

Université de Montréal

**Identification et caractérisation de gènes chez
Salmonella enterica sérovar Typhi impliqués dans
l'interaction avec les macrophages humains**

Par

Sébastien Sabbagh

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ doctor (Ph.D.)
en Microbiologie et Immunologie

Juillet, 2013

© Sébastien Sabbagh, 2013

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

Cette thèse intitulée:
Identification et caractérisation de gènes chez *Salmonella enterica* sérovar Typhi
impliqués dans l'interaction avec les macrophages humains.

présentée par
Sébastien Sabbagh

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Marc Drolet
président-rapporteur

Dre France Daigle
directrice de recherche

Dre Catherine Paradis-Bleau
membre du jury

Dr Roger C. Levesque
examineur externe

Dr Dindial Ramotar
représentant du doyen de la FESP

Résumé

Le genre bactérien *Salmonella* regroupe plus de 2500 sérovars, mais peu sont responsables de pathologies humaines. *Salmonella enterica* sérovar Typhi (*S. Typhi*) est reconnu pour son importance médicale à travers le globe. *S. Typhi* cause la fièvre typhoïde chez l'Homme, une maladie infectieuse létale caractérisée par la dissémination systémique de la bactérie vers des organes du système réticulo-endothélial. La fièvre typhoïde représente un fardeau pour la santé mondiale, notamment auprès des pays en développement où les conditions sanitaires sont désuètes. La situation se complique davantage par l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques. De plus, les deux vaccins licenciés sont d'efficacité modérée, présentent certaines contraintes techniques et ne sont pas appropriés pour les jeunes enfants et nourrissons.

La phase systémique de l'infection par *Salmonella* repose sur sa survie dans les macrophages du système immunitaire. Dans ce compartiment intracellulaire, la bactérie module les défenses antimicrobiennes grâce à de multiples facteurs de virulence encodés dans son génome. Les mécanismes moléculaires sollicités sont complexes et finement régulés. Malgré les progrès scientifiques réalisés précédemment, plusieurs incompréhensions persistent au sujet de l'adaptation de ce pathogène dans les macrophages de l'hôte. Pour mieux concevoir les déterminants génétiques de *S. Typhi* impliqués dans l'interaction avec ces cellules, une stratégie de sélection négative a été appliquée afin de vérifier systématiquement l'effet direct des gènes pendant l'infection. En premier temps, une librairie de mutants par transposon chez *S. Typhi* a été créée pour l'infection de macrophages humains en culture. Après 24 heures d'infection, la présence des mutants fut évaluée simultanément par analyse sur des biopuces de *Salmonella*. Au total, 130 gènes ont été sélectionnés pour leur contribution potentielle auprès des macrophages infectés. Ces gènes comptaient des composantes d'enveloppe bactérienne, des éléments fimbriaires, des portions du

flagelle, des régulateurs, des facteurs de pathogénèse et plusieurs protéines sans fonction connue.

En deuxième temps, cette collection de gènes a dirigé la création de 28 mutants de délétion définie chez *S. Typhi*. Les capacités d'entrée et de réplication intracellulaire de ces mutants au sein des macrophages humains ont été caractérisées. D'abord, les macrophages ont été co-infectés avec les mutants en présence de la souche sauvage, pour vérifier la compétitivité de chacun d'eux envers cette dernière. Ensuite, les mutants ont été inoculés individuellement chez les macrophages et leur infectivité fut mesurée comparativement à celle de la souche sauvage. Sommairement, 26 mutants ont présenté des défauts lorsqu'en compétition, tandis que 14 mutants se sont montrés défectueux lorsque testés seuls. Par ailleurs, 12 mutants ont exposé une déficience lors de l'infection mixte et individuelle, incluant les mutants *acrA*, *exbDB*, *flhCD*, *fliC*, *gppA*, *mlc*, *pgtE*, *typA*, *waaQGP*, *STY1867-68*, *STY2346* et *SPI-4*. Notamment, 35 nouveaux phénotypes défectueux d'entrée ou de survie intracellulaire chez *Salmonella* ont été révélés par cette étude. Les données générées ici offrent plusieurs nouvelles pistes pour élucider comment *S. Typhi* manipule sa niche intracellulaire, menant à l'infection systémique. Les gènes décrits représentent des cibles potentielles pour atténuer la bactérie chez l'humain et pourraient contribuer au développement de meilleures souches vaccinales pour immuniser contre la fièvre typhoïde.

Mots-clés : *Salmonella enterica* sérovar Typhi, fièvre typhoïde, infection systémique, macrophage, *THP-1*, stratégie de sélection négative, insertion de transposon, biopuce, entrée dans le macrophage, survie intracellulaire

Abstract

The bacterial genus *Salmonella* holds over 2500 serovars, but few are responsible for human pathologies. *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) is recognized across the globe for its medical importance. *S. Typhi* causes typhoid fever in humans, a lethal infectious disease characterized by systemic dissemination of the bacteria to organs of the reticulo-endothelial system. Typhoid fever represents a burden for public health, notably in developing countries where sanitary conditions are obsolete. The situation is further complicated by the appearance of strains resistant to antibiotics. Moreover, both of the licensed vaccines are of moderate efficiency, present certain technical constraints and are not appropriate for young children and newborns.

The systemic phase of infection by *Salmonella* relies on its survival within macrophages of the immune system. In this intracellular compartment, the bacterium modulates antimicrobial defenses thanks to multiple virulence factors encoded within its genome. Molecular mechanisms taking place are complex and finely regulated. Despite scientific advances made previously, many misunderstandings persist concerning the adaptation of this pathogen within host macrophages. To better conceive the genetic determinants of *S. Typhi* involved in interaction with these cells, a negative selection strategy was applied to systematically verify the direct effect of genes during infection. Firstly, a library of transposon insertion mutants in *S. Typhi* was created for infection of cultured human macrophages. After 24 hours of infection, the presence of mutants was evaluated simultaneously by analysis on *Salmonella* microarrays. In total, 130 genes were selected for their potential contribution within infected macrophages. These genes included bacterial envelope components, fimbrial elements, portions of the flagellum, regulators, pathogenesis factors, and many proteins of unknown function.

Secondly, this collection of genes led to the creation of 28 defined deletion mutants in *S. Typhi*. The ability of entry and intracellular replication of these mutants within human macrophages were characterized. To start, macrophages were coinfecting with mutants in the presence of the wild-type strain, in order to verify the competitiveness of each of them against the latter. Then, mutants were inoculated individually into macrophages and their infectiveness was measured in comparison with the wild-type strain. In summary, 26 mutants presented defects when in competition, whereas 14 mutants were shown defective when tested alone. Furthermore, 12 mutants exposed a deficiency during mixed and individual infection experiments, including mutants *acrA*, *exbDB*, *flhCD*, *fliC*, *gppA*, *mlc*, *pgtE*, *typA*, *waaQGP*, *STY1867-68*, *STY2346*, and *SPI-4*. In particular, 35 new defective phenotypes of *Salmonella* entry or intracellular survival were revealed in this study. Data generated here provides significant novel insight for elucidating how *S. Typhi* manipulates its intracellular niche, leading to systemic infection. Genes described represent potential targets for attenuating the bacteria in the human host and could contribute to the development of better vaccine strains to immunize against typhoid fever.

Keywords : *Salmonella enterica* serovar Typhi, typhoid fever, systemic infection, macrophage, *THP-1*, negative selection strategy, transposon insertion, microarray, entry into the macrophage, intracellular survival

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvii
CHAPITRE 1 – Introduction	1
1.1 – Génétique évolutive de <i>Salmonella</i>	2
1.1.1 – Classification des sérovars	3
1.1.2 – Génomes de <i>Salmonella</i>	5
1.1.2.1 – Structure et évolution de la génétique des populations.....	7
1.1.2.2 – Transfert horizontal d’éléments mobiles.....	9
1.1.2.3 – Divergence à partir d’ <i>Escherichia coli</i>	11
1.1.2.4 – Pseudogènes	13
1.2 – Pathologies associées à <i>Salmonella</i>	15
1.2.1 – La gastro-entérite	16
1.2.1.1 – Épidémiologie	16
1.2.1.2 – Moyens thérapeutiques	18
1.2.2 – La fièvre typhoïde	19
1.2.2.1 – Épidémiologie	21
1.2.2.2 – Moyens thérapeutiques	24
1.2.3 – La fièvre paratyphoïde	29
1.2.4 – Le besoin d’un nouveau vaccin amélioré.....	30
1.3 – Interaction entre <i>Salmonella</i> et son hôte	31
1.3.1 – Spectre d’hôte	31
1.3.1.1 – Sérovars généralistes.....	33
1.3.1.2 – Sérovars adaptés à l’hôte.....	34

1.3.1.3 – Sérovars restreints à l’hôte.....	34
1.3.2 – Foyer d’infection.....	34
1.3.2.1 – Infection intestinale localisée.....	36
1.3.2.2 – Infection systémique	38
1.4 – Facteurs de virulence chez <i>Salmonella</i>	42
1.4.1 – <i>Salmonella Pathogenicity Islands</i> (SPI)	44
1.4.2 – Capsule Vi.....	53
1.4.3 – Flagelles	54
1.4.4 – Fimbriae	55
1.4.5 – Plasmides	56
1.5 – Outils pour étudier la virulence de <i>Salmonella</i>	57
1.5.1 – Modèles d’infection	57
1.5.2 – Techniques génétiques et moléculaires.....	63
1.5.2.1 – Séquençage de génomes, biopuces d’ADN et génomique comparative.....	64
1.5.2.2 – Identification de facteurs de virulence par expression de gènes.....	66
1.5.2.2.1 – Expression de gènes <i>in vivo</i>	66
1.5.2.2.2 – Profilage transcriptionnel.....	67
1.5.2.2.3 – Approches protéomiques	68
1.5.2.3 – Identification de facteurs de virulence par sélection négative de gènes	69
1.5.2.3.1 – Librairie de mutants par insertion de transposons	69
1.5.2.3.2 – Bibliothèques de mutants par délétions définies	73
1.6 – Problématique, Hypothèse et Objectifs.....	75
CHAPITRE 2 – Matériel et Méthodes.....	77
2.1 – Souches bactériennes et plasmides	77
2.2 – Stratégie de sélection négative.....	84
2.2.1 – Mutagenèse par transposon pour générer la librairie de mutants	84
2.2.2 – Sélection compétitive des mutants de la librairie dans les macrophages	90

2.2.3 – Synthèse des sondes d'ADNc marqué	92
2.2.4 – Hybridation des sondes aux biopuces	94
2.3 – Création de mutants individuels de délétions définies et complémentation de mutants	94
2.4 – Expériences d'infection de macrophages.....	95
2.4.1 – Test d'indice de compétition.....	95
2.4.2 – Infection avec les mutants individuels	96
2.5 – Test de motilité.....	96
2.6 – Sensibilité des mutants au peroxyde d'hydrogène.....	97
CHAPITRE 3 – Résultats	99
3.1 – Mutagenèse globale du génome de <i>S. Typhi</i>	99
3.2 – Sélection compétitive de la librairie de mutants d'insertion dans les macrophages humains	101
3.3 – Caractérisation <i>in vitro</i> des mutants de délétions définies	112
3.4 – Interaction des mutants définis avec les macrophages humains lors du test d'indice de compétition.....	119
3.5 – Interaction entre les macrophages humains et les mutants définis testés individuellement.....	122
CHAPITRE 4 – Discussion.....	127
4.1 – Étudier la fièvre typhoïde avec le sérovar Typhi spécifique à la maladie chez l'humain.....	127
4.2 – Mutagenèse par insertion pour créer la librairie de mutants.....	129
4.3 – Résultats en lien avec le contenu génomique de <i>Salmonella</i>	133
4.4 – Résultats en lien avec les gènes et protéines induits chez <i>Salmonella</i>	136
4.5 – Résultats en lien avec le phénotype de mutants chez <i>Salmonella</i>	139
4.5.1 – Interprétation des données expérimentales	139
4.5.2 – Support des données antérieures chez <i>Salmonella</i>	142
4.5.3 – Caractérisation de nouveaux phénotypes chez <i>Salmonella</i>	144
4.6 – Perspectives et ouvertures du projet.....	149
4.6.1 – Fonctionnalité des pseudogènes.....	149

4.6.2 – Souches vivantes atténuées en vaccinologie.....	153
4.6.3 – Les gènes d’antivirulence	158
CHAPITRE 5 – Conclusions	161
BIBLIOGRAPHIE.....	163
ANNEXE 1 – Articles publiés comme 1 ^{er} auteur.....	xix
ANNEXE 2 – Article publié comme coauteur	xxviii

Liste des tableaux

CHAPITRE 1 – Introduction:

Tableau I. Nombre de sérovars répertoriés chez <i>Salmonella</i>	5
Tableau II. Comparaison des vaccins licenciés contre la fièvre typhoïde.....	27
Tableau III. Méthodes à haut débit pour l'identification de gènes de virulence..	64

CHAPITRE 2 – Matériel et Méthodes:

Tableau IV. Souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude	83
Tableau V. Amorces utilisées dans cette étude.....	90

CHAPITRE 3 – Résultats:

Tableau VI. Gènes de <i>S. Typhi</i> identifiés par sélection négative des mutants d'insertion par transposon de la librairie passée au sein des macrophages humains <i>THP-1</i>	110
Tableau VII. Sommaire des résultats de caractérisation des mutants de délétions définies chez <i>S. Typhi</i>	116
Tableau VIII. Effet de la complémentation génétique par plasmide auprès des mutants de délétions définies chez <i>S. Typhi</i> lors de tests d'indice de compétition au sein des macrophages humains	121

Liste des figures

CHAPITRE 1 – Introduction:

Figure 1. Incidence de la fièvre typhoïde à travers le globe	23
Figure 2. Schéma comparatif de l'infection localisée et de l'infection systémique causées par <i>Salmonella</i>	35
Figure 3. Représentations circulaires des génomes de <i>S. Typhimurium</i> et <i>S. Typhi</i>	43
Figure 4. Facteurs de virulence distinguant <i>S. Typhimurium</i> de <i>S. Typhi</i>	44
Figure 5. Représentation schématique de la technique TraSH	71

CHAPITRE 3 – Résultats:

Figure 6. ADN génomique de mutants d'insertion par transposon de la librairie	101
Figure 7. Classification fonctionnelle des 130 gènes de <i>S. Typhi</i> identifiés par sélection compétitive des mutants de la librairie dans les macrophages humains	112
Figure 8. Croissance <i>in vitro</i> en milieu riche de mutants de délétions définies..	118
Figure 9. Entrée et survie des mutants de délétions définies lorsque testés en infection mixte dans les macrophages humains.....	120
Figure 10. Taux d'entrée et de survie intracellulaire des mutants de délétions définies testés individuellement dans les macrophages humains	123
Figure 11. Implication du gène <i>acrA</i> durant l'interaction de <i>S. Typhi</i> avec les macrophages humains.....	124

ANNEXE 1 – Articles publiés comme 1^{er} auteur:

Figures supplémentaires de l'article 1	xxii
Figures supplémentaires de l'article 2	xxv

Liste des annexes

ANNEXE 1 – Articles publiés comme 1 ^{er} auteur.....	xix
ANNEXE 2 – Article publié comme coauteur	xxviii

Liste des sigles et abréviations

2D gel analysis	Analyse de gel à deux dimensions
ABACUS	<i>Array-Based Analysis of Cistrons Under Selection</i>
ADNg	ADN génomique
AGE	<i>Attenuating Gene Expression</i>
Ap	Ampicilline
ARNnc	ARN non codant
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ATR	<i>Acid Tolerance Response</i>
C	Cytosine
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
CI	<i>Competitive Index</i>
Cm	Chloramphénicol
DAP	Acide Diaminopimélique
DFI	<i>Differential Fluorescence Induction</i>
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO₆₀₀	Densité Optique à 600 nm
DOC	Désoxycholate de sodium
DT104	<i>Definitive Phage Type 104</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESM	Erreur Standard de la Moyenne
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FRT	<i>Flippase Recognition Target</i>
G	Guanine
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	heure
HIS	<i>Human Immune System</i>

HTS	<i>High-Throughput Sequencing</i>
IL	Interleukine
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside
IVET	<i>In Vivo Expression Technology</i>
kb	kilobase
Km	Kanamycine
LB	<i>Lysogeny Broth ou Luria-Bertani</i>
LD50	<i>Median Lethal Dose</i>
LPM	<i>Minimal Low-Phosphate Medium</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MIAME	<i>Minimum Information About a Microarray Experiment</i>
min	minute
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MTOC	<i>Microtubule-Organizing Center</i>
Nal	Acide Nalidixique
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Nitric Oxyde</i>
NRAMP1	<i>Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1</i>
NTS	<i>Nontyphoidal Salmonella</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	paire de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
RBS	<i>Ribosome Binding Site</i>
RIVET	<i>Recombinase-based IVET</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<i>S. bongori</i>	<i>Salmonella bongori</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>

S. Paratyphi	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Paratyphi
S. Typhi	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi
S. Typhimurium	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhimurium
SCOTS	<i>Selective Capture of Transcribed Sequences</i>
SCV	<i>Salmonella-Containing Vacuole</i>
sec	seconde
Sifs	<i>Salmonella-induced filaments</i>
SP	<i>Spacious Phagosome</i>
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i>
SRE	Système Réticulo-Endothélial
sRNA	<i>small RNA</i>
SST1	Système de Sécrétion de Type Un
SST3	Système de Sécrétion de Type Trois
SST6	Système de Sécrétion de Type Six
STM	<i>Signature-Tagged Mutagenesis</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMDH	<i>Transposon-Mediated Differential Hybridization</i>
Tn	Transposon
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TraDIS	<i>Transposon-Directed Insertion Site Sequencing</i>
TraSH	<i>Transposon Site Hybridization</i>
UFC	Unité Formatrice de Colonie
Vi	<i>Virulence-associated capsular polysaccharide</i>
VIIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS	Virus de l'Immunodéficience Simienne

À Papa et Maman, qui me manquent beaucoup.

À Julie, qui m'a beaucoup manqué.

À Gueddo, qui me manquera toujours.

« As with some other important technologies, such as PCR, the discovery of this technology was probably inevitable. »

George M. Church, généticien américain,
en parlant de la technique *TraSH*.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury, dont Dr Marc Drolet, Dre France Daigle, Dre Catherine Paradis-Bleau et Dr Roger Levesque. Vous offrez généreusement votre temps et votre savoir pour l'évaluation de cette thèse, et je vous en suis très reconnaissant.

J'ai eu le privilège d'entreprendre ma maîtrise et mon doctorat dans le laboratoire de la Dre France Daigle, qui, par ses conseils précieux, son écoute attentive et ses solutions ingénieuses, a su me guider dans le bon chemin. Je suis infiniment reconnaissant pour la confiance qu'elle m'a témoignée et pour les connaissances qu'elle m'a inculquées.

