pour étudier les gènes d'App mais également pour étudier éventuellement d'autres bactéries. Finalement, un des objectifs futurs sera de construire une banque de mutants plus élaborée et éventuellement de tester ces mutants pour leur virulence dans un modèle *ex vivo* ou *in vivo*.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Fenwick, B., Henry, S. (1994) "Porcine pleuropneumonia", *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 1334-1340.
2. Rosendal, S., Mitchell, W. R. (1983) "Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: a survey of Ontario Pork Producers, 1981", *Can. J. Comp Med.* 47: 1-5.
3. Ajito, T., Haga, Y., Homma, S., Goryo, M., Okada, K. (1996) "Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1", *J. Vet. Med. Sci.* 58: 297-303.
4. Haesebrouck, F., Chiers, K., Van, O., I, Ducatelle, R. (1997) "*Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection", *Vet. Microbiol.* 58: 239-249.
5. Bosse, J. T., Janson, H., Sheehan, B. J., Beddek, A. J., Rycroft, A. N., Kroll, J. S., Langford, P. R. (2002) "*Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection", *Microbes. Infect.* 4: 225-235.
6. Matthews, P. R., Pattison, I. H. (1961) "The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig", *J. Comp Pathol.* 71: 44-52.
7. Dubreuil, J. D., Jacques, M., Mittal, K. R., Gottschalk, M. (2000) "*Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity", *Anim Health Res. Rev.* 1: 73-93.
8. Schaller, A., Djordjevic, S. P., Eamens, G. J., Forbes, W. A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Gottschalk, M., Nicolet, J., Frey, J. (2001) "Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*", *Vet. Microbiol.* 79: 47-62.
9. Jolie, R. A., Mulks, M. H., Thacker, B. J. (1994) "Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1", *Vet. Microbiol.* 38: 329-349.

10. Mittal, K. R., Higgins, R., Lariviere, S., Nadeau, M. (1992) "Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec", *Vet. Microbiol.* 32: 135-148.
11. Jacques, M. (1996) "Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence", *Trends Microbiol.* 4: 408-409.
12. Altman, E., Brisson, J. R., Perry, M. B. (1986) "Structure of the O-chain of the lipopolysaccharide of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1", *Biochem. Cell Biol.* 64: 1317-1325.
13. Sauer, F. G., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J., Hultgren, S. J. (2000) "Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis", *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 65-72.
14. Zhang, Y., Tennent, J. M., Ingham, A., Beddome, G., Prideaux, C., Michalski, W. P. (2000) "Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*", *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 15-18.
15. Utrera, V., Pijoan, C. (1991) "Fimbriae in *A. pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts", *Vet. Rec.* 128: 357-358.
16. Frey, J. (1995) "Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins", *Trends Microbiol.* 3: 257-261.
17. Baltes, N., Hennig-Pauka, I., Gerlach, G. F. (2002) "Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection", *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 283-287.
18. Wilke, M., Franz, B., Gerlach, G. F. (1997) "Characterization of a large transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7", *Zentralbl. Veterinarmed. B* 44: 73-86.
19. Archambault, M., Labrie, J., Rioux, C. R., Dumas, F., Thibault, P., Elkins, C., Jacques, M. (2003) "Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1", *Can. J. Vet. Res.* 67: 271-277.