Par ailleurs, j'ai eu l'occasion de travailler aux côtés d'étudiant(e)s dynamiques et talentueux. Je les remercie pour leur soutien et leurs encouragements. Dre Chantal Forest m'a offert son temps sans le compter alors que je m'initiais à la paillasse. Sa serviabilité, son amabilité et son sens de l'humour font d'elle une personne des plus attachantes. La contribution qu'a amenée Christine Lepage à la réalisation des expériences de ce projet fut indispensable. Son organisation rigoureuse, son sourire chaleureux et son leadership sont appréciés de tous ceux qui la côtoient. Jean-Mathieu Leclerc est toujours présent au bon moment; j'ai rencontré une personne serviable, généreuse et amicale. Marilyne Bouchard est une personne agréable qu'on aime fréquenter pour son rire contagieux, son ouverture d'esprit et sa bonne humeur. Ce fut également un plaisir de travailler aux côtés d'Élise David, une collègue énergique dotée d'un esprit créatif. Je désire aussi remercier les stagiaires qui ont contribué à l'avancement de mon projet. De la même façon, je souhaite souligner l'apport inestimable de nos collaborateurs, en particulier Dr Michael McClelland, Dr Steffen Porwollik, Dr Nabil Arrach et Dr Sébastien Faucher.

En outre, je tiens à témoigner ma reconnaissance au corps professoral, au personnel administratif et technique ainsi qu'aux étudiant(e)s qui m'ont appuyé

tout au long de mon parcours académique. Pour l'accueil cordial qu'ils m'ont réservé, j'aimerais exprimer toute ma gratitude à Dr Ali Ahmad et son équipe. Mon maître de stage d'alors, Dr Alexandre Iannello, m'a fait découvrir avec passion le monde de la recherche et je l'en remercie sincèrement.

Je n'aurais pu mener ce projet à terme sans ma conjointe Julie Groleau. Cette femme que j'admire tant m'apporte l'équilibre nécessaire pour avancer jour après jour et je réalise qu'elle donne à ma vie tout son sens. Je la remercie profondément pour son amour, son réconfort et cette paix intérieure qu'elle me procure. Son intuition et son intelligence m'ont soutenu à maintes reprises.

Je souhaite remercier mes parents, Hélène et Patrice, de tout mon cœur pour leur amour inconditionnel, leurs encouragements et leurs belles surprises. Ils m'ont accompagné tout au long de ces nombreuses années d'études et m'ont offert les ressources nécessaires à mon cheminement et mon bien-être. De la même façon, je remercie les familles Sabbagh, Alarie, Groleau et Leblanc pour leur soutien et leur bienveillance dans les moments les plus heureux comme les plus difficiles. J'offre mes remerciements à mes ami(e)s, en particulier François Phimmachack, John Nahas, Nicolas Barbier, Alpha Coulibaly et Louis-Julien Gratton, pour les bons moments passés à apprécier les joies de la musique et à discuter des choses de la vie.

Enfin, je remercie les organismes subventionnaires pour leur appui financier lors de mes études supérieures : le Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie; la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales; le Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole; le Fonds de Recherche du Québec – Santé; et le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada.

CHAPITRE 1 – Introduction

Une multitude d'espèces bactériennes colonisent l'être humain sans jamais causer de maladies chez leur hôte. Ces bactéries du microbiote résident à travers l'organisme de l'individu (par exemple, au niveau de la peau, des muqueuses et de la lumière de l'intestin) et lui procurent équilibre, bonne santé et même protection contre d'autres microorganismes potentiellement pathogènes. Par contre, certaines bactéries causent des foyers d'infection chez l'individu et des pathologies de divers degrés, caractérisées par des symptômes d'importances variées. De telles maladies infectieuses provoquées par des bactéries constituent encore de nos jours un véritable fardeau pour le maintien de la santé des populations à travers le monde. Les bactéries considérées comme pathogènes envers l'être humain ne constituent qu'une faible portion de l'ensemble des espèces, mais paradoxalement, les maladies infectieuses causées par les micro-organismes constituent la deuxième plus grande cause de mortalité sur la planète selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Les pays industrialisés ont connu une baisse d'incidence de maladies infectieuses dans leurs populations au courant du 20^e siècle. Par contre, dans de nombreux pays en voie de développement, les maladies infectieuses demeurent la première cause de mortalité [1]. D'imposants supports financiers et technologiques sont de plus en plus fournis par les centres nationaux de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, visant à freiner l'apparition de nouveaux cas d'infection. Malgré cela, le développement et l'amélioration des moyens thérapeutiques de lutte contre ces maladies présentent encore un défi de taille. Le séquençage de génomes humains ou microbiens et l'attribution de fonctions aux gènes sont devenus nécessaires afin de mettre en lumière la susceptibilité des populations face à certaines infections, les mécanismes de virulence des agents pathogènes, ainsi que les outils de diagnostic, de vaccinologie et de traitements d'efficacité adéquate. Le 21^e siècle verra la création d'infrastructures médicales et de programmes de formation, par l'entremise desquels les percées scientifiques

pourront solutionner le problème récurrent des maladies infectieuses dans les pays en développement [2].

1.1 – Génétique évolutive de *Salmonella*

Salmonella est reconnue comme agent pathogène causant des maladies infectieuses depuis plus de 100 ans. Le genre *Salmonella* fut adopté en 1900 par le bactériologiste français Joseph Léon Marcel Lignières (1868-1933) en l'honneur du vétérinaire américain Daniel Elmer Salmon (1850-1914). C'est Theobald Smith (1859-1934), l'assistant de recherche de Salmon, qui découvrit et désigna en 1885 la première souche de *Salmonella*. Il l'isola d'un intestin de porc et la nomma *Salmonella cholerae suis*, reconnue aujourd'hui comme la bactérie *Salmonella enterica* sérovar Choleraesuis. Salmon et Theobald croyaient initialement avoir identifié l'agent causal du choléra porcine (d'où le terme « cholera-suis »), mais il fut déterminé par après qu'un virus était plutôt responsable de cette maladie animale [3-5].

Il s'agit d'une bactérie en forme de bâtonnet (ou bacille) droit à Gram-négatif, mobile (flagelles péritriches sur toute la surface bactérienne), de respiration aérobie facultative et non sporulée appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (entérobactéries ou bactéries entériques formant un groupe varié d'espèces commensales et pathogènes habitant généralement le tractus intestinal des animaux [6]). *Salmonella* est caractérisée selon l'antigène somatique lipopolysaccharidique O, flagellaire H et capsulaire Vi [7,8]. Son parasitisme intracellulaire facultatif lui permet de survivre et de se répliquer à l'intérieur des cellules de l'hôte malgré la panoplie de mécanismes antimicrobiens disponibles chez ces dernières [9]. L'hôte animal serait l'habitat principal de *Salmonella* et, à la sortie de ce réservoir, la bactérie est soumise à plusieurs stress au sein de l'environnement (disponibilité limitée des nutriments, pression osmotique, variation de température et pH, etc.) [10,11]. L'adaptation à cet environnement extérieur hostile lui permet un passage ultérieur vers un second hôte. Certains

vecteurs tels que les rongeurs, les insectes et certains oiseaux en contact avec des matériaux contaminés (excréments, nourriture, eau) contribuent grandement à la dissémination de *Salmonella* dans l'environnement hors de l'hôte [12-14]. Les territoires agricoles sont souvent des endroits susceptibles à la présence de *Salmonella*. Les légumes et fruits des récoltes (plus souvent les laitues, graines germées, melons, tomates, choux-fleurs, épinards et jeunes pousses) contaminés par l'épandage de fumier issu lui-même d'animaux d'élevage infectés par la bactérie représentent un problème récurrent dans l'industrie fermière [15-17]. En plus des hôtes d'origine animale, les plantes sont également reconnues comme hôtes de *Salmonella*. Il est démontré que plusieurs souches peuvent adhérer aux surfaces végétales et même coloniser les tissus des plantes. Ainsi, cette bactérie peut contaminer les fruits et légumes et représente le pathogène le plus fréquemment associé à des cas d'infection humaine contractée par consommation de ces aliments [18,19]. En plus des environnements terrestres, l'eau demeure également un important habitat pour cette bactérie. *Salmonella* est capable de s'y adapter avec succès, comparativement à d'autres genres bactériens. Les milieux aquatiques participent donc activement à la propagation de cette bactérie pathogène [10,20]. Plus particulièrement, il fut démontré que la présence de protozoaires (par exemple, les amibes) peut être associée avec une survie et persistance accrue de *Salmonella* [21-23]. Cela dit, ce type de microorganisme eucaryote ubiquitaire dans les environnements aquatiques et humides peut agir en tant que niche et véhicule pour *Salmonella* dans l'eau.

1.1.1 – Classification des sérovars

Le genre *Salmonella* est extrêmement variable et seulement quelques sérovars sont responsables de pathologies caractéristiques. Ces pathologies varient selon le sérovar et l'hôte (animal, humain ou végétal) ciblé lors de l'infection. Le système de classification taxinomique chez *Salmonella* se montre plutôt complexe et évolue continuellement (Tableau I). D'abord, le genre *Salmonella* se divise en deux espèces : *Salmonella bongori* (*S. bongori*) et *Salmonella enterica* (*S.*

enterica). L'espèce *S. enterica* se subdivise davantage en six sous-espèces : sous-espèce *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) et *indica* (VI) (*S. bongori* était initialement considéré comme la sous-espèce V, mais représente à présent une espèce distincte) [24,25]. À l'aide du système de sérotypage de Kauffmann et White, les souches de *Salmonella* sont classifiées en sérogroupes selon l'antigène somatique lipopolysaccharidique O (plus de 60 motifs sont recensés chez *S. enterica* [26]) et en sérovars (ou sérotypes) selon l'antigène O et l'antigène flagellaire H ensemble, lors de l'agglutination de la bactérie avec un sérum spécifique [27-29]. Seuls les sérovars de la sous-espèce *enterica* portent un nom, alors que ceux des autres sous-espèces de *S. enterica* et de *S. bongori* sont nommés selon leur formule antigénique (par exemple, *S. enterica* sous-espèce *arizonae* sérovar 62:z4,z23:-) [28]. Présentement, près de 2600 sérovars de *Salmonella* ont été identifiés, dont la majorité (plus de 1500) fait partie de l'espèce *S. enterica* sous-espèce *enterica*. La plupart des souches isolées chez l'être humain et les animaux à sang chaud appartiennent à la sous-espèce *enterica*. En fait, 99% de tous les isolats cliniques chez l'humain et les animaux à sang chaud proviennent d'environ 50 sérovars appartenant tous à la sous-espèce *enterica* [30]. Par ailleurs, les souches des autres sous-espèces de *S. enterica* et de *S. bongori* colonisent typiquement, toutefois pas exclusivement, les animaux à sang froid [28,31].

Espèce	Sous-espèce (#)	Hôte animal colonisé	Nombre de sérovars
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	sang chaud (dont l'humain)	1531
	<i>salamae</i> (II)	sang froid	505
	<i>arizonae</i> (IIIa)	sang froid	99
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	sang froid	336
	<i>houtenae</i> (IV)	sang froid	73
	<i>indica</i> (VI)	sang froid	13
			2557
<i>S. bongori</i>	(V)*	sang froid	22
Total			2579

*Ancienne nomenclature.

Tableau I. Nombre de sérovars répertoriés chez *Salmonella*. Adapté de [28].
 Nombre de sérovars identifiés jusqu'à présent parmi les sous-espèces de *S. enterica* et chez *S. bongori*, en fonction du système de classification de Kauffmann et White [24,25].

1.1.2 – Génomes de *Salmonella*

Le nombre croissant de génomes bactériens séquencés ainsi que le développement d'outils de biologie moléculaire et de bio-informatique efficaces ont révélé l'apparition, la disparition et la réapparition de séquences d'ADN chez des espèces étroitement apparentées. Ce « flux génétique » caractéristique des génomes de *Salmonella* a été le sujet de nombreuses recherches, car il traduit les spectres d'hôtes variés et les manifestations cliniques distinctes des différentes souches [32,33]. Les séquences génomiques complètes de plusieurs sérovars de *Salmonella* sont déjà achevées et d'autres sont en voie d'être obtenues [34]. Les

génomés d'autres entérobactéries telles que *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* (*E. coli*) ont également été séquencés (ou partiellement) et comparés aux séquences génomiques de *Salmonella*. Cela a révélé des insertions relativement récentes de segments d'ADN chez *Salmonella* [33]. Les génomes de différents sérovars sont fréquemment comparés, notamment ceux de *Salmonella enterica* sérovar Typhi (*S. Typhi*) et *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), les deux sérovars pathogènes les plus importants et les plus familiers chez *Salmonella* [35]. Cela permet de cerner les traits génétiques uniques chez chacun de ces sérovars qui expliqueraient leurs spectres d'hôtes et signes cliniques spécifiques.

L'ordre et la séquence des gènes sont en général bien conservés entre les sérovars Typhimurium et Typhi [36,37], à l'exception de certaines régions modifiées à la suite de réarrangements génétiques par recombinaison entre des opérons encodant de l'ARN ribosomal (ARNr) [38,39] ou entre des séquences d'éléments insertionnels (IS200) [40] chez le sérovar Typhi. Cette synténie représente le génome « central » retrouvé chez toutes les souches de *Salmonella* et ne diffère que d'environ 1% entre les sérovars Typhimurium et Typhi [41]. Composé des gènes de maintenance (ou *housekeeping genes*), le génome central assure les fonctions métaboliques essentielles dans le cycle de vie de la bactérie. Cette portion centrale est intercalée de segments uniques à une souche ou à un sérovar qui constituent cette fois le génome « accessoire ». Celui-ci offre un avantage compétitif à la bactérie, lui permettant d'accéder à des niches spécialisées ou d'obtenir un pouvoir pathogène [42,43]. Chez les sérovars Typhimurim et/ou Typhi, ces régions accessoires sont marquées par l'insertion de grands îlots d'ADN étranger, tels que des prophages ou des îlots de pathogénicité allant d'environ 10 kilobases (kb) jusqu'à 130 kb. On note aussi une importante quantité d'insertions et de délétions plus courtes d'ADN chez un sérovar par rapport à l'autre. Ces insertions et délétions impliquent souvent des séries de plusieurs gènes ou des opérons (de 3 gènes consécutifs ou plus) et représentent rarement un seul gène. Par exemple, on retrouve bonne quantité d'insertions et délétions de

séquences d'ADN comprenant 10 gènes ou moins (145) et quelques-unes de 20 gènes ou plus (12) chez *S. Typhi* lorsque comparé à *S. Typhimurium*. Par contre, on note relativement peu d'insertions comprenant qu'un seul gène : *S. Typhi* possède 42 insertions de gènes qui sont uniques à ce sérovar par rapport à *S. Typhimurium* [37]. Les plus courtes séries de gènes (10 ou moins) représentent des éléments associés au génome accessoire, tels que des toxines, des adhésines et même souvent des opérons fimbriaires, des systèmes de transport et de métabolisme des sucres ainsi que des enzymes de restriction/modification [37].

1.1.2.1 – Structure et évolution de la génétique des populations

L'étude de la structure et de l'organisation des génomes de *Salmonella* permet de mieux comprendre comment les différents sérovars de *Salmonella* sont nés et comment ils ont évolué. Comparativement à la bactérie *Buchnera aphidicola* qui présente la plus grande stabilité génomique jamais observée (aucun réarrangement chromosomique, duplication de gène ou transfert horizontal depuis les dernières 50 à 70 millions d'années), *E. coli* et *Salmonella*, les bactéries les plus étroitement associées au point de vue génétique, possèdent des génomes 2000 fois plus labiles [44]. *Salmonella* présente un « pan-génome » (regroupant le génome central et accessoire) dit « ouvert » qui est caractéristique des espèces aptes à occuper différents environnements et disposant de plusieurs mécanismes d'échange de matériel génétique. Un pan-génome « fermé » est typique des espèces se retrouvant dans des niches plutôt confinées, où l'acquisition de gènes par échange est peu fréquente [45].

Au sein d'une population microbienne en expansion, les cellules se reproduisent asexuellement par fission binaire. Une mutation génétique qui apparaît chez une cellule mère sera donc transmise aux cellules filles et cela apportera variabilité et diversité parmi l'ensemble des clones obtenus. Les bactéries peuvent également échanger du matériel génétique entre elles. Cela se produit par recombinaison homologue entre des fragments de matériel génétique suite à un transfert horizontal réalisé par conjugaison, transduction ou

transformation (ces mécanismes seront décrits davantage plus loin). Ce phénomène permet un échange de matériel chromosomique entre bactéries de lignées clonales différentes, augmentant ainsi la diversité génétique au sein d'une population bactérienne constituée de plusieurs lignées clonales. Alors que certaines espèces comme *Helicobacter pylori* et *Neisseria* spp. sont plus propices aux évènements de recombinaison [46-48], les premières études à ce sujet chez *S. enterica* démontraient que la recombinaison est un phénomène rare chez cette espèce qui était plutôt considérée comme hautement clonale [25,49-59].

Cependant, les études plus récentes contredisent la nature clonale de *Salmonella*, en relevant des signes de recombinaison au niveau des gènes de maintenance trouvés chez toutes les sous-espèces de *S. enterica* et chez *S. bongori*, ainsi qu'auprès des gènes d'adhésines fimbriaires, d'invasion et chez le gène *mutS* [60]. Les résultats démontrent que les évènements de recombinaison entre la sous-espèce *enterica* et les autres sous-espèces de *S. enterica* sont effectivement rares, mais qu'ils sont significativement fréquents entre les souches de la sous-espèce *enterica* (ce qui pourrait très bien s'appliquer aux autres sous-espèces de *S. enterica* et à *S. bongori*) [61-65]. Dans l'ensemble, les résultats cumulatifs permettent de conclure que le transfert horizontal et la recombinaison du moins au niveau de gènes associés aux antigènes de surface bactérienne ont marqué de manière importante l'évolution de *Salmonella* [49,50,66-72]. Effectivement, les séquençages génomiques réalisés auprès de *S. Typhimurium* et *S. Typhi* de la sous-espèce *enterica* révèlent une portion génétique de 10% qui est spécifique à chaque sérovar, un important indice de l'application du transfert horizontal durant l'évolution de *Salmonella* [33,36,37]. En somme, les observations contradictoires opposant « clonalité » et « recombinaison » au sein des populations de *Salmonella* pourraient s'expliquer par un système de réparation des mésappariements (ou *mismatch repair system*) ayant fait défaut et par une série intensive de recombinaisons, à plusieurs moments au cours de son évolution [65,73,74].

Alors qu'une diversité génétique significative est observée auprès du sérovar Typhimurium, c'est plutôt une population clonale qui caractérise le sérovar Typhi [75]. Chez ce pathogène dont l'hôte unique est l'être humain, les divers isolats cliniques à travers le globe démontrent une très faible variabilité génétique entre eux et seraient issus d'une seule et même souche apparue il y a environ 50 000 ans [76,77] (toutefois, des évidences démontrent que cette valeur aurait possiblement été surestimée [78]). Au sein d'une échelle de temps aussi courte d'un point de vue évolutif, les possibilités pour cette bactérie d'accumuler de la diversité génétique deviennent potentiellement réduites [41,76,77,79]. Il arrive d'ailleurs fréquemment que des pathogènes spécifiques à l'Homme soient de nature clonale [80]. Tel qu'il sera expliqué plus loin dans cet ouvrage, l'évolution des populations du sérovar Typhi est principalement marquée par la dégradation de son génome suite à l'inactivation fonctionnelle de certains gènes au cours de l'adaptation à son hôte humain [81].

1.1.2.2 – Transfert horizontal d'éléments mobiles

L'assortiment d'ilots de pathogénicité, d'opérons fimbriaires et de gènes de biosynthèse capsulaire chez *S. enterica* démontre que la distribution des facteurs de virulence parmi les différentes souches s'est effectuée par transfert horizontal. Ce mécanisme aurait potentiellement mené à l'adaptation des sérovares dans leurs hôtes respectifs. D'autre part, des délétions de séquences d'ADN et des mutations ponctuelles auraient modifié cette spécificité d'hôte au fil de l'évolution [33,82]. Le « transfert génétique horizontal » (ou latéral) désigne le transfert de matériel génétique entre des bactéries appartenant à différentes espèces (ou même à différents genres) [83,84]. C'est un processus essentiel au développement de variabilité génétique chez une espèce bactérienne en évolution, lui permettant de s'adapter aux changements environnementaux [84]. Ce phénomène est particulièrement crucial chez une bactérie pathogène en devenir, lui permettant de passer d'un état non virulent à un état virulent par le gain de facteurs de virulence [85]. Par exemple, environ 28%, 30% et 25% des séquences codantes chez *S.*

Typhimurium, *S. Typhi* et *Salmonella enterica* sérovar Paratyphi (*S. Paratyphi*) A, respectivement, proviendraient d'évènements de transfert horizontal putatifs [86]. L'acquisition de matériel génétique par transfert horizontal s'effectue en grande partie à l'aide de trois importants mécanismes chez les bactéries : la conjugaison (qui nécessite un contact physique entre les bactéries [87]), la transduction (par l'entremise d'un bactériophage pour le transfert d'information génétique [88]) et la transformation (qui permet l'assimilation de matériel génétique libre dans l'environnement [87]) [42,84,89]. Les « éléments génétiques mobiles », c'est-à-dire des segments d'ADN encodant des protéines importantes pour les déplacements de ces segments au sein d'un génome ou entre des génomes bactériens, représentent des substrats majeurs du transfert horizontal [85,89,90]. Chez *S. enterica*, des îlots (>10 kb) et îlets (<10 kb) de pathogénicité, des plasmides, des transposons (ou Tn), des séquences d'éléments insertionnels, des prophages fonctionnels et des vestiges de phages sont des éléments mobiles acquis par transfert horizontal ayant contribué significativement à la diversité génétique de cette espèce et à l'obtention de son caractère pathogène [33,42,91-93]. Typiquement, ces éléments mobiles issus de sources externes ont un contenu en guanine (G) et en cytosine (C) (G+C) différent du reste du génome, font usage de codons différents et renferment des gènes (transposases ou intégrases) servant au déplacement des éléments mobiles [42,94]. Chez *Salmonella*, c'est principalement l'acquisition d'îlots de pathogénicité comme éléments mobiles qui lui ont permis de se convertir en pathogène intracellulaire facultatif au fil de l'évolution [91]. D'autre part, la composition en prophages est considérée comme l'un des plus importants facteurs distinguant les génomes de différents sérovars, mais différenciant surtout les souches au sein d'un même sérovar [36,37,95-100]. L'analyse d'éléments prophagiques au sein des génomes représente une méthodologie relativement nouvelle pour le typage de souches de *Salmonella* [99,100]. Dans l'ensemble, diverses souches de *Salmonella* se sont adaptées à des niches spécialisées grâce à l'insertion dans leurs génomes d'éléments mobiles portant des gènes avantageux pour compétitionner dans ces environnements. Le

transfert de tels gènes entre espèces et genres bactériens divers permet la naissance de nouvelles souches potentiellement pathogènes, notamment au sein de populations bactériennes densément peuplées et différenciées [85].

1.1.2.3 – Divergence à partir d'*Escherichia coli*

Au niveau génétique, *E. coli* représente le genre bactérien le plus étroitement rapproché de *Salmonella*. Il y a environ 100 à 150 millions d'années (corrélant approximativement avec l'apparition des premiers mammifères [4]), ces deux bactéries auraient divergé à partir d'un même ancêtre commun [101,102]. Les processus évolutifs suivant cette divergence expliqueraient la mince portion de 10% qui diffère entre les génomes centraux (gènes de maintenance) d'*E. coli* et *S. enterica* [41]. L'alignement des génomes séquencés de *S. Typhimurium* (souche LT2), *S. Typhi* (souche CT18) et *E. coli* (souche commensale K12 et souche pathogène O157:H7) montrent une conservation marquante de l'ordre et du contenu des gènes (entre 2500 et 3100 gènes orthologues partagés, ce qui représente 50 à 70% du génome entier dépendamment de la méthodologie empruntée pour l'évaluation). On observe donc une véritable synténie ou colinéarité au niveau du génome central (à l'exception de quelques inversions au niveau des terminus de répllication des génomes de ces bactéries) [36,103-106]. Cette constatation confirme la notion stipulant que la signature chromosomique des entérobactéries aurait été fixée très tôt dans leur évolution et maintenue depuis [41,101,102]. Cependant, malgré que ces séquences du génome central soient conservées entre *E. coli* et *Salmonella* au niveau de leur composition nucléotidique, il demeure incertain si ces gènes ont maintenu le même rôle fonctionnel chez une bactérie par rapport à l'autre [107]. Effectivement, ces séquences résident au sein de contextes génomiques différents et leurs fonctions peuvent dépendre des gènes accessoires spécifiques à chaque microorganisme. Par ailleurs, l'expression des gènes du génome central varie selon le mode de vie et la niche occupée par la bactérie au cours de son évolution [108-111]. Ce phénomène se produit typiquement lorsque le réseau de régulation contrôlant un gène en

particulier est modifié par le gain ou la perte d'un facteur de régulation qui agit sur ce réseau [112,113]. De manière intéressante, il fut déterminé en comparant le génome d'*E. coli* à celui de *S. Typhimurium* qu'environ le quart des gènes conservés dans le génome central présente une divergence au niveau de leur expression. Plus précisément, les gènes encodant des protéines impliquées dans des processus cellulaires importants sont plus susceptibles de conserver le même profil d'expression chez les deux bactéries. Cependant, plusieurs gènes responsables de mécanismes métaboliques divers sont régulés différemment même s'ils ont lieu chez les deux microorganismes, tels que ceux associés à l'adhésion cellulaire, à la respiration anaérobie, au métabolisme des acides aminés et à celui du soufre [114].

Parmi les séquences d'ADN transmises horizontalement chez des sérovars tels que Typhimurium, Typhi et Paratyphi A, de 35 à 40% d'entre elles auraient été acquises très tôt après la divergence des bactéries *Salmonella* et *E. coli* (celles-ci représenteraient potentiellement le génome accessoire ayant permis à *Salmonella* l'accès à de nouvelles niches spécialisées). De plus, de 60 à 70% des gènes transférés horizontalement auraient été reçus suite à la divergence entre *Salmonella* et *E. coli*, mais avant la division de *S. enterica* en différentes sous-espèces (exposant le concept que de 60 à 70% des transferts horizontaux chez *S. enterica* seraient partagés à travers la majorité de ses sous-espèces) [86]. Ce gain de matériel génétique aurait contribué à l'évolution de *Salmonella* vers une bactérie capable d'infecter activement son hôte, de s'y adapter et de le rendre malade. De son côté, *E. coli* aurait fait l'acquisition d'environ 18% de son génome par transfert horizontal suivant sa divergence de *Salmonella* [115].

Tel que prédit, les alignements de séquences démontrent que le contenu génomique du sérovar Typhi est davantage apparenté à celui du sérovar Typhimurium qu'à celui de la bactérie *E. coli* [36,37]. L'analyse comparative des séquences génétiques de *S. Typhi* et d'*E. coli* souches K12 [116] et O157:H7 [104] dévoile une vaste diversité des gènes accessoires, disposés plutôt discrètement à

travers les chromosomes sous forme de séries ou groupes de plusieurs gènes consécutifs (*clusters*) [37].

1.1.2.4 – Pseudogènes

Les pseudogènes représentent des séquences codantes qui sont putativement inactivées suite à des mutations de type non sens et de décalage du cadre de lecture (ou *frameshift*) (ces dernières sont les principales causes) ainsi qu'à des délétions (tronquage et réarrangement génomique) [117]. Ils sont principalement identifiés lors de l'annotation des génomes séquencés grâce à des prédictions informatisées (ou dites *in silico*). Certains pseudogènes peuvent cependant contourner leur défaut de lecture par « reprogrammation » (ou *recoding*) afin de traduire avec succès leur séquence [118]. Les mécanismes de reprogrammation incluent le « décalage reprogrammé du cadre de lecture » (ou *reprogrammed frameshifting*) et la « redéfinition de codon » (ou *codon redefinition*). Le premier utilise une conformation alternative du ribosome qui « glissera » par-dessus le site aberrant et le deuxième recrute un acide aminé particulier (sélénocystéine ou pyrrolysine) au codon non sens [119-122]. Ces deux mécanismes de reprogrammation ont été observés chez *Salmonella* [118].

La formation de pseudogènes contribue grandement à la dégradation du chromosome (un processus naturel et normal au sein de l'évolution) et demeure plus fréquente auprès des pathogènes adaptés à un seul hôte (ou un très petit groupe d'hôtes) que chez ceux infectant un large spectre d'hôtes. Ce concept est observé chez plusieurs pathogènes à spectre d'hôtes limité [36,37,123-126]. Le sérovar généraliste Typhimurium possède une quarantaine de pseudogènes (<1% du génome), alors que les sérovars humain spécifique Typhi (dont de multiples isolats cliniques [79]) et Paratyphi A en ont plus de 200 (5% du génome) et les sérovars hôte spécifique Choleraesuis et Paratyphi C en possèdent chacun environ 150 (3% du génome) [37,127-130]. De plus, le sérovar Gallinarum, qui infecte comme hôte la volaille, possède un répertoire de pseudogènes plus volumineux que le sérovar à large spectre d'hôtes Enteritidis qui lui est apparenté [131]. Chez

le sérovar Typhi, les différentes souches séquencées ont un répertoire de pseudogènes très similaire et la plupart sont inactivés par les mêmes mutations, ce qui renforce la caractéristique clonale de ce sérovar [37,79,127]. Pour le moins surprenant, la plupart des pseudogènes du sérovar Typhi sont des gènes présents et fonctionnels chez *S. Typhimurium* [36], qui encodent des protéines impliquées dans la pathogenèse de ce dernier [132]. Les bactéries colonisant un seul hôte, ou seulement quelques-uns, ne sont pas confrontés aux divers environnements complexes auxquels les généralistes font face, et cela expliquerait pourquoi elles n'ont pas à maintenir un aussi grand répertoire de gènes actifs dans leurs génomes. Les pseudogènes reflèteraient donc des fonctions inutiles pour la bactérie [118].

Parmi les quelque 200 pseudogènes des sérovats Typhi et Paratyphi A, seulement 66 sont partagés entre les deux. Parmi ces 66 pseudogènes partagés, 44 sont inactivés par les mêmes mutations chez les deux sérovats [117]. Les pseudogènes communs aux deux sérovats comprennent des gènes importants pour la gastro-entérite chez l'hôte, une manifestation clinique qui n'est pas associée à l'infection par ces sérovats [133]. De plus, 20 de ces pseudogènes communs encodent des protéines de surface ou sécrétées. Par ailleurs, on observe plusieurs cas de voies signalétiques communes aux deux sérovats qui sont inactivées par des pseudogènes différents. Malgré la nature différente des pseudogènes inactivant la voie signalétique, la perte de fonction qui en résulte resterait similaire chez les deux sérovats. Les pseudogènes de ces sérovats sont considérés des facteurs susceptibles d'avoir contribué au phénotype de restriction d'hôte qui leur est attribué [130].

Le sérovar Typhi est considéré comme une entité bactérienne plutôt récente au point de vue évolutif [76,77] et, de manière surprenante, son génome comporte tout de même une portion significative de pseudogènes. En stipulant que les pseudogènes ont commencé à apparaître lorsque la bactérie s'est adaptée à l'Homme, on peut prévoir dans plusieurs autres années l'inactivation de gènes supplémentaires qui sont sans importance chez l'hôte pour le moment [134]. En

effet, le séquençage de divers isolats récents des sérovars Typhi et Paratyphi A a révélé un nombre significatif de pseudogènes nouvellement formés par rapport aux premières souches séquencées. Ces pseudogènes de type souche spécifique seraient apparus à partir de leur ancêtre respectif chez les sérovars Typhi ou Paratyphi A et sont d'origine plus récente que les pseudogènes communs à l'ensemble d'un sérovar. L'adaptation et l'évolution de ces sérovars chez leur hôte unique seraient donc toujours en cours et on peut s'attendre à recenser un nombre croissant de pseudogènes spécifiques à de nouvelles souches à mesure que des génomes seront séquencés. Cette variabilité au niveau du profil de pseudogènes expliquerait comment la morbidité et la gravité de la maladie sont parfois influencées par l'isolat clinique contracté [79,117].

Il a été déterminé que les pseudogènes les plus récents (atteints d'une seule mutation) dans l'évolution sont plus susceptibles d'être éliminés du génome de *Salmonella* par des processus de délétion de séquence. Les pseudogènes plus anciens (hautement mutés) auraient persisté dans le génome grâce à leur faible efficacité de transcription et leur association à des régulateurs, de sorte qu'aucune traduction en protéines toxiques ou coût énergétique inutile ne leur est attribuée [135]. En concordance avec ce concept, une étude transcriptomique chez le sérovar Typhi a révélé que l'ensemble des pseudogènes est faiblement exprimé [136].

1.2 – Pathologies associées à *Salmonella*

La plupart des quelque 2600 sérovars de *Salmonella* ne sont pas pathogènes au sein de leur hôte naturel. Seulement quelques-uns d'entre eux sont responsables de pathologies notables, telles que l'ostéomyélite (infection et inflammation d'os ou de moelle osseuse [137]), l'abcès splénique (de la rate) et la septicémie (infection généralisée de l'organisme, notamment via le sang) [138].

Deux pathologies reliées à *Salmonella enterica* sont de grandes importances en matière de santé publique mondiale et seront décrites en détail : la

gastro-entérite, généralement causée par les sérovars Typhimurium et Enteritidis (d'autres sérovars peuvent cependant engendrer cette pathologie), et la fièvre typhoïde (une fièvre entérique), dont l'agent causal est le sérovar Typhi. De plus, *S. Paratyphi* A, B et C sont responsables de la fièvre paratyphoïde : une fièvre entérique moins fréquente que la fièvre typhoïde dans les régions en développement, mais cliniquement similaire [139,140]. Celle-ci sera abordée plus brièvement à la fin de cette section.

1.2.1 – La gastro-entérite

L'infection par les sérovars non typhoïdiques de *Salmonella* (*Nontyphoidal Salmonella* ou NTS), dont les exemples typiques sont Typhimurium et Enteritidis, provoque habituellement une diarrhée autolimitante aiguë, de faible gravité clinique, dans les secteurs développés et industrialisés du globe. Cependant, une invasion plus profonde des tissus par les NTS qui engendre une bactériémie avec apparition de foyers d'infection est à présent rencontrée dans les régions en développement, notamment chez les jeunes enfants, les personnes âgées et les individus immunosupprimés [141]. La gastro-entérite apparaît habituellement suite à une période d'incubation de moins de 24 heures [142]. Elle se contracte par consommation de nourriture ou d'eau contaminée et les symptômes incluent une fièvre, des frissons, des nausées, des vomissements, des crampes abdominales et une diarrhée. Des complications plus graves comprennent une bactériémie, une méningite et une infection d'os ou de jointures. La dose infectieuse nécessaire pour rendre malade un adulte en bonne santé varie entre 10^6 et 10^8 microorganismes NTS viables [143]. La maladie touche fréquemment les jeunes enfants, particulièrement ceux âgés de 2 ans et moins [144].

1.2.1.1 – Épidémiologie

Une étude épidémiologique récente estime que 93.8 millions de cas d'infection et 155 000 décès sont associés à une gastro-entérite générée par les NTS à chaque année sur la planète [145]. Plusieurs NTS représentés par les

sérovars Typhimurium, Enteritidis, Newport, et Heidelberg ont des réservoirs parmi les espèces d'animaux d'élevage utilisés en agriculture [138,146]. Ils représentent donc les principaux agents causals d'empoisonnements alimentaires dans les secteurs développés du monde. Dans l'ensemble, les sérovars Enteritidis et Typhimurium constituent la première et deuxième plus grande cause de salmonellose reliée à une consommation de nourriture contaminée chez l'être humain, respectivement [147]. Aux États-Unis uniquement, on rapporte annuellement jusqu'à 1.4 million de cas de gastro-entérite causés par les NTS, dont 600 cas représentent des infections mortelles [146]. Les NTS sont également reconnus comme d'importants pathogènes responsables de bactériémies sévères en Afrique [148]. Effectivement, certains sérovars qui engendrent une gastro-entérite dans les pays développés sont responsables d'infections invasives en Afrique. Les raisons expliquant ce phénotype invasif ne sont pas clairement définies, mais certains éléments tels que la séropositivité au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), l'usage antérieur d'antibiotiques, l'anémie à cellules falciformes et la malaria rendraient les Africains plus susceptibles aux NTS invasifs. De plus, le bas âge (ou l'enfance) serait également un facteur augmentant les risques de contracter une salmonellose invasive, indépendamment du sérovar responsable de l'infection [149]. En plus des sérovars Typhimurium et Enteritidis, les sérovars Choleraesuis, Dublin et Virchow sont de plus en plus associés aux infections invasives et des cas liés à des centaines d'autres sérovars, moins fréquents cependant, ont également été relevés [150]. Les NTS sont généralement contractés chez l'Homme par l'entremise de vecteurs zoonotiques (animaux vers l'être humain) au sein de la chaîne alimentaire. Certaines évidences montrent que le contact d'humain à humain constitue aussi un important mode de transmission [151-153]. Des facteurs environnementaux saisonniers contribueraient également à la dissémination de la maladie en Afrique [151,154-156]. De plus, des cas de porteurs asymptomatiques ont été répertoriés chez des enfants colonisés par des NTS [157].

Des souches multirésistantes aux antibiotiques sont présentes dans différentes régions du monde, telles que la *Definitive Phage Type 104* (DT104) du sérovar Typhimurium. Celle-ci, tout comme d'autres souches chez les sérovars Typhimurium, Enteritidis et Virchow, se sont montrées résistantes à des drogues antimicrobiennes telles que l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, les sulphonamides, la tétracycline et l'acide nalidixique. Des résistances face à plusieurs fluoroquinolones (par exemple, la ciprofloxacine) et céphalosporines à large spectre d'action sont également apparues dans divers secteurs endémiques du globe. Des mutations (3 ou 4) au niveau de gènes associés à la gyrase (sous-unité A encodée par *gyrA*) et à la topoisomérase IV (sous-unités A et B encodées par *parC* et *parE*, respectivement) ont été reliées aux mécanismes de résistance, notamment envers la ciprofloxacine. Des plasmides de résistance portés par certaines souches ont également été observés. Ces vecteurs encodent des protéines protégeant la gyrase ou des enzymes inactivant les antibiotiques tels que la ciprofloxacine [141,158-160].