20. Mikael, L. G., Srikumar, R., Coulton, J. W., Jacques, M. (2003) "fhuA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron", *Infect. Immun.* 71: 2911-2915.
21. Mikael, L. G., Pawelek, P. D., Labrie, J., Sirois, M., Coulton, J. W., Jacques, M. (2002) "Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (fhu) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*", *Microbiology* 148: 2869-2882.
22. Bilinski, T. (1991) "Oxygen toxicity and microbial evolution", *Biosystems* 24: 305-312.
23. Langford, P. R., Loynds, B. M., Kroll, J. S. (1996) "Cloning and molecular characterization of Cu,Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*", *Infect. Immun.* 64: 5035-5041.
24. Gordon, A. H., Hart, P. D., Young, M. R. (1980) "Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages", *Nature* 286: 79-80.
25. Fuller, T. E., Martin, S., Teel, J. F., Alaniz, G. R., Kennedy, M. J., Lowery, D. E. (2000) "Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model", *Microb. Pathog.* 29: 39-51.
26. Negrete-Abascal, E., Tenorio, V. R., Guerrero, A. L., Garcia, R. M., Reyes, M. E., de la, G. M. (1998) "Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes", *Can. J. Vet. Res.* 62: 183-190.
27. Grindley, N. D., Joyce, C. M. (1981) "Analysis of the structure and function of the kanamycin-resistance transposon Tn903", *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 45 Pt 1: 125-133.
28. Thomson, V. J., Bhattacharjee, M. K., Fine, D. H., Derbyshire, K. M., Figurski, D. H. (1999) "Direct selection of IS903 transposon insertions by use of a broad-host-range vector: isolation of catalase-deficient mutants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*", *J. Bacteriol.* 181: 7298-7307.
29. Derbyshire, K. M., Kramer, M., Grindley, N. D. (1990) "Role of instability in the cis action of the insertion sequence IS903 transposase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 4048-4052.

30. Derbyshire, K. M., Hwang, L., Grindley, N. D. (1987) "Genetic analysis of the interaction of the insertion sequence IS903 transposase with its terminal inverted repeats", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84: 8049-8053.
31. Reznikoff, W. S. (1982) "Tn5 transposition and its regulation", *Cell* 31: 307-308.
32. Halling, S. M., Kleckner, N. (1982) "A symmetrical six-base-pair target site sequence determines Tn10 insertion specificity", *Cell* 28: 155-163.
33. Zerbib, D., Gamas, P., Chandler, M., Prentki, P., Bass, S., Galas, D. (1985) "Specificity of insertion of IS1", *J. Mol. Biol.* 185: 517-524.
34. Lodge, J. K., Weston-Hafer, K., Berg, D. E. (1988) "Transposon Tn5 target specificity: preference for insertion at G/C pairs", *Genetics* 120: 645-650.
35. Lodge, J. K., Berg, D. E. (1990) "Mutations that affect Tn5 insertion into pBR322: importance of local DNA supercoiling", *J. Bacteriol.* 172: 5956-5960.
36. Goryshin, I. Y., Reznikoff, W. S. (1998) "Tn5 in Vitro Transposition", *J. Biol. Chem.* 273: 7367-7374.
37. Sheehan, B. J., Bosse, J. T., Beddek, A. J., Rycroft, A. N., Kroll, J. S., Langford, P. R. (2003) "Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host", *Infect. Immun.* 71: 3960-3970.
38. Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Frey, J., Nicolet, J., Kobisch, M., Dubreuil, J. D., Jacques, M. (1999) "Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1", *Can. J. Microbiol.* 45: 1017-1026.
39. 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. (2002) "Identification of genes involved in biosynthesis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants", *J. Endotoxin. Res.* 8: 27-38.
40. Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Kobisch, M., Frey, J., Gottschalk, M., Jacques, M. (2000) "Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1", *Microb. Pathog.* 28: 279-289.