1.2.1.2 – Moyens thérapeutiques

L'administration d'antibiotiques n'est généralement pas nécessaire dans le cas de diarrhée associée aux NTS, mais demeure d'une importance capitale pour la guérison lors d'infections invasives plus graves. L'apparition de souches multirésistantes aux antibiotiques de première génération a mené à l'utilisation de fluoroquinolones comme molécules de choix pour combattre les NTS [141].

La création d'un vaccin immunisant contre les NTS demeure une tâche compliquée, car divers sérovars font partie de ce groupe de pathogènes. Cependant, les sérovars Typhimurium et Enteritidis demeurent les principaux sérovars associés à la majorité des cas d'infection aux NTS rapportés en Afrique subsaharienne [148]. Les avancées de recherche dans ce domaine n'ont pas encore permis d'essais cliniques auprès de volontaires humains, mais des évaluations de vaccins candidats auprès de modèles murins ont été entreprises. Les « vaccins conjugués » sont caractérisés par la conjugaison de l'antigène à une « protéine

porteuse » qui confère son caractère immunogénique à cet antigène afin d'augmenter la réactivité du vaccin. Un tel vaccin comprenant l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS) et la flagelline de *Salmonella* est en évaluation chez la souris dans le but d'immuniser contre une infection invasive par le sérovar Enteritidis [161]. De plus, des souches atténuées mises au point chez les sérovares Typhimurium et Enteritidis ont montré une réactivité significative auprès de souris immunisées avec ces souches [162-165]. L'usage de protéines de membrane externe (*Outer Membrane Protein* ou OMP) en tant qu'antigènes pour créer un vaccin s'est montrée prometteuse : ces antigènes semblent démontrer un pouvoir potentiellement immunogénique chez les souris testées [166].

1.2.2 – La fièvre typhoïde

La fièvre typhoïde représente une maladie ancienne bien documentée au fil de l'histoire de l'humanité : Alexandre le Grand (356-323 av. J.-C.) mourra de ce que l'on soupçonne être une infection par le sérovar Typhi de *Salmonella* [167] et des examens de pulpe dentaire ancienne ont identifié la fièvre typhoïde comme cause de la peste d'Athènes (430-424 av. J.-C.) [168]. C'est au médecin anglais Thomas Willis (1621-1675) qu'on attribue la première description de la maladie en 1659, qu'il associa à la présence d'ulcères chez l'iléon d'individus malades [4,169]. Le terme « fièvre typhoïde » fut finalement adopté en 1829 par le médecin français Pierre Charles Alexandre Louis (1787-1872). Le terme « typhoïde » signifie « ressemblant au typhus ». Le terme « typhus » provient du mot grec *typhos* ou « torpeur » et désigne une maladie causée par la bactérie *Rickettsia* qui était souvent confondue avec la fièvre typhoïde, jusqu'à leur distinction définitive au milieu des années 1800. En 1880, le bactériologiste allemand Karl Joseph Eberth (1835-1926) soupçonna un microorganisme en forme de bâtonnet, observé chez la rate et les ganglions lymphatiques des patients atteints de fièvre typhoïde, d'être l'agent causal de la fièvre typhoïde. C'est en 1884 que le bactériologiste allemand Georg Theodor August Gaffky (1850-1918; un assistant du célèbre microbiologiste allemand Robert Koch) isola et mis en culture pure le sérovar

Typhi à partir de rates de patients infectés. Il confirma ainsi l'observation initiale d'Eberth et ce dernier fut reconnu pour la découverte de cette bactérie [4]. Georges-Fernand-Isidor Widal (1862-1929), un médecin français, développa en 1896 un test d'agglutination qui simplifia le diagnostic d'infection par le sérovar Typhi. Il désigna le terme « agglutinine » pour décrire l'agrégation en amas de bactéries du sérovar Typhi inactivées par la chaleur, d'où la « réaction de Widal ». Ce test performé avec le sérum sanguin du patient infecté est d'ailleurs encore utilisé aujourd'hui comme outil de diagnostic [4,169]. Le cas de fièvre typhoïde le plus fameux demeure sans doute celui de la première porteuse asymptomatique diagnostiquée aux États-Unis, *Typhoid Mary* (de son vrai nom Mary Mallon; 1869-1938) : elle aura été responsable de 51 cas de fièvre typhoïde (dont 3 décès) au courant de sa carrière comme cuisinière dans la ville de New York [170].

La fièvre typhoïde est contractée par ingestion d'eau ou de nourriture contaminée par des individus infectés excréant la bactérie (contamination fécale-orale) [133]. Une dose orale d'au moins 10^5 bactéries viables est nécessaire pour le développement d'une fièvre typhoïde chez 50% des individus infectés, tel que démontré auprès de volontaires lors d'essais cliniques [171]. La période d'incubation de la maladie se situe habituellement entre 7 et 21 jours, mais peut varier considérablement vers des extrêmes allant de 3 à 60 jours, dépendamment de l'inoculum et de l'état du système immunitaire de l'hôte [133,172]. Le diagnostic de la maladie s'effectue par isolation de la bactérie à partir du sang, des selles ou de la moelle épinière de l'individu atteint. Développé depuis 1896 et encore utilisé dans certains pays, le test de Widal détecte, dans le sérum de la personne malade, la présence d'anticorps spécifiques envers *S. Typhi*. D'autres méthodes de diagnostic sont également employées selon la région endémique, dont des tests avec réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR). Ces tests sont effectués à l'aide d'amorces spécifiques reconnaissant des régions uniques au sérovar Typhi et permettent même de distinguer la souche impliquée dans l'infection [172,173]. Les symptômes de la maladie incluent une forte fièvre, des frissons, des malaises abdominaux, des maux de tête, une perte

d'appétit, des nausées, des douleurs musculaires, une toux sèche et de la léthargie [133]. Toutefois, de 60 à 90% des personnes atteintes de fièvre typhoïde à travers le monde ne reçoivent aucune assistance médicale, ou sont au mieux traités par consultation médicale sans hospitalisation [174,175]. Des complications peuvent se produire dans 10 à 15% des cas. Il s'agit principalement d'hémorragie gastro-intestinale, de perforation intestinale et d'encéphalopathie [133]. La réponse immunitaire acquise suite à l'infection ne protège pas nécessairement contre une rechute ou une réinfection par la bactérie. Une rechute peut avoir lieu chez 5 à 10% des individus ayant guéri d'une fièvre typhoïde [176,177]. De plus, certains rapports cliniques soulignent des cas de réinfection par le pathogène suite à la guérison de la maladie. Ce phénomène pourrait être dû à une incapacité chez ces individus de développer une réponse immunitaire suffisante envers la bactérie [178].

1.2.2.1 – Épidémiologie

Au courant des années 1820, le médecin français Pierre-Fidèle Bretonneau (1778-1862) déclara la fièvre typhoïde comme une maladie contagieuse. Le médecin et épidémiologiste anglais William Budd (1811-1880) détermina en 1873 que la transmission bactérienne s'effectue par voie fécale-orale [4,179]. Plus tard au 19^e siècle, les experts identifièrent les réseaux d'alimentation en eau des villes américaines comme bassin de contamination par la bactérie. La maladie représentait une pathologie domestique courante retrouvée à travers le monde, indiscernable par rapport à d'autres maladies aux symptômes similaires [169]. L'amélioration de la qualité de l'eau potable par filtration et chloration dans les principaux centres urbains au début du 20^e siècle mena à une importante réduction (>90%) des cas de mortalité associés à la maladie [180]. Par après, les mesures prises par les organismes de santé publique ont grandement contribué à contrôler et maintenir les cas de fièvre typhoïde (pasteurisation du lait, investigations des cas d'infection et d'épidémies avec hospitalisation des individus atteints,

programmes d'immunisation et restrictions professionnelles auprès des porteurs asymptomatiques) [181].

Au début des années 1980, on répertoriait annuellement plus de 16 millions de cas de fièvre typhoïde et environ 600 000 décès associés à la maladie [182-184]. Les données furent ensuite mises à jour grâce à des méthodes d'évaluation plus précises, dans le but d'offrir un portrait épidémiologique plus précis de cette pathologie. Ces nouvelles statistiques estiment l'incidence de la maladie à plus de 21 millions de cas et la placent responsable d'environ 216 000 décès lors de l'an 2000 [185]. Cette augmentation de l'incidence de la maladie s'expliquerait par une hausse de la population mondiale depuis les années 1980 (passée de 4.8 à 6.1 milliards d'individus), mais certaines différences entre les méthodes d'évaluation contemporaines et celles d'autrefois seraient également responsables [185]. De nos jours, la fièvre typhoïde est prévalente dans les populations chez lesquelles la qualité sanitaire de l'eau et les conditions d'assainissement publique ne sont pas adéquates, notamment dans les pays en voie de développement [133]. Plus rare dans les pays développés et industrialisés, cette maladie demeure un grand problème de santé publique, particulièrement dans des régions telles que l'Asie du Sud et du Sud-Est, l'Afrique et l'Amérique latine (Figure 1) [172,185,186]. Les catégories d'âge les plus touchées incluent les nourrissons, les enfants d'âge préscolaire et d'âge scolaire, et les jeunes adultes de moins de 25 ans [133,187]. Les coûts relativement élevés associés aux vaccins contre la maladie restreignent leur achat par les pays financièrement défavorisés où se retrouve souvent la majorité des individus infectés [187]. La situation est d'autant plus compliquée due au fait qu'environ 1 à 5% des individus infectés deviendront des porteurs asymptomatiques suite à la colonisation de leur vésicule biliaire par les bactéries. Ces porteurs sains chroniquement infectés, chez qui le diagnostic est plus difficile, continueront à sécréter *S. Typhi* dans leur environnement local [133,188,189].

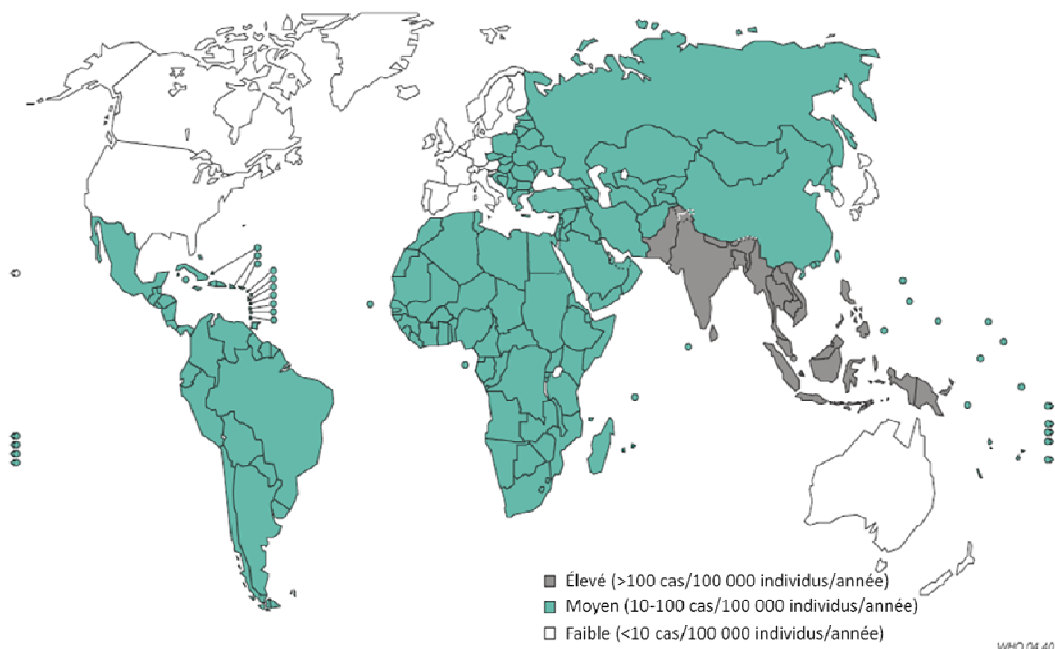


Figure 1. Incidence de la fièvre typhoïde à travers le globe. Carte géographique représentant l'incidence mondiale de la fièvre typhoïde [185], reproduite avec permission (avec quelques modifications au niveau de la légende). Les taux proviennent d'une étude méta-analytique compilant 22 articles portant sur l'incidence de la maladie réalisée par Crump *et al.* et publiée en 2004 par l'Organisation Mondiale de la Santé. Les régions sont classifiées selon l'incidence élevée (>100 cas/100 000 individus/année), moyenne (10-100 cas/100 000 individus/année) ou faible (<10 cas/100 000 individus/année).

Plusieurs antibiothérapies ont été mises au point et ont démontré une efficacité significative lors du traitement d'individus atteints de fièvre typhoïde. Cependant, l'apparition d'une quantité croissante de souches du sérovar Typhi multirésistantes aux antibiotiques rend la gestion des épidémies de plus en plus complexe et difficile [190]. Suite à l'arrivée des premiers antibiotiques en médecine conventionnelle, on commença à traiter les patients atteints de fièvre typhoïde avec des drogues telles que la néomycine, le chloramphénicol, l'ampicilline, l'amoxicilline, le triméthoprim et la tétracycline [191]. Pour

contourner le problème de résistance bactérienne, on introduisit les fluoroquinolones pour traiter la maladie. Ces antibiotiques sont habituellement efficaces pour combattre l'infection par des microorganismes intracellulaires comme *Salmonella*. De manière alarmante, des souches résistantes à ce groupe d'antibiotiques sont apparues relativement rapidement : dès 1993, 76% des isolats cliniques du sérovar Typhi détectés en Asie du Sud-Est se montraient résistants aux fluoroquinolones [141,192]. La perte de susceptibilité bactérienne envers cette famille d'antibiotiques serait due à une mutation au niveau du gène *gyrA* dans le chromosome, ou à la présence de plasmides de résistance aux drogues antimicrobiennes [141,193]. Le traitement de la maladie engendre des coûts considérables pour les organismes de santé publique (par exemple, le coût moyen des thérapies aux États-Unis au cours des années 1980 s'élevait à environ 4500\$ par adulte malade [194]). Le contrôle de la maladie repose sur des stratégies préventives impliquant évidemment l'amélioration des conditions sanitaires, mais aussi le développement et l'utilisation de vaccins appropriés qui représentent une approche financièrement plus rentable à long terme.

1.2.2.2 – Moyens thérapeutiques

Lorsque le problème de multirésistance n'est pas rencontré, il est possible de guérir le patient atteint de fièvre typhoïde par l'administration d'antibiotiques. Ceux communément prescrits incluent des fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine, l'ofloxacine et la péfloxacine, et également des céphalosporines de troisième génération comme la ceftriaxone ou la céfotaxime [132,172]. L'antibiothérapie s'avère souvent inefficace chez les porteurs asymptomatiques. Chez ces individus, les bactéries ayant colonisé la vésicule biliaire forment des biofilms qui leur confèrent une résistance envers les antibiotiques [195].

En 1896, les bactériologistes Sir Almroth Edward Wright (1861-1947) et indépendamment Richard Friedrich Johannes Pfeiffer (1858-1945) avec Wilhelm Kolle (1868-1935) ont commencé à utiliser des bactéries inactivées pour vacciner contre la fièvre typhoïde [4,194]. Ce type de vaccin fut développé à partir du

sérovar Typhi inactivé par la chaleur et le phénol (ce qui dégrade la capsule polysaccharidique Vi, donnant une souche vaccinale non encapsulée nommée « L ») ou par acétone (ce qui préserve la capsule et donne une souche vaccinale encapsulée dite « K ») [196]. Ces vaccins à administration parentérale ont fait l'objet de plusieurs essais cliniques sur le terrain au cours des années 1950, 1960 et 1970. Malgré leur efficacité significative, ces vaccins furent par la suite retirés du marché dans la plupart des pays, dus à des effets secondaires sévères trop fréquents (fièvre, maux de tête et douleur localisée sévère) [197-199]. Seulement quelques pays utilisent encore ces vaccins, par exemple la Thaïlande, où ils sont toujours licenciés [200]. Le besoin d'un nouveau vaccin efficace se faisant alors sentir, la souche atténuée Ty21a vit le jour suite aux travaux de Germanier et Fürer au début des années 1970 [201]. Ce mutant issu de la souche Ty2 du sérovar Typhi fut généré par mutagenèse chimique. Il présente une activité réduite du produit du gène *galE* requis pour la conversion réversible d'UDP-glucose en UDP-galactose, ainsi qu'un phénotype Vi⁻ (absence de la capsule Vi) [201]. Les experts indiquent que cette souche porterait environ 26 mutations additionnelles [202]. Celles-ci incluent une mutation au niveau du gène *ilvD* qui rend la bactérie auxotrophe pour la valine et l'isoleucine [203]. On note aussi une mutation héritée de la souche sauvage au niveau du gène de réponse au stress *rpoS*, dont l'inactivation contribue à son avirulence et à sa vulnérabilité face à divers stress environnementaux [204,205]. De plus, on lui attribue une incapacité à métaboliser le H₂S [203]. La souche atténuée Ty21a devint le constituant actif du premier vaccin vivant atténué à administration orale (*Vivotif Berna*TM), un produit de *Berna Biotech* (aujourd'hui *Crucell*; Suisse) licencié en 1989 [184,200,206]. Durant les années 1930, Félix et collègues démontrèrent la présence d'une réponse sérologique envers la capsule Vi lors de la fièvre typhoïde [207]. Par conséquent, le potentiel de l'antigène Vi en vaccinologie contre la fièvre typhoïde fut davantage étudié. En 1986, Robbins et Robbins développèrent au *National Institutes of Health* (Maryland, États-Unis) un vaccin parentéral constitué de la sous-unité capsulaire Vi. En 1994, ce vaccin (*Typhim Vi*TM) fut licencié à *Aventis Pasteur* (aujourd'hui *Sanofi Pasteur*; France)

[206,208]. Par après, *GlaxoSmithKline* obtint également une licence pour le même vaccin capsulaire Vi (*Typherix*TM).

Ces deux vaccins (un vivant oral et un sous-unitaire parentéral) demeurent jusqu'à ce jour les seuls disponibles commercialement dans la majorité des pays (Tableau II). Leur usage est fortement recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé dans les pays endémiques et par les agences nationales de santé publique auprès des voyageurs de passage dans ces régions [209,210]. Cependant, ces vaccins présentent une efficacité de protection modérée. Le vaccin oral offre une efficacité d'environ 60 à 80% durant une période de 5 à 7 ans, suite à l'administration de 3 doses (dans la plupart des pays, mais 4 au Canada et aux États-Unis) dans un laps de temps d'une semaine [187,211,212]. Cependant, son administration n'est recommandée qu'aux enfants d'au moins 5 ans [172]. Cela est problématique, étant donné que les enfants de 5 ans et moins sont les plus susceptibles de contracter une fièvre typhoïde [174,175,213,214]. Le vaccin sous-unitaire parentéral quant à lui est d'une efficacité de 64 à 72% et protège pendant plus de 17 à 21 mois suite à son injection sous-cutanée ou intramusculaire (une revaccination est prescrite habituellement tous les 3 ans) [212,215]. Ce vaccin peut être administré aux enfants dès l'âge de 2 ans [187].

Vaccin (fabricant)	Souches inactivées « L » ou « V » *	Vivotif Berna™ (Crucell)	Typhim Vi™ (Sanofi Pasteur) ou Typherix™ (GlaxoSmithKline)
Composition	inactivation par chaleur et phénol (souche L Vi ⁻) ou par acétone (souche K Vi ⁺)	souche vivante Ty21a <i>galE</i> ⁻ Vi ⁻	polysaccharide Vi purifié
Administration	parentérale	orale	parentérale
Efficacité de protection	51-67 % (L) 75-94 % (K)	60-80 %	64-72 %
Nombre de doses nécessaires	2	3 (4 en Amérique du Nord)	1
Revaccination	3 ans	5-7 ans	3 ans
Personnel médical nécessaire pour l'administration	oui	non	oui

*Encore licencié, mais retiré du marché dans la majorité des pays.

Tableau II. Comparaison des vaccins licenciés contre la fièvre typhoïde. Adapté de [172,187,212].

De nouveaux candidats de vaccins sont présentement en processus d'évaluation et pourraient potentiellement constituer la prochaine génération de vaccins contre la fièvre typhoïde. Les unités de recherche visent à améliorer les deux approches de vaccinologie décrites plus haut, soit par la création d'un vaccin sous-unitaire de type conjugué et par la génération de nouvelles souches vivantes atténuées. Un premier vaccin sous-unitaire conjugué a été développé avec la sous-unité capsulaire Vi de *S. Typhi* liée à une version recombinante atténuée de

l'exotoxine A de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Lors d'essais cliniques, ce vaccin a conféré une réponse humorale anti-Vi et une mémoire immunologique plus fortes et prolongées qu'avec la sous-unité Vi seule du vaccin initial. De plus, il se montre significativement efficace auprès des enfants de 2 à 5 ans [216-218]. Alternativement, la liaison de la sous-unité Vi à la toxine tétanique atténuée a été testée pour la création de vaccins conjugués disponibles seulement en Inde pour la population locale [187,219,220]. À l'instar de ces derniers résultats encourageants et pour fournir davantage de ressources pour immuniser les jeunes enfants et nourrissons, d'autres équipes de recherche ont misé leurs efforts sur le développement de vaccins sous-unitaires conjugués. La sous-unité Vi de la capsule trouvée chez la bactérie *Citrobacter freundii* adopte une structure similaire que la sous-unité capsulaire chez *S. Typhi* et possède les mêmes propriétés immunologiques [221-223]. Ainsi, des chercheurs du *Novartis Vaccines Institute for Global Health* ont entrepris de conjuguer la sous-unité Vi de *Citrobacter freundii* à une variante mutante de la toxine diphtérique [223-225] utilisée précédemment comme protéine conjugante au sein de vaccins contre d'autres pathologies [226-229]. Ces chercheurs procèdent également à la conception d'un vaccin au sein duquel l'antigène O du sérovar Paratyphi A et l'antigène capsulaire Vi du sérovar Typhi sont chacun conjugués indépendamment à une même molécule de la toxine diphtérique atténuée. Ce vaccin sous-unitaire bivalent vise ainsi à immuniser contre ces deux sérovares pathogènes de *Salmonella* [230]. Un vaccin sous-unitaire conjugué à administration orale fut également mis au point ces dernières années. Il s'agit d'un complexe comprenant de la flagelline et des polyribosomes du sérovar Typhimurium qui est combiné à la toxine atténuée du choléra [231].

D'autre part, des souches vivantes atténuées par mutagenèse dirigée auprès de certains gènes, par exemple de biosynthèse d'acides aminés aromatiques (*aroA*, *aroC* et/ou *aroD*) [232-239], de réponse aux stress (*htrA* [238,240-245], *rpoS* [246]), de systèmes de régulation globale (l'adénylate cyclase *cya*, la protéine réceptrice d'AMP cyclique *crp* [236,246-249] et le régulateur d'acquisition

ferrique *fur* [246,249]), de réparation de l'ADN [250] et de mécanismes de virulence (le régulon *phoP/phoQ* [246,249,251,252], le Système de Sécrétion de Type Trois (SST3) du *Salmonella Pathogenicity Island* (SPI)-2 [253-255], la modification du LPS [256] et la résistance aux peptides antimicrobiens de l'opéron *pmr* [256]) stimuleraient plus fortement l'immunité envers *S. Typhi* à l'aide d'une seule dose orale [172,212].

1.2.3 – La fièvre paratyphoïde

La fièvre paratyphoïde est une autre fièvre entérique causée par *Salmonella. S. Paratyphi A, B et C* causent tous une fièvre paratyphoïde chez l'être humain qui est leur hôte unique. *S. Paratyphi A, B et C* se différencient par leurs structures antigéniques de surface variées et sont considérés comme des sérovars distincts [257]. Les symptômes de la fièvre paratyphoïde sont similaires à ceux de la fièvre typhoïde, ce qui rend ces deux pathologies difficiles à différencier cliniquement [258,259]. Quoique moins fréquemment contractée que la fièvre typhoïde (>5 millions de cas de fièvre paratyphoïde vs >21 millions de cas de fièvre typhoïde en 2000) [185], certains experts insistent sur la nécessité d'un vaccin pour contrôler le problème de fièvre paratyphoïde dans les régions endémiques [260]. Le groupe d'âge le plus affecté demeure les nourrissons et jeunes enfants [213]. Des rapports cliniques démontrent que *S. Paratyphi A* peut persister au niveau de la vésicule biliaire de porteurs asymptomatiques [189]. Aucun vaccin immunisant spécifiquement contre la fièvre paratyphoïde n'est actuellement licencié dans le monde [172] et tout comme chez le sérovar *Typhi*, le phénomène de multirésistance aux antibiotiques se présente également auprès de *S. Paratyphi* [212]. La capsule Vi étant absente chez *S. Paratyphi A et B*, mais présente chez *S. Paratyphi C* [133,207], le vaccin sous-unitaire polysaccharidique contre la typhoïde offre donc une immunité seulement contre le type C [261]. Par contre, *S. Paratyphi A et B* ainsi que *S. Typhi* partagent le même type d'antigène somatique lipopolysaccharidique O (O12). De manière intéressante, les individus recevant le vaccin vivant anti-typhoïdal Ty21a expriment un degré d'immunité notable envers

S. Paratyphi B et une protection moindre auprès du type A [202,262-267]. Par contre, le vaccin vivant Ty21a ne génère aucune immunité envers *S. Paratyphi C* [268]. Une souche atténuée de *S. Paratyphi A* potentiellement immunogénique est en cours d'évaluation. En combinant cette dernière à une souche atténuée du sérovar Typhi qui offre une protection croisée entre *S. Typhi* et *S. Paratyphi B*, les chercheurs ont mis au point un prototype de vaccin vivant à administration orale qui pourrait immuniser simultanément contre ces trois pathogènes [202,269-271]).

1.2.4 – Le besoin d'un nouveau vaccin amélioré

Pour combler les besoins des populations du globe touchées par les fièvres entériques associées à *Salmonella*, le prochain vaccin devra idéalement remplir plusieurs critères bien définis par les experts. Ceux-ci comprennent un mode d'administration oral, une seule dose nécessaire, une protection simultanée contre *S. Typhi* et *S. Paratyphi*, l'absence d'effets secondaires importants, une efficacité démontrée auprès de tous les groupes d'âge (dont les jeunes enfants et les nourrissons), une sécurité et une efficacité auprès des individus immunosupprimés, une réactivité dès l'administration, une durée prolongée (minimum 7 ans), un processus de fabrication simple et un coût abordable. Les avantages d'une administration orale, par rapport à une injection, reposent sur une distribution plus sécuritaire et plus simple d'un point de vue logistique, ainsi qu'un effet de participation et une collaboration accrue de la part des individus (les populations préfèrent généralement le mode oral). De plus, les vaccins oraux mis au point précédemment contre des maladies comme le choléra, la poliomyélite et la fièvre typhoïde (vaccin Ty21a) montrent historiquement des résultats encourageants et un succès en matière d'immunisation [202].

1.3 – Interaction entre *Salmonella* et son hôte

1.3.1 – Spectre d’hôte

Un aspect exceptionnel de *Salmonella* demeure la capacité de ses divers sérovars à coloniser un vaste répertoire de reptiles, d’oiseaux, de plantes, d’insectes et de mammifères, dont l’être humain. Le spectre d’hôtes d’un sérovar peut 1) s’étendre sur une vaste gamme d’organismes, 2) se limiter à quelques organismes ou encore 3) s’associer à un seul organisme. *S. enterica* sous-espèce *enterica* demeure la seule sous-espèce associée à l’être humain et aux animaux à sang chaud. Les cinq autres sous-espèces et l’espèce *S. bongori* sont quant à elle des commensales chez les animaux à sang froid et infectent rarement l’Homme. Les souches de la sous-espèce *enterica* demeurent les plus minutieusement étudiées, vu leur impact économique et clinique préoccupant pour les populations humaines dans le monde [4,272].

Les séquences génomiques de sérovars à large spectre d’hôtes (« généralistes », comme les sérovars Typhimurium et Enteritidis), à spectre d’hôtes plus étroit (« adaptés à l’hôte », comme le sérovar Choleraesuis) et à hôte unique (« restreints à l’hôte », comme *S. Typhi* et *S. Paratyphi A*) ont été complétées, annotées et publiées. L’alignement de ces génomes révèle une conservation notable et dans l’ensemble, une symétrie linéaire (ou synténie) [37]. On note que quelques réarrangements marquants à proximité des origines de réplication et de terminaison, ce qui est un phénomène typique de réarrangement qui distingue les génomes de souches apparentées [273,274]. Malgré les caractéristiques générales partagées entre les génomes de ces sérovars, ces bactéries ont des spectres d’hôtes variés et des pathologies bien distinctes. Les sérovars Typhimurium et Enteritidis provoquent une gastro-entérite, le sérovar Choleraesuis est responsable de septicémie et d’infection extra-intestinale localisée et les sérovars Typhi et Paratyphi A causent une fièvre entérique systémique [36,37,128,129]. Cela intrigue les scientifiques depuis plusieurs décennies. Le modèle théorique stipule

que certains facteurs génétiques permettent à un sérovar donné d'accéder à une série d'hôtes. Cependant, la comparaison des génomes de *S. Typhi* et *S. Paratyphi* capables d'infecter systématiquement l'humain ne relève aucun gène commun entre ces deux sérovarys qui est absent chez les sérovarys à large spectre d'hôtes causant des infections entériques localisées [272]. Par contre, les génomes des sérovarys typhoïdiques sont dégradés par une quantité notable de pseudogènes (voir section 1.1.2.4). Cela pourrait expliquer leur spectre d'hôte limité à l'être humain [132]. En effet, *S. Typhi* et *S. Paratyphi* ont plusieurs pseudogènes en commun qui pourraient être responsables de cette stricte restriction d'hôte [130,133]. D'autre part, certains gènes de virulence chez *S. Typhimurium* sont impliqués spécifiquement auprès de certains hôtes, par exemple l'îlot de pathogénicité SPI-4 requis pour coloniser le bovin, mais pas le poussin [275]. Des stratégies distinctes pourraient donc être adoptées par les sérovarys généralistes afin d'infecter différentes espèces d'hôtes [272].

Malgré de récents progrès, les connaissances au sujet des gènes et mécanismes moléculaires dictant les spectres d'hôtes des sérovarys de *Salmonella* demeurent limitées. D'une part, l'acquisition de traits de virulence (îlots de pathogénicité, adhésines, opérons fimbriaires, capsule de surface, plasmides, etc.) et d'autre part la délétion de séquences ou l'inactivation de certains gènes (pseudogènes) auraient contribué à définir la spécificité d'hôtes de chaque souche [82]. Les analyses nutritionnelles menées auprès de la sous-espèce *enterica* montrent que les sérovarys à large spectre d'hôtes peuvent croître sur des milieux de culture simples, alors que des auxotrophies envers certains acides aminés et/ou vitamines caractérisent les sérovarys à spectre plus étroit ou unique (par exemple, le sérovar Typhi nécessite du tryptophane et de la cystéine pour croître) [276,277]. Les experts proposent que l'adaptation d'un sérovar dans sa niche spécifique aurait entraîné un réarrangement génétique menant à l'auxotrophie. La teneur en nutriments chez l'hôte unique aurait donc permis la croissance d'un sérovar auxotrophe alors incapable d'infecter d'autres organismes avec une disponibilité différente en nutriments [278,279].

Les sérovars de *Salmonella*, plus particulièrement ceux provenant de la sous-espèce *enterica* colonisant diverses espèces animales à sang chaud, dont l'Homme, peuvent être classés selon trois types de spectre d'hôtes, qui sont décrits brièvement ici.

1.3.1.1 – Sérovars généralistes

La majorité des quelques 1500 sérovars de la sous-espèce *enterica* [27] représentent des « généralistes », capables de coloniser un large spectre d'hôtes. Le meilleur exemple de généraliste reste le sérovar Typhimurium qui infecte plusieurs hôtes et cause des pathologies distinctes selon l'espèce occupée. Chez l'être humain, *S. Typhimurium* ainsi que les autres sérovars généralistes causent typiquement une gastro-entérite qui ne nécessite habituellement aucune hospitalisation ni prise d'antibiotiques chez les individus en bonne santé [4]. Chez la souris, *S. Typhimurium* peut induire une infection systémique létale ou persister à long terme dans l'organisme selon le contexte génétique de l'hôte [280-282]. Au sein du bovin et du porc, l'infection par *S. Typhimurium* provoque une gastro-entérite. Ces animaux représentent d'ailleurs une importante source de contamination zoonotique pour l'être humain [283]. Chez la poule d'âge adulte, *S. Typhimurium* colonise l'intestin sans apparition de signes cliniques, alors que chez le poussin, l'inoculation orale de *S. Typhimurium* engendre une infection systémique mortelle [284]. Les sérovars généralistes sont plus fréquemment isolés auprès de jeunes animaux, ce qui indique que ces sérovars ne seraient pas adaptés à un système immunitaire mature [82].

Le sérovar Enteritidis représente le deuxième sérovar généraliste d'importance médicale. Il est responsable de gastro-entérite chez l'humain, mais trouve son réservoir principal auprès du poulet, dont la viande et les œufs contaminés transmettent la bactérie à l'Homme lors de leur ingestion [284-286].

1.3.1.2 – Sérovars adaptés à l'hôte

Quelques sérovars infectent normalement un seul hôte, mais peuvent à l'occasion infecter d'autres organismes. Par exemple, le sérovar Choleraesuis est habituellement associé au porc et le sérovar Dublin au bovin, mais leurs passages chez l'Homme ou d'autres mammifères peuvent également mener à une infection [4,150,272,279,287]. Les animaux infectés par les sérovars de ce groupe deviennent souvent des porteurs asymptomatiques qui sécrètent des bactéries dans leur environnement. Ces dernières contamineront à leur tour de nouveaux hôtes [288-290].

1.3.1.3 – Sérovars restreints à l'hôte

Certains sérovars infectent un seul organisme, tels que *S. Typhi* et *S. Paratyphi A* dont le seul hôte et réservoir demeure l'être humain, ou *Gallinarum* et *Pullorum* dont le seul hôte est le poulet. Les sérovars infectant spécifiquement un hôte ont développé la capacité de déjouer le système immunitaire mature des organismes adultes, ce qui est démontré par le fait qu'ils peuvent infecter tous les groupes d'âge [82].

1.3.2 – Foyer d'infection

Parmi les 1500 sérovars distincts de la sous-espèce *enterica*, seulement une cinquantaine sont pathogènes auprès des mammifères, des oiseaux et chez l'Homme [82,291,292]. Lorsque la bactérie colonise son hôte de manière virulente, un ou plusieurs organes peuvent être affectés. Cela détermine la gravité de la pathologie. Généralement, la maladie développée est issue d'une inflammation intestinale localisée qui engendre une gastro-entérite ou provient d'une dissémination systémique causant une fièvre entérique. Nous décrirons brièvement les deux parcours d'infection habituellement empruntés par les sérovars de la sous-espèce *enterica* chez l'hôte humain : l'infection intestinale strictement localisée et l'infection systémique plus sévère (Figure 2). Les facteurs

de virulence sollicités par la bactérie pour évader les défenses immunitaires et interagir avec les types cellulaires seront décrits plus loin.

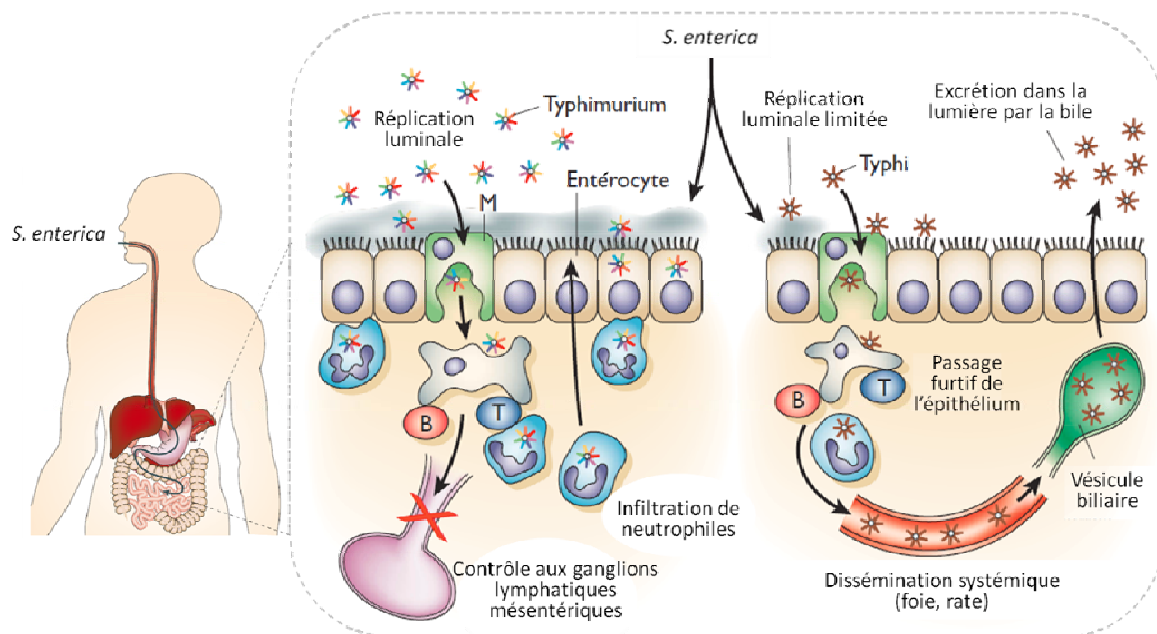


Figure 2. Schéma comparatif de l'infection localisée et de l'infection systémique causées par *Salmonella*. Adapté de [293] et [294]. L'infection de l'être humain par *Salmonella* commence par l'ingestion des bactéries qui survivront au stress acide de l'estomac et chemineront jusqu'à la lumière de l'intestin (à gauche de l'encadré en lignes pointillées). Les bactéries interagiront ensuite avec l'épithélium intestinal et traverseront cette barrière par le biais des entérocytes et préférentiellement des cellules M. Le sérovar généraliste *S. Typhimurium* (à gauche dans l'encadré) déclenchera une réaction inflammatoire aiguë avec infiltration de leucocytes polymorphonucléaires (par exemple, des neutrophiles). Cela provoquera l'apparition de la gastro-entérite. *S. Typhimurium* continuera sa réplification dans la lumière de l'intestin, mais sera freiné aux ganglions lymphatiques mésentériques et ne se propagera pas davantage. Le sérovar Typhi spécifique à l'être humain (à droite dans l'encadré) franchira quant à lui l'épithélium de manière furtive, sans réaction inflammatoire dans l'intestin. Suite à l'invasion des tissus, les bactéries persisteront au sein des macrophages. Ces cellules feront office de vecteur et

permettront aux bactéries de se propager systématiquement jusqu'aux organes du système réticulo-endothélial, notamment le foie et la rate. Cela mènera au développement de la fièvre typhoïde. *S. Typhi* peut persister chroniquement chez l'hôte en colonisant la vésicule biliaire. Suite à la résorption de la maladie, les bactéries circuleront à nouveau à partir de cet organe vers la lumière intestinale par l'entremise de la bile et seront sécrétées hors de l'hôte dans l'environnement. B, lymphocytes B; M, cellules M; T, lymphocytes T

1.3.2.1 – Infection intestinale localisée

L'infection intestinale localisée chez l'humain en bonne santé, qui se traduit par une gastro-entérite, est habituellement causée par des sérovars généralistes. Suite à l'ingestion de l'inoculum, un grand nombre de bactéries survivront à l'environnement acide et antimicrobien de l'estomac [295,296]. Le passage initial de *Salmonella* au sein d'un pH acide induit chez la bactérie un mécanisme de réponse de tolérance acide (*Acid Tolerance Response* ou ATR) [297-299]. Au cours de ce processus, l'exposition à un stress acide modéré mène à la synthèse de protéines qui protègent la bactérie contre un stress acide subséquent plus sévère et ainsi lui permettrait de s'adapter aux conditions acides rencontrées plus tard durant l'infection de l'hôte [300-302].