41. Baltes, N., Tonpitak, W., Gerlach, G. F., Hennig-Pauka, I., Hoffmann-Moujahid, A., Ganter, M., Rothkotter, H. J. (2001) "Actinobacillus pleuropneumoniae iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response", *Infect. Immun.* 69: 472-478.
42. Bosse, J. T., MacInnes, J. I. (2000) "Urease activity may contribute to the ability of Actinobacillus pleuropneumoniae to establish infection", *Can. J. Vet. Res.* 64: 145-150.
43. Zhou, M., Bhasin, A., Reznikoff, W. S. (1998) "Molecular genetic analysis of transposase-end DNA sequence recognition: cooperativity of three adjacent base-pairs in specific interaction with a mutant Tn5 transposase", *J. Mol. Biol.* 276: 913-925.
44. Shevchenko, Y., Bouffard, G. G., Butterfield, Y. S., Blakesley, R. W., Hartley, J. L., Young, A. C., Marra, M. A., Jones, S. J., Touchman, J. W., Green, E. D. (2002) "Systematic sequencing of cDNA clones using the transposon Tn5", *Nucleic Acids Res.* 30: 2469-2477.
45. Davies, D. R., Goryshin, I. Y., Reznikoff, W. S., Rayment, I. (2000) "Three-dimensional structure of the Tn5 synaptic complex transposition intermediate", *Science* 289: 77-85.
46. Goryshin, I. Y., Jendrisak, J., Hoffman, L. M., Meis, R., Reznikoff, W. S. (2000) "Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes", *Nat. Biotechnol.* 18: 97-100.
47. Berg, D. E., Berg, C. M., Sasakawa, C. (1984) "Bacterial transposon Tn5: evolutionary inferences", *Mol. Biol. Evol.* 1: 411-422.
48. Wu, F., Goldberg, I., Filutowicz, M. (1992) "Roles of a 106-bp origin enhancer and Escherichia coli DnaA protein in replication of plasmid R6K", *Nucleic Acids Res.* 20: 811-817.
49. Kurz, C. L., Ewbank, J. J. (2000) "Caenorhabditis elegans for the study of host-pathogen interactions", *Trends Microbiol.* 8: 142-144.
50. Labrousse, A., Chauvet, S., Couillault, C., Kurz, C. L., Ewbank, J. J. (2000) "Caenorhabditis elegans is a model host for Salmonella typhimurium", *Curr. Biol.* 10: 1543-1545.

51. Steinert, M., Heuner, K. (2005) "Dictyostelium as host model for pathogenesis", *Cell Microbiol.* 7: 307-314.
52. Cruijisen, T. L., Van Leengoed, L. A., kker-Nooren, T. C., Schoevers, E. J., Verheijden, J. H. (1992) "Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs", *Infect. Immun.* 60: 4867-4871.
53. Bilinski, T. (1991) "Oxygen toxicity and microbial evolution", *Biosystems* 24: 305-312.
54. Steinert, M., Heuner, K. (2005) "Dictyostelium as host model for pathogenesis", *Cell Microbiol.* 7: 307-314.
55. Ojha, S., Sirois, M., MacInnes, J. I. (2005) "Identification of *Actinobacillus suis* genes essential for the colonization of the upper respiratory tract of swine", *Infect. Immun.* 73: 7032-7039.
56. Tascon, R. I., Rodriguez-Ferri, E. F., Gutierrez-Martin, C. B., Rodriguez-Barbosa, I., Berche, P., Vazquez-Boland, J. A. (1993) "Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative", *J. Bacteriol.* 175: 5717-5722.
57. Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., Actis, L. A. (2002) "Genetic and phenotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* insertion derivatives generated with a transposome system", *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6353-6360.
58. Kawula, T. H., Hall, J. D., Fuller, J. R., Craven, R. R. (2004) "Use of transposon-transposase complexes to create stable insertion mutant strains of *Francisella tularensis* LVS", *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6901-6904.
59. Qin, A., Tucker, A. M., Hines, A., Wood, D. O. (2004) "Transposon mutagenesis of the obligate intracellular pathogen *Rickettsia prowazekii*", *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2816-2822.
60. Horne, S. M., Kottom, T. J., Nolan, L. K., Young, K. D. (1997) "Decreased intracellular survival of an *fkpA* mutant of *Salmonella typhimurium* Copenhagen", *Infect. Immun.* 65: 806-810.

61. Prescott, Harley, Klein (1995). Microbiologie. De Boek-Wesmael S. A. Bruxelles.  
Titre original: Prescott, Harley, Klein - "Microbiology", second edition, 1993.