Par la suite, les bactéries accéderont à la lumière du petit intestin et échapperont à l'arsenal antimicrobien comprenant, entre autres, des enzymes digestives, des sels biliaires, des anticorps sécrétoires IgA et des peptides antimicrobiens [303-305]. Au niveau de la muqueuse intestinale, *Salmonella* adhèrera à la surface apicale des cellules épithéliales non phagocytaires nommées entérocytes par l'entremise d'un répertoire varié d'adhésines et de fimbriae [306]. Les bactéries pénétreront ensuite à l'intérieur des entérocytes grâce à un mécanisme complexe de macropinocytose induite par SPI-1 qu'on nomme le *membrane ruffling*. Lors de ce mécanisme d'ondulation membranaire, il y a modification du cytosquelette d'actine de la cellule avec remodelage de sa

membrane cellulaire. Cela permet aux bactéries d'être internalisées dans le compartiment intracellulaire au sein de vacuoles [307,308]. Par contre, *Salmonella* envahit la barrière épithéliale préférentiellement par l'entremise des cellules M (*microfold*), où l'entrée par l'intermédiaire d'un récepteur à la surface cellulaire [309] se fait indépendamment du SPI-1 et SPI-2 [310]. Les cellules M sont des cellules épithéliales spécialisées qui assimilent les antigènes intestinaux par pinocytose (internalisation non spécifique de petits échantillons de liquide extracellulaire). Les cellules M transfèrent alors les antigènes aux cellules phagocytaires, telles que les macrophages, situées au niveau des plaques de Peyer sous-jacentes, qui sont des nodules lymphoïdes agrégés de l'iléon terminal [311-314]. L'apoptose des entérocytes déclenchée par *Salmonella* peut aussi contribuer à la pénétration de l'épithélium [315]. D'autre part, *Salmonella* peut être internalisée au sein de cellules phagocytaires CD18-positives [316] ou de cellules dendritiques [317,318] qui occupent les interstices entre les cellules épithéliales. Les bactéries peuvent aussi se frayer un passage dans l'épithélium par dislocation des jonctions serrées entre les cellules de la lumière de l'intestin. Ces jonctions serrées constituent des connexions composées de matrice extracellulaire reliant deux cellules entre elles au sein d'une monocouche qui est imperméable au liquide extracellulaire, ainsi qu'à certaines molécules et cellules [319].

Ces différentes stratégies contribuent à déclencher une réponse inflammatoire intestinale chez l'hôte, qui est suivie d'une diarrhée typiquement observée lors de l'infection entérique localisée par *Salmonella* [4]. Chez l'humain, cette inflammation précoce résulte d'un recrutement massif de leucocytes polymorphonucléaires de l'espace sous muco-sal vers le site d'infection dans la lumière intestinale [320,321]. La migration des leucocytes vers le foyer d'infection serait dépendante de l'interleukine-8 (IL-8) et d'autres molécules chimiotactiques semblables libérées par les entérocytes infectés [322]. Dans l'ensemble, la relâche de granules microbicides par les leucocytes et la sécrétion par *Salmonella* de protéines effectrices manipulant la réponse des cellules de l'hôte seraient

responsables de la diarrhée inflammatoire grâce à leur effet destructif envers la muqueuse intestinale [294].

Le passage des bactéries au sein des cellules M leur offre un accès aux surfaces baso-latérales des cellules épithéliales adjacentes. Le renouvellement des cellules épithéliales (ou *turnover*) et leur migration à la lumière de l'épithélium (ou *shedding*) font alors circuler les bactéries une fois de plus vers la lumière de l'intestin, grâce à une persistance et multiplication dans ces cellules. La capacité des bactéries à survivre et se multiplier au sein des entérocytes est essentielle pour la colonisation de l'intestin et le développement des symptômes cliniques de la gastro-entérite [323-327]. D'ailleurs, une sous-population de bactéries en hyper-réplication et adaptée pour l'invasion peut être observée dans le cytoplasme (plutôt que dans le compartiment vacuolaire) des entérocytes. Lorsque ces cellules infectées sont expulsées hors de l'épithélium, les bactéries intracellulaires qui sont libérées amorcent l'invasion d'autres cellules épithéliales [328]. Néanmoins, le foyer d'infection ne s'étendra pas au-delà du site intestinal pour les sérovars associés à la gastro-entérite chez l'humain, comme *S. Typhimurium*. Les bactéries seront éliminées dès qu'elles atteindront les ganglions lymphatiques mésentériques sous la muqueuse intestinale. Ces organes représentent donc un site de restriction empêchant la dissémination systémique des NTS [293,329,330]. Par contre, les bactéries continueront la colonisation de la lumière intestinale avec excrétion dans les fèces de l'individu malade [293].

1.3.2.2 – Infection systémique

L'infection systémique par *Salmonella* représente une dissémination bactérienne à travers divers organes et tissus. L'infection débute par le passage des bactéries du petit intestin vers le système réticulo-endothélial (SRE). Ce dernier représente un réseau de tissus interreliés comprenant des cellules du système immunitaire, telles que les macrophages, qui entoure les organes associés à l'immunité comme la rate et les ganglions lymphatiques [294]. Ce phénotype est caractéristique des maladies sévères causées par les sérovars adaptés ou restreints

à un hôte. L'exemple notoire demeure la propagation du sérovar Typhi à travers l'organisme de l'être humain (se traduisant en fièvre typhoïde) que nous décrivons ici. Notons cependant que l'infection de la souris par le sérovar Typhimurium mène également à une infection systémique de l'hôte similaire à la dissémination de *S. Typhi* chez l'être humain lors d'une fièvre typhoïde [147].

Comme lors de l'infection intestinale localisée, les bactéries ingérées survivront dans l'estomac et chemineront jusqu'à la lumière du petit intestin. Par contre, le passage au sein de la barrière intestinale se fera de manière discrète, sans déclencher de réponse inflammatoire. Le contact entre les bactéries et l'épithélium intestinal n'implique pas (ou presque pas) cette fois de réaction inflammatoire avec infiltration de granulocytes, ni de diarrhée subséquente associée typiquement avec l'invasion de cellules épithéliales [293,294,331]. En traversant l'épithélium, préférentiellement par l'invasion des cellules M, les bactéries seront internalisées dans les macrophages qui sous-tendent ces cellules spécialisées au niveau des plaques de Peyer [314]. Les macrophages sont les cellules privilégiées par les sérovares d'infection systémique comme *S. Typhi* pour leur dissémination à travers l'organisme [293]. Les nodules lymphoïdes représentent le site d'entrée emprunté par le sérovar Typhi pour sa dissémination systémique associée à la fièvre typhoïde [314]. L'entrée dans les entérocytes non phagocytaires s'effectue par endocytose grâce au SPI-1, alors que la pénétration dans les macrophages peut quant à elle se réaliser de plusieurs manières. Elle peut s'effectuer par endocytose induite par SPI-1, par l'entremise de fimbriae et/ou d'adhésines non fimbriaires, et également par phagocytose [314,318,332]. Dans la niche intracellulaire du macrophage, plusieurs mécanismes de virulence finement régulés seront induits qui permettront à *Salmonella* de s'adapter à l'environnement antimicrobien occupé et de s'y répliquer [332-339]. Ce processus permettra d'une part la croissance de la bactérie dans son hôte et d'autre part une propagation à travers le SRE de l'organisme [294]. Au cours de son passage intracellulaire dans le macrophage, *Salmonella* réside au sein d'un compartiment vacuolaire nommé le « phagosome spacieux » (*Spacious Phagosome* ou SP) [332]. Au fil du temps, la paroi de cette

vacuole se resserre autour de *Salmonella* jusqu'à sa conversion en membrane adhérente englobant une ou plusieurs bactéries, donnant naissance à la « vacuole contenant *Salmonella* » (*Salmonella containing vacuole* ou SCV). *Salmonella* pourra alors résider à l'intérieur du macrophage pour une période allant de plusieurs heures à plusieurs jours. La vacuole ne cheminera pas vers la voie endosomale habituelle de la cellule, car *Salmonella* bloquera sa maturation en phagolysosome normalement formé au sein de la cellule [294,340,341]. Par la suite, la SCV sera transportée jusqu'au « centre organisateur des microtubules » (*Microtubule-Organizing Center* ou MTOC) en périphérie du noyau de la cellule par l'entremise du réseau de microtubules cellulaires. Elle restera positionnée à cet endroit et tirera ses nutriments à partir de l'appareil de Golgi [342-344]. La SCV représente une organelle pléomorphique, dotée de projections filamenteuses nommées *Salmonella-induced filaments* (Sifs) [345]. La formation de ces Sifs et le positionnement de la vacuole en périphérie du noyau cellulaire sont deux processus essentiels à la réplication intracellulaire de *Salmonella* [346,347]. De plus, les Sifs occupent un rôle important dans la préservation de l'intégrité de la SCV [340,348]. Cela représente un critère important pour l'infection systémique, puisque l'inactivation des Sifs atténue la virulence dans l'hôte [349]. Par un mécanisme encore mal compris, une mince portion des bactéries intracellulaires réussiront à quitter la SCV et accéderont au cytoplasme de la cellule hôte (certaines évidences laissent croire qu'un SST3 infligeant du dommage à la membrane de la SCV serait possiblement impliqué dans la sortie vers le cytoplasme [350]). Les bactéries seront par contre soumises à une ubiquitination [351] et éliminées par autophagie [350].

Plusieurs observations rapportées antérieurement indiquent que *Salmonella* peut tout de même occuper une SCV ayant fusionné avec un lysosome [352-355] avec acidification de ce compartiment [334,355-357]. Le maintien de la SCV sans maturation vers le phagolysosome ne serait donc pas considéré comme un atout pour la survie intracellulaire. Par conséquent, la résistance de *Salmonella* face au contenu lysosomal comprenant de l'oxyde nitrique (*Nitric Oxyde* ou NO), des

peptides antimicrobiens, des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS), des protéases et des lipases serait primordiale pour la persistance dans les macrophages et l'infection systémique de l'organisme [358-367]. Des souches sensibles à cet arsenal de produits microbicides sont moins virulentes chez l'hôte animal. De plus, un hôte privé de ces molécules antimicrobiennes devient plus vulnérable lors de l'infection par *Salmonella* [337,367-370].

Camouflée dans les macrophages du SRE, *Salmonella* se propagera à travers l'organisme humain à partir des plaques de Peyer intestinales [314]. Les bactéries dissimulées dans ces phagocytes s'engageront d'abord dans le système lymphatique, transiteront au sein des ganglions lymphatiques mésentériques, accéderont à la circulation sanguine, puis infecteront les organes secondaires du SRE tels que le foie et la rate [313,316,330]. *Salmonella* infecte aussi d'autres organes comme la vésicule biliaire [371] et la moelle osseuse [372]. La bactérie peut persister à vie chez les porteurs asymptomatiques en formant des biofilms à la surface de calculs biliaires dans la vésicule biliaire [373], l'organe qui représente le réservoir principal de *Salmonella* chez les porteurs chroniques. *Salmonella* peut également persister dans la moelle osseuse, mais sur des périodes de temps plus courtes que dans la vésicule biliaire [293]. La bactérie sera redirigée vers la lumière du petit intestin par l'entremise des conduits biliaires et sera excrétée dans les fèces de l'individu, ou envahira de nouveau l'épithélium intestinal par le processus d'entrée expliqué précédemment [313,314]. Occasionnellement, la bactérie réussit à traverser la barrière hémato-encéphalique, créant une méningite principalement chez les nourrissons [374]. Ainsi, les bactéries retransiteront une fois de plus dans le sang, l'infection aura atteint sa pleine propagation systémique et les symptômes de fièvre typhoïde se feront ressentir [132]. Dans les organes atteints durant la pathologie systémique, comme le foie et la rate, les bactéries sortiront des macrophages et se propageront vers des macrophages non infectés. *Salmonella* quitteraient le macrophage infecté par lyse nécrotique de la cellule, menant à une sortie dans le milieu extracellulaire et une infection subséquente de nouveaux phagocytes [375,376]. De façon plus rare, sans sortir vers le milieu

extracellulaire, *Salmonella* pourrait aussi induire l'apoptose du macrophage et cette cellule apoptotique dotée d'une membrane encore intacte serait alors phagocytée à son tour par un macrophage nouvellement infecté à son tour [377]. Ce phénomène serait derrière les lésions pathologiques multicellulaires observées au cours de l'infection et serait requis pour la croissance de *Salmonella* dans l'organe infecté, ainsi que pour sa dissémination systémique optimale [330].

Salmonella peut occuper plusieurs types cellulaires chez différents organes de l'hôte (cellules épithéliales de la vésicule biliaire [378], leucocytes polymorphonucléaires [379], cellules dendritiques [380], cellules T [341] et B [381]), mais leur réservoir principal demeure les macrophages situés au sein des tissus et organes du SRE lors d'infection systémique [321,341,380]. Les souches de *Salmonella* incapables de proliférer intracellulairement dans les macrophages sont avirulentes chez l'hôte et ne peuvent infecter systématiquement l'organisme. Cela a été démontré chez l'hôte murin [368] et humain [382]. La survie de *Salmonella* dans les macrophages reflète donc un trait de virulence essentiel au développement de la maladie systémique par ce pathogène.

1.4 – Facteurs de virulence chez *Salmonella*

Afin de surmonter les défenses immunitaires de l'hôte et causer une infection, *Salmonella* emploie une vaste sélection de facteurs de virulence. Une grande portion des gènes encodant ces facteurs se trouvent au niveau des SPI, alors que d'autres se trouvent au niveau de plasmides ou ailleurs dans le chromosome bactérien (Figure 3) [29,314,383].

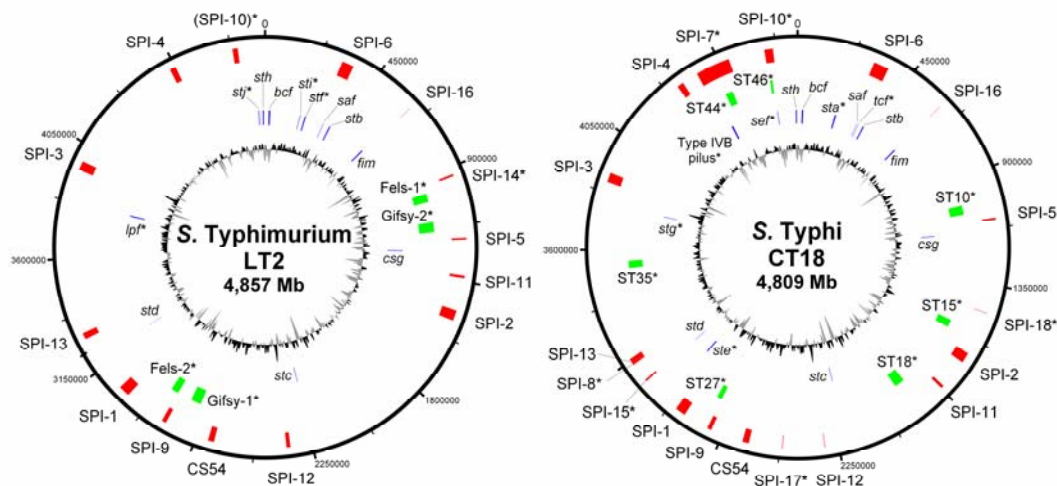


Figure 3. Représentations circulaires des génomes de *S. Typhimurium* et *S. Typhi*. Les chromosomes de la souche LT2 de *S. Typhimurium* et de la souche CT18 de *S. Typhi* sont illustrés pour l'analyse comparative de leurs traits de virulence, tels que présentés dans la référence [35] et reproduits avec permission. Le cercle externe indique la position des îlots de pathogénicité (rouge), des éléments prophagiques (vert) et des opérons fimbriaires (bleu). Le cercle interne montre le contenu en G+C à travers le génome (les niveaux supérieurs au contenu moyen sont en noirs et ceux inférieurs sont en gris). Les astérisques mettent en évidence les éléments spécifiques à chaque sérovar. L'échelle du cercle externe est présentée en paires de bases. Ces chromosomes circulaires furent produits à l'aide du programme *DNAPlotter* [384].

Les traits de virulence uniques ou communs aux deux sérovars pathogéniques les plus étudiés chez *Salmonella*, Typhimurium et Typhi, seront décrits dans cette section. Ces sérovars partagent environ 90% de gènes communs [36], mais la portion du génome qui diffère entre les deux (10%) renferme des éléments associés au potentiel pathogénique de chacun (Figure 4) [35].

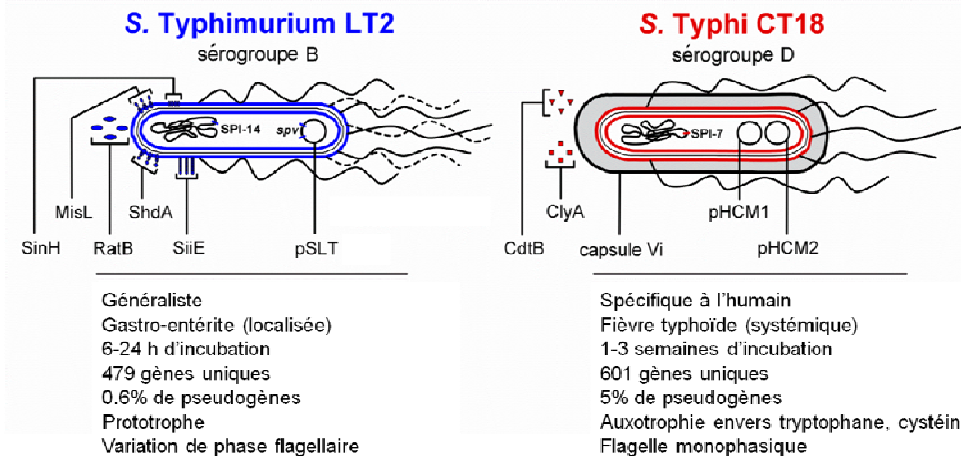


Figure 4. Facteurs de virulence distinguant *S. Typhimurium* de *S. Typhi*. Adapté de [35]. Les traits de virulence spécifiques à *S. Typhimurium* (souche LT2) et *S. Typhi* (souche CT18) sont schématisés de manière comparative.

1.4.1 – *Salmonella Pathogenicity Islands (SPI)*

Les SPI sont de grandes régions d'ADN génomique (ADNg) caractérisées par leur absence du chromosome chez *E. coli*, un contenu en G et C qui diffère de la composition moyenne de l'ensemble du génome (qui est d'environ 52% chez *Salmonella* [385]), la présence de gènes de virulence importants pour l'infection, ainsi que leur insertion à l'intérieur ou près d'un gène d'ARN de transfert (ARNt) [33,132,383,386]. L'insertion génomique des îlots de pathogénicité aux alentours des gènes d'ARNt suggère leur transmission d'une bactérie vers une autre par l'entremise d'une transduction phagique. En effet, plusieurs bactériophages portent des gènes d'ARNt au sein de leur génome et ces séquences généralement bien conservées pourraient faciliter leur intégration à un site spécifique au sein du génome bactérien [387,388]. Les facteurs de virulence encodés par les SPI interfèrent avec les mécanismes cellulaires de l'hôte et influenceraient la spécificité d'hôte des sérovars [389]. Jusqu'à présent, 21 SPI ont été identifiés chez *Salmonella* [36,37,129,390-393], mais SPI-1 et SPI-2 demeurent les plus grandement étudiés. Les génomes des sérovars Typhimurium et Typhi possèdent

11 SPI en commun (SPI-1 à 6, 9, 11, 12, 13 et 16). Les SPI-8 et SPI-10 ont initialement été identifiés chez *S. Typhi*, mais sont considérés absents du génome de *S. Typhimurium*, chez lequel ces deux régions sont substituées par des gènes complètement différents [35]. Par ailleurs, un seul SPI est trouvé uniquement chez *S. Typhimurium*, le SPI-14, et six SPI sont présents uniquement chez *S. Typhi* (SPI-7, 8, 10, 15, 17 et 18). Récemment, le SPI-19 fut identifié chez *S. enterica* sérovars Dublin, Weltevreden, Agona, Gallinarum et Enteritidis (malgré le fait qu'une délétion interne élimine la majorité de cet îlot chez le séovar Enteritidis) et les SPI-20 et SPI-21 furent détectés chez la sous-espèce *arizonae* séovar 62:z4,z23:- [393]. Par contre, ces SPI ne font pas partie des génomes de *S. Typhimurium* et *S. Typhi* [35] et donc ne seront pas discutés davantage dans cet ouvrage. Les SPI présents dans les génomes de *S. Typhimurium* et de *S. Typhi* seront décrits dans cette section.

Suite à sa divergence à partir de la bactérie *E. coli* (voir section 1.1.2.3) [101,102], *Salmonella* aurait acquis le SPI-1 il y a 25 à 40 millions d'années. Le SPI-1 renferme un SST3 qui permet à *Salmonella* de coloniser les animaux à sang froid. Ensuite, le SPI-2 se serait inséré dans son génome, apportant un deuxième SST3 qui aurait provoqué la dissociation de *Salmonella* en deux espèces. En effet, l'espèce *S. enterica* porte le SST3 spécifique au SPI-2, alors que l'espèce *S. bongori* ne le possède pas. Par contre, une plus petite portion appartenant au SPI-2 n'encodant pas le SST3 est présente chez ces deux espèces [394]. Par la suite, les six sous-espèces de *S. enterica* auraient poursuivi leur évolution vers l'occupation de leurs niches respectives. L'ancêtre de la sous-espèce *enterica* colonisa les organismes à sang chaud, ce qui aurait mené à la création de diverses souches infectant une grande variété d'animaux (dont l'humain) [32,82,395-397]. *S. enterica* possède deux SST3 considérés comme de véritables seringues ou aiguilles moléculaires émanant de la surface bactérienne et qui, au contact de la membrane (cytoplasmique ou vacuolaire selon le SST3) de la cellule hôte, injectent une variété de protéines au sein de son cytoplasme. Les « effecteurs » manipulent les cascades signalétiques eucaryotes et contribuent à l'invasion de la cellule cible

et/ou à la survie intracellulaire de la bactérie [35,314]. Les effecteurs sont encodés par des gènes situés principalement au sein des SPI ou au niveau de prophages et de vestiges de phages. Les effecteurs tels que SopE, SspH1, SseI, SodC-1 et SopE2 sont d'ailleurs encodés par des éléments phagiques [97,398-400]. Les alignements comparatifs des séquences protéomiques des SPI chez *S. Typhimurium* et *S. Typhi*, réalisés avec le programme informatique *xBASE* [401], sont présentés à la Figure S1 des Figures supplémentaires du premier article [35] placé en Annexe 1. Le Tableau S1 rattaché à ce même article répertorie les effecteurs connus sécrétés par les SST3-1 et des deux sérovars.

SPI-1 représente un îlot de 40 kb portant les éléments du premier SST3 (SST3-1) [383]. Ce système sécrète au moins une quinzaine d'effecteurs dans la cellule hôte [402]. SPI-1 encode aussi un système de transport des métaux (dont le fer) encodé par *sitABCD* [403]. Les opérons *prg/org* et *inv/spa* encodent pour les protéines formant l'aiguille en soi. L'opéron *sip* encode le translocon associé à l'extrémité de l'aiguille (SipBCD), une structure s'intégrant dans la membrane de la cellule hôte et y formant un pore pour le passage des effecteurs vers le cytoplasme. SPI-1 inclut aussi des chaperonnes liant spécifiquement leurs effecteurs respectifs, ainsi que quelques régulateurs transcriptionnels [29]. Le rôle central du SST3-1 est l'invasion des cellules épithéliales non phagocytaires par le processus de réarrangement du cytosquelette d'actine nommé *membrane ruffling* et l'induction d'une réponse inflammatoire au niveau de l'épithélium intestinal [323,383,404,405]. SPI-1 est responsable de l'induction de l'apoptose chez les macrophages [406], mais aussi de sa prévention chez les cellules épithéliales [407,408]. SPI-1 encode également des protéines qui activent la sécrétion de cytokines par le système immunitaire de l'hôte [324,409]. Par ailleurs, plusieurs effecteurs du SST3-1 participent à des événements suivant l'invasion de la cellule, dont la formation et le positionnement de la SCV ainsi que la biosynthèse des Sifs (voir section 1.3.2.2) [318,410-412]. L'analyse comparative des SPI-1 chez *S. Typhi* et *S. Typhimurium* révèle un contenu fortement identique [35,37]. On retrouve néanmoins quatre séquences codantes supplémentaires chez *S.*

Typhimurium, dont *avrA* qui partage une homologie de séquence avec des effecteurs retrouvés chez des pathogènes d'animaux et de plantes [413]. De plus, certains gènes d'effecteurs situés à l'extérieur du SPI-1 sont manquants (*sspHI*, *steB*) ou sont des pseudogènes (*sopA*, *sopE2* et *slrP*) chez *S. Typhi* [35,37].

SPI-2 constitue une région génomique de 40 kb comprenant un deuxième SST3 (SST3-2). Le SST3-2 est essentiel pour la prolifération intracellulaire de *S. enterica* dans les macrophages et aussi pour l'infection systémique chez l'hôte [335,336,414]. L'induction du SST3-2 est médiée par le système à deux composantes *phoP/phoQ* [415] qui régule globalement plusieurs autres facteurs de virulence importants chez *S. enterica* [333,416,417]. Comme le SST3-1, il possède son propre translocon (SseBCD) qui interagit cette fois avec la membrane vacuolaire entourant la SCV lorsque *Salmonella* est intracellulaire (alors que le SST3-1 s'associe avec la membrane cytoplasmique lorsque la bactérie est extracellulaire). Son fonctionnement est assuré par les gènes du SPI-2 encodant l'aiguille (gènes *ssa*), les régulateurs (gènes *ssrAB*), les chaperonnes (gènes *ssc*) et les effecteurs (gènes *sse*) [418,419]. Un total de 32 effecteurs associés à la sécrétion par le SST3-2 ont été identifiés [420-423], mais seulement quelques-uns sont impliqués avec certitude directement dans la répllication intracellulaire de *Salmonella* [424]. L'activité de ces effecteurs est critique pour la biogenèse, l'intégrité et le positionnement de la SCV, ainsi que pour la formation des Sifs [342,347,425-429]. Les effecteurs du SST3-2 protègent contre le contenu du lysosome qui, lorsque relâché, produit du stress oxydatif [337,366,430] et nitrique [365]. De plus, ils induisent l'apoptose des entérocytes afin de permettre l'invasion de l'épithélium lors de la phase intestinale de l'infection [315]. La notion de survie intracellulaire associée au SST3-2 est bien définie chez le sérovar Typhimurium, mais peu d'informations sont disponibles à ce sujet chez *S. Typhi*. Notamment, la comparaison des SST3-2 de *S. Typhimurium* et *S. Typhi* ne démontre aucune différence significative en terme de composition génétique [35]. Malgré cela, un SST3-2 fonctionnel n'est pas requis pour la répllication intracellulaire de *S. Typhi* dans les macrophages humains, mais serait possiblement utilisé pour la survie au

sein d'autres types cellulaires (par exemple, les cellules dendritiques) lors de l'infection systémique. Considérant que *S. Typhi* a conservé le SST3-2 dans son génome au fil de l'évolution, il est improbable que sa possession n'amène aucun avantage à la bactérie. Il pourrait potentiellement servir à moduler le système immunitaire au sein de foyers d'infection spécifiques dans lesquels l'environnement est hostile pour la bactérie, dans le but d'établir une dissémination systémique chez l'humain [431]. De plus, des différences en acides aminés distinguent les effecteurs SifA et SseF, ainsi que les protéines SseC et SseD du translocon, indiquant possiblement des fonctionnements différents entre les SST3-2 des sérovars Typhimurium et Typhi [389]. Le SPI-2 comprend également une plus petite portion génomique (15 kb) encodant les composantes d'une tétrathionate réductase (opéron *ttrRSBCA*) qui contribue à la respiration anaérobie au sein d'environnements dotés de tétrathionate, tel que l'intestin humain [432,433]. Chez *S. Typhi*, trois gènes de cet opéron représentent des pseudogènes [35]. Par ailleurs, la portion du SPI-2 comprenant les gènes de la tétrathionate réductase est détectée également chez *S. bongori*, alors que la portion encodant le SST3-2 est absente chez cette espèce et se trouve seulement chez *S. enterica* [394,434].

SPI-3 est un îlot de 36 kb contribuant à la survie intracellulaire et comportant l'opéron *mgtCB* qui permet la survie de *S. enterica* dans des conditions pauvres en Mg^{2+} . Régulé par le système *phoP/phoQ* [435-437], l'opéron *mgtCB* participe à la prolifération bactérienne au sein des macrophages et à la propagation systémique dans le modèle murin [29,438,439]. SPI-3 comprend également l'autotransporteur MisL impliqué dans la colonisation intestinale [440] et son régulateur MarT [441]. SPI-3 renferme aussi un régulateur transcriptionnel putatif de fonction inconnue. Les gènes *misL*, *marT* et celui du régulateur putatif sont tous des pseudogènes chez *S. Typhi* [35]. De plus, le SPI-3 du sérovar Typhi est dégradé davantage par six autres pseudogènes [35].

SPI-4 est un fragment de 24 kb participant à l'adhésion de *Salmonella* aux cellules épithéliales [442]. Il contient l'opéron *siiABCDEF* pour l'assemblage d'un Système de Sécrétion de Type Un (SST1) nécessaire au transport de SiiE qui représente une adhésine géante non fimbriaire de 595 kDa [275,443,444]. Cette adhésine permet à la bactérie d'interagir étroitement avec les microvillosités situées sur la surface apicale des cellules épithéliales, facilitant le transfert des effecteurs du SST3-1 vers la cellule hôte pour déclencher le réarrangement d'actine menant à l'invasion (*membrane ruffling*) [445]. Encodé par une seule séquence chez *S. Typhimurium*, *siiE* est divisé en deux séquences chez *S. Typhi*, dû à un codon d'arrêt, et on le considère donc comme pseudogène chez ce sérovar [37,275]. Cela traduit une perte de fonctionnalité chez *S. Typhi* d'une adhésine impliquée dans la colonisation intestinale par *S. Typhimurium* [444].

SPI-5 constitue un îlot de moins de 8 kb requis pour plusieurs procédés pathogéniques chez l'hôte [446]. Cette région renferme plusieurs effecteurs associés au SST3-1 et au SST3-2. Ces protéines effectrices contribuent à l'invasion de l'épithélium, à la survie intracellulaire et au maintien de l'infection systémique [441,446-449]. Aucune différence génétique significative ne distingue les SPI-5 de *S. Typhimurium* et *S. Typhi* [35].

SPI-6 s'étend sur 47 kb chez *S. Typhimurium* [450,451] et jusqu'à 59 kb chez *S. Typhi* [37]. Cet îlot participe à l'entrée de *Salmonella* dans les cellules épithéliales [451]. Il contient un Système de Sécrétion de Type Six (SST6), un opéron fimbriaire (*safABCD*), ainsi que l'invasine *pagN* [452]. Tous ces éléments sont présents chez les sérovars *Typhimurium* et *Typhi*. L'opéron fimbriaire *tcfABCD* associé au SPI-6 se trouve uniquement chez *S. Typhi* [33,450,453]. Chez *S. Typhimurium*, le SST6 du SPI-6 est associé à la réplication intracellulaire dans les macrophages et l'infection systémique dans la souris [454-458]. De plus, ce système de sécrétion est important pour la colonisation gastro-intestinale et la dissémination systémique chez le poussin [459]. Le SST6 de *S. Typhi* comprend deux pseudogènes, et de plus, quelques séquences codantes sont manquantes ou

différentes par rapport à *S. Typhimurium* [35]. Par conséquent, le SST6 était initialement considéré comme non fonctionnel chez *S. Typhi*, mais son activité sécrétoire a récemment été détectée et le système fut associé à une cytotoxicité de la part de ce sérovar envers les cellules épithéliales humaines [460]. De plus, des gènes du SST6 de *S. Typhi* ont été associés à la virulence systémique lors de l'infection d'un modèle de souris humanisée [461].

SPI-7 demeure le plus grand SPI identifié jusqu'à maintenant. Il est présent seulement chez *S. Typhi*, s'étend sur 134 kb et contient quelque 150 gènes [37,462-464]. SPI-7 comprend des gènes requis pour la synthèse de la capsule Vi [465] jouant un rôle critique dans la virulence de ce sérovar (décrit plus bas). Il renferme aussi un opéron encodant un pilus de type IVB pour l'entrée dans les cellules épithéliales [466] et le prophage SopE (ou *ST44*) arborant l'effecteur SopE du SST3-1 [467]. SopE est aussi présent chez *S. Typhimurium*, mais au sein du prophage tempéré SopE situé ailleurs dans son génome [468]. **SPI-8** est une région de 8 kb intégrée au sein du SPI-13 qui sera décrite plus loin.

SPI-9 est présent chez *S. Typhimurium* et *S. Typhi*. Il s'étend sur 16 kb et comprend trois gènes pour un SST1 et un gène encodant une protéine de très grande taille. Ce SPI partage 40% d'homologie de séquence avec *siiCDEF* provenant de SPI-4 [275,444]. Il fut initialement postulé que la grosse protéine de ce SPI était encodée par un pseudogène [36,275]. Par la suite, une étude supplémentaire démontra plutôt la présence d'une séquence intacte sans rupture, correspondant à une protéine putative de 386 kDa nommée BapA [469].

SPI-10 représente une région qui diffère largement parmi les sérovars *Typhimurium* et *Typhi*. Chez *S. Typhimurium*, SPI-10 est remplacé par un fragment de 20 kb non caractérisé et ne porte pas l'annotation SPI [35], ce qui en fait un SPI retrouvé seulement chez *Typhi*. Cependant, il existerait possiblement une association entre les gènes de cette région de 20 kb et un système de réparation d'ADN [33]. De manière intéressante, la délétion de cette région chez le sérovar *Typhimurium* atténue sa virulence dans un modèle d'infection murin

[457]. Chez *S. Typhi*, ce SPI fait 33 kb [37] et comprend le prophage *ST46* [97,470,471] dont les gènes contribuent à la survie dans les macrophages [472]. On y trouve également l'opéron fimbriaire *sefABCDR* (*Salmonella enterica* serovar *Enteritidis fimbriae*, identifié initialement chez ce sérovar) qui contient plusieurs pseudogènes.

SPI-11 inclut les gènes *pagC* et *pagD* régulés par *phoP/phoQ* et participant à la prolifération microbienne dans les macrophages [333,416]. La lipoprotéine d'enveloppe putative encodée par *envF* est présente seulement chez *S. Typhimurium*. Chez *S. Typhi*, SPI-11 contient la toxine typhoïdale CdtB unique à ce sérovar [473]. CdtB est sécrétée suite à l'internalisation de la bactérie dans une vacuole chez la cellule hôte. Son rôle dans le développement de la maladie systémique typhoïdale demeure inconnu [473].

SPI-12 comprend un vestige de phage et l'effecteur SspH2 associé au SST3-2 [474]. Chez *S. Typhimurium* seulement, on retrouve le gène *oafA* spécifique à *Salmonella* qui encode une acétylase de l'antigène O du LPS [462,475]. Ce SPI joue également un rôle dans la réplication intracellulaire chez les macrophages et dans l'infection systémique de la souris par *S. Typhimurium* [457,476]. Chez *S. Typhi*, cette région n'est composée que de pseudogènes, à l'exception de l'effecteur *sspH2* dont la séquence est intacte [35].

Le **SPI-13** diffère parmi les sérovars *Typhimurium* et *Typhi* au niveau d'un fragment de 8 kb représentant le SPI-8 seulement chez *S. Typhi* [35]. Chez *S. Typhimurium*, les gènes de cette région divergente qui remplace SPI-8 contribueraient à l'infection systémique chez la souris [457] et à la réplication intracellulaire au sein de macrophages murins [477]. La fonction du SPI-8 dans la virulence de *S. Typhi* est inconnue. Chez ce dernier, ce fragment arbore deux gènes conférant une résistance contre les bactériocines, ainsi que quatre pseudogènes [37]. Aucune implication dans la virulence n'a encore été associée à la région du SPI-13 conservée entre les deux sérovars [457].

SPI-14 est unique à *S. Typhimurium* [35,390]. Aucune fonction au niveau de la virulence ne lui est associée, mais l'expression de ses gènes est détectée chez *S. Typhimurium* infectant des macrophages [478]. **SPI-15** est présent uniquement chez *S. Typhi* [35]. Ce SPI ainsi que les SPI-16 et SPI-17 furent détectés par analyse bio-informatique [391]. **SPI-16** est présent chez les deux sérovars et contient plusieurs pseudogènes chez *S. Typhi*. Chez *S. Typhimurium*, trois gènes du SPI-16 sont requis pour la persistance intestinale dans un modèle murin [479]. **SPI-17** est présent uniquement chez *S. Typhi* et est constitué de plusieurs pseudogènes. Il comprend aussi un gène d'acyltransférase associée à la modification du LPS [391].

SPI-18 fut récemment identifié chez *S. Typhi* et ne comprend que deux séquences codantes qui sont absentes chez *S. Typhimurium*. Ces séquences constituent un opéron régulé par *phoP/phoQ* [392,480]. D'abord, *clyA* (portant aussi les noms *hlyE* et *sheA*) est retrouvé chez certaines souches pathogènes d'*E. coli* ainsi que chez les sérovars Typhi et Paratyphi A de *Salmonella*. Ce gène encode la cytolysine A reconnue pour son activité formatrice de pores lorsque sécrétée [481-485]. La toxine contrôle la prolifération de *S. Typhi* dans les macrophages [480]. De même, elle est critique pour l'invasion des cellules épithéliales et son expression hétérologue chez *S. Typhimurium* lui permet une colonisation systémique des organes chez la souris [392]. Le deuxième gène de SPI-18, *taiA*, est une invasine sécrétée qui favorise l'entrée de *S. Typhi* dans les macrophages humains [480].

Il existe chez les sérovars Typhimurium et Typhi des îlots de pathogénicité non considérés comme des SPI, mais qui arborent tout de même des facteurs de virulence importants. **CS54** en est un exemple. Il s'agit d'un îlot de 25 kb incluant 5 gènes : *shdA*, *ratB*, *ratA*, *sinI* et *sinH* (ou *sivH*). Chez *S. Typhimurium*, *shdA*, *ratB*, *sinH* sont tous impliqués dans la colonisation intestinale chez un modèle d'infection murin, mais le mécanisme de virulence exercé par ces trois composants est inconnu. Cependant, on reconnaît que ShdA lie la fibronectine de la matrice

extracellulaire de l'hôte, à l'aide d'un mimétisme moléculaire de l'héparine [486,487]. Chez *S. Typhi*, ces trois éléments représentent cependant des pseudogènes, ce qui explique en partie l'absence de persistance intestinale lors d'une fièvre typhoïde [37,488].

1.4.2 – Capsule Vi

L'antigène Vi (*Virulence-associated capsular polysaccharide* [207]) est le constituant de la capsule polysaccharidique (nommée capsule Vi) caractéristique du sérovar *S. Typhi* (absente chez *S. Typhimurium*). Il s'agit d'un facteur de virulence important modulé par trois loci: *viaB* régule la biosynthèse de l'antigène Vi, alors que *viaA* et le système à deux composantes *ompR/ompZ* contrôlent la régulation de *viaB* (alors que *viaB* se trouve dans le SPI-7, *viaA* et *ompR/ompZ* sont situés ailleurs dans le chromosome) [463,489-491]. Le locus *viaB* comporte des gènes associés à la régulation (*tviA*), à la synthèse (*tviBCDE*) et à l'export de l'antigène Vi à la surface bactérienne (*vexABCDE*) [492]. Les souches cliniques du sérovar Typhi isolées de patients atteints de fièvre typhoïde expriment typiquement Vi [493], mais l'îlot SPI-7 souffre d'instabilité génétique lors de passages *in vitro* de la bactérie [464,494], soulignant son importance spécifique durant l'infection [169]. Un rôle majeur de la capsule serait de masquer les LPS de surface pour prévenir leur détection par le *Toll-Like Receptor* (TLR)-4 de l'immunité innée chez l'hôte [495,496]. Par contre, des anticorps anti-Vi seraient tout de même produits par les cellules B de l'hôte [497]. De plus, Vi inhibe l'activation du complément, promeut la résistance au sérum et à la phagocytose et est impliqué dans la survie intracellulaire au sein des cellules phagocytaires [498-500]. La présence de la région *viaB* réduit l'invasion des cellules épithéliales par *S. Typhi* [501,502]. Le régulateur *tviA* inhibe la sécrétion d'IL-8 dans la muqueuse intestinale en réprimant la sécrétion de la flagelline bactérienne, ce qui empêche également la reconnaissance et l'activation du TLR-5 du système immunitaire de l'hôte [503,504]. Alors que *S. Typhimurium* déclenche une réponse inflammatoire avec infiltration massive de neutrophiles, *S. Typhi* peut traverser la barrière

épithéliale sans provoquer une telle réaction immunitaire, grâce à la présence de sa capsule. De cette manière, *S. Typhi* peut se disséminer systématiquement chez l'hôte [331,505].

1.4.3 – Flagelles

La sous-unité du flagelle de *Salmonella* est encodée par le gène *fliC* (variant H1 de l'antigène flagellaire H) ou *fljB* (variant H2) [506]. Le mécanisme de « variation de phase » ne permet l'expression que d'une seule variante à la fois lors de moments précis [507,508]. Ce changement de phase sous le contrôle du répresseur *hin* se produit chez le sérovar Typhimurium, mais la grande majorité des souches de *S. Typhi* ne possèdent que la variante FliC [509]. Effectivement, une délétion ayant éliminé à la fois *fljB* et *hin* maintient *S. Typhi* en phase flagellaire *fliC* [128]. Certains isolats de *S. Typhi* sont dotés d'un plasmide linéaire de 27 kb encodant la flagelline z66 (encodée par *fljB^{z66}*) apparentée à FljB [510]. Chez ces souches, un répresseur similaire à Hin bloque l'expression de *fliC*. Une réversion permanente vers la phase FliC peut se produire chez ces souches suite à la délétion d'une portion du plasmide linéaire [511].

Les flagelles représentent de longs filaments hélicoïdaux implantés dans la membrane bactérienne permettant à *Salmonella* de se déplacer vers la barrière épithéliale dans l'intestin [314]. Cette motilité contribue à l'invasion des cellules non phagocytaires en médiant un contact étroit entre la bactérie et la cellule ciblée [512-514]. La flagelline de *Salmonella* stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans l'épithélium intestinal, mais y inhibe également l'apoptose [515-518]. Dans les macrophages, la flagelline est transférée vers le cytoplasme par l'entremise du SST3-1, menant à l'induction de l'inflammasome et de la caspase-1 provoquant une mort cellulaire nommée « pyroptose » [519-523]. Cependant, les données recueillies *in vivo* montrent que le rôle de la flagelline dans la virulence de la bactérie demeure accessoire et dépend du modèle d'infection adopté [524-526].

1.4.4 – Fimbriae

Les fimbriae et pili à la surface de la bactérie contribuent à son interaction avec la cellule hôte. Ces structures sont habituellement spécifiques à un récepteur et agissent à différentes étapes critiques au cours de l'infection. Les sérovars Typhimurium et Typhi ont chacun leur propre répertoire de fimbriae, dont huit sont communs aux deux : *bcf*, *csg* (ou *agf*), *fim*, *saf*, *stb*, *stc*, *std* et *sth* [36,37]. D'autres sont uniques à un sérovar par rapport à l'autre, tels que *lpf*, *stf*, *pef*, *sti* et *stj* trouvés seulement chez *S. Typhimurium* [36]. Les opérons fimbriaires *bcf*, *lpf*, *stb*, *stc*, *std* et *sth* contribuent tous à la colonisation de l'intestin murin par *S. Typhimurium* [527]. Plusieurs fimbriae de *S. Typhimurium* jouent un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales [528-534], le développement de la réponse pro-inflammatoire [535,536] et la formation de biofilms [537-539].

Chez *S. Typhi*, on retrouve également une combinaison de fimbriae uniques, dont *sef*, *sta*, *ste*, *stg* et *tcf* [37]. Ce sérovar a aussi un pilus de type IVB (encodé par le SPI-7) qui médie l'adhésion aux cellules en se liant à un récepteur particulier, le « régulateur de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose » (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* ou CFTR) [466,540-542]. Tcf réagit avec le sérum de patients atteints de fièvre typhoïde [543] et Stg promeut l'adhérence aux cellules épithéliales, en plus d'atténuer la phagocytose par les macrophages [544].

Tous les opérons fimbriaires de *S. Typhimurium* sont intacts, alors que plusieurs sont affectés par un ou même plusieurs pseudogènes chez *S. Typhi* (*bcfC*, *fimI*, *safE*, *sefA*, *sefD*, *steA*, *stgC*, *sthC* et *sthE*) [453]. Les fimbriae encodés par ces opérons ne seraient donc pas assemblés à la surface bactérienne. Cela pourrait expliquer, du moins en partie, la distinction entre le tropisme des niches colonisées par les deux sérovars [35,169].

1.4.5 – Plasmides

La majorité des souches du sérovar Typhimurium sont dotées du plasmide de virulence pSLT d'environ 90 kb qui est transmissible entre bactéries. Ce vecteur contient l'opéron *spv* participant à la survie intracellulaire dans les macrophages et contribuant à la virulence chez la souris. Le plasmide encode aussi la fimbria *pef* (*plasmid-encoded fimbriae*) qui joue un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales, l'induction de la réponse inflammatoire et la formation de biofilms [92,532,535,539,545,546]. Sans ce plasmide, la virulence de *S. Typhimurium* est atténuée dans la souris [547], mais peut-être rétablie par la seule addition de l'opéron *spv* [548]. Cet opéron encode la toxine SpvB qui ADP-ribosyle l'actine, déstabilise le cytosquelette et crée de la cytotoxicité auprès de la cellule hôte [549-552]. L'opéron encode aussi la protéine SpvC qui inactive des protéines kinases impliquées dans certaines voies signalétiques cellulaires [553,554]. Ces deux protéines sont sécrétées dans la cellule hôte par le SST3-2 [552,554]. *S. Typhimurium* peut également porter des plasmides de multirésistance aux antibiotiques allant jusqu'à 200 kb et d'autres plasmides de moindre taille (<20 kb) de fonction inconnue [555].

Chez *S. Typhi*, pSLT est absent, mais des plasmides de la famille incHI conférant une multirésistance aux drogues sont communément observés [556-558]. Plus particulièrement, la souche CT18 contient le plasmide pHCM1 qui atteint environ 218 kb et rend la bactérie résistante à plusieurs antibiotiques (y compris ceux administrés pour traiter la fièvre typhoïde) et métaux lourds [37]. Le plasmide cryptique pHCM2 d'environ 106 kb se trouve également chez cette souche. Sa fonction est inconnue et ce plasmide est rarement présent chez d'autres isolats de *S. Typhi* [37,76,559]. Un plasmide linéaire de 27 kb, pBSSB1, a été détecté auprès de souches isolées en Indonésie. Ce plasmide encode l'antigène flagellaire z66 [510,511] décrit plus haut. D'autres plasmides, plus petits pour la plupart, ont été découverts chez des souches de *S. Typhi*, mais leurs fonctions n'ont pas été élucidées [169].

1.5 – Outils pour étudier la virulence de *Salmonella*

1.5.1 – Modèles d'infection

Plusieurs modèles d'infection sont disponibles afin de disséquer la virulence de *Salmonella*. Tout d'abord, diverses lignées cellulaires stables sont disponibles pour reproduire l'interaction entre la bactérie et les différents types cellulaires rencontrés chez l'hôte. Par exemple, pour étudier l'adhésion et l'invasion de l'épithélium, plusieurs modèles de cellules épithéliales existent, telles que les lignées immortalisées *HeLa* (ATCC[®] CCL-2TM), *HT-29* (ATCC[®] HTB-38TM), *293* ou *HEK-293* (ATCC[®] CRL-1573TM), *intestine 407* ou *INT407* ou *Henle-407* (ATCC[®] CCL-6TM) et *HEp-2* (ATCC[®] CCL-23TM). Notamment, le mécanisme d'entrée dans les cellules M fut illustré en infectant expérimentalement une co-culture de cellules épithéliales polarisées *Caco-2* (ATCC[®] HTB-37TM) et de cellules B *Raji* (ATCC[®] CCL-86TM) [341,560,561]. Des lignées immortalisées de cellules phagocytaires ont été employées dans de nombreuses études sur la phagocytose et la survie intracellulaire de *Salmonella*, telles que les monocytes/macrophages murins *RAW264.7* (ATCC[®] TIB-71TM) et *J774A.1* (ATCC[®] TIB-67TM), ainsi que les monocytes humains (différenciables en macrophages) *THP-1* (ATCC[®] TIB-202TM) et *U-937* (ATCC[®] CRL-1593.2TM). Par ailleurs, des cellules primaires isolées d'espèces animales (typiquement de la souris) ou de volontaires humains permettent de constituer un bon nombre de modèles cellulaires *ex vivo* de monocytes/macrophages, de cellules dendritiques et de granulocytes [341]. De plus, il fut récemment démontré que la pathogénèse de *Salmonella* varie selon le statut de polarisation de la cellule infectée. Effectivement, les bactéries sont internalisées plus efficacement au sein des cellules polarisées qu'auprès des cellules non polarisées et des phagocytes. Par ailleurs, la survie bactérienne dans les cellules polarisées se montre indépendante du SPI-2, alors que cet îlot de pathogénicité est critique à la répllication au sein des autres types cellulaires [562].

Le sérovar Typhi ne se développe en agent pathogène que chez l'être humain. Afin d'étudier la pathogenèse de la fièvre typhoïde *in vivo*, les chercheurs doivent donc choisir des sérovats à spectre d'hôtes moins strict qui déclenchent des symptômes similaires à ceux observés chez l'humain. Le sérovar Typhimurium représente un candidat de choix, car cette bactérie peut infecter systématiquement la souris et causer chez elle un syndrome imitant la fièvre typhoïde humaine (dépendamment du contexte génétique de l'animal infecté) [147]. Plusieurs paramètres peuvent être ajustés chez ce modèle murin, notamment la voie d'infection (orale, intrapéritonéale ou intraveineuse) et la souche inoculée (mutants atténués, types sauvages virulents, isolats cliniques ou souches vaccinales). Cela offre aux investigateurs la possibilité d'étudier le comportement pathologique de la bactérie ainsi que la réponse immunitaire anti-*Salmonella* de l'hôte.

Chez le modèle murin, la susceptibilité de l'hôte à l'infection typhoïdale dépend principalement de l'expression du gène *solute carrier family 11 member 1* ou *slc11a1* (anciennement nommé *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1* ou NRAMP1) [147,563]. Ce gène encode un transporteur de cations divalents (Fe^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+}) et il est présent chez les macrophages, les cellules dendritiques et polymorphonucléaires ainsi que chez les neurones [564-566]. Il est situé au niveau de la membrane des endosomes tardifs et des lysosomes chez les macrophages, mais il est absent des endosomes précoces [567,568]. Cet antiporteur est capable de transférer les cations à travers la membrane, dans une direction ou l'autre. Cependant, il fut postulé que Slc11a1 importe les cations du cytoplasme vers l'intérieur des compartiments vacuolaires acides et qu'ainsi, la « réaction de Fenton » génère des radicaux hydroxyles toxiques envers les bactéries à partir du Fe^{2+} importé [565,569-571]. Il est également proposé que Slc11a1 transporte les cations divalents hors du phagosome acidifié vers le cytoplasme de la cellule et que cette déplétion nuit à la survie et réplique des bactéries dans leur niche intracellulaire [572-577]. Quoiqu'il en soit, l'expression d'un Slc11a1 fonctionnel est essentielle pour inhiber la réplique intracellulaire

de *Salmonella in vitro*, ainsi que dans le foie et la rate chez le modèle murin. Des macrophages provenant de souris *slc11a1^{-/-}* permettent une multiplication intracellulaire plus accrue de *S. Typhimurium* comparativement aux macrophages *slc11a1^{+/+}* [380,577,578]. Une mutation d'origine naturelle du résidu Gly en Asp à la position 169 de Slc11a1 rend la souris tout aussi susceptible aux infections par *Leishmania donovani*, *Mycobacterium bovis* et *S. Typhimurium* que la souris dont le gène est délété. Cette mutation correspond donc à un phénotype Slc11a1^{-/-} [563,579]. Cette mutation rend la souris vulnérable à plusieurs autres pathogènes appartenant aux genres *Mycobacterium*, *Toxoplasma*, *Candida* et *Leishmania*. Chez l'Homme, le gène *slc11a1* est associé à de multiples maladies infectieuses (VIH, tuberculose, lèpre, méningite et leishmaniose) et auto-immunes (arthrite rhumatoïde, diabète, sarcoïdose et maladie de Crohn) [563]. Cependant, des polymorphismes auprès de *slc11a1* chez l'humain ne sont pas associés à une augmentation de la susceptibilité de l'individu face à la fièvre typhoïde causée par *S. Typhi* [580].

Les souris susceptibles (*slc11a1^{-/-}*) sont vulnérables à une dose infectieuse relativement faible du sérovar *Typhimurium* administrée oralement et succombent de 7 à 10 jours suivant l'inoculation [147,280,282]. Les lignées murines *C57/BL6* et *BALB/c* comprennent l'allèle *slc11a1* muté et sont grandement utilisées comme modèles de fièvre typhoïde aiguë [581]. Les souris résistantes (*slc11a1^{+/+}*) survivent soit en éliminant les bactéries ou en devenant des porteuses chroniques asymptomatiques. La lignée murine résistante *129/SvJ* est un modèle approprié pour des études de persistance bactérienne par *Salmonella*. Ces souris *slc11a1^{+/+}* infectées par *S. Typhimurium* porteront la bactérie chroniquement plusieurs semaines à la suite de l'administration orale. *Salmonella* résidera alors au sein du foie, de la rate et des ganglions lymphatiques mésentériques. En fait, les bactéries peuvent être isolées des organes systémiques jusqu'à un an après l'inoculation [281]. Ainsi, les souris susceptibles et résistantes offrent aux chercheurs des modèles de fièvre typhoïde aiguë et chronique, respectivement [147,563]. Moins

fréquemment employée, l'infection orale du chimpanzé avec *S. Typhi* peut également servir comme modèle de fièvre typhoïde [582].

Par contre, le modèle murin ne s'apparente pas à la gastro-entérite observée lors d'une infection inflammatoire localisée causée par *S. Typhimurium* et d'autres NTS chez l'humain. Dans le modèle murin de fièvre typhoïde, la souris infectée ne voit pas son tractus intestinal colonisé par *S. Typhimurium* et n'est pas soumise à une diarrhée ou une entérocolite [582]. Deux principaux modèles d'infection localisée inflammatoire ont été mis au point avec *S. Typhimurium*. Le premier implique l'infection orale du veau qui développe une entérocolite simulant étroitement celle chez l'humain. Ce modèle présente cependant des inconvénients logistiques évidemment liés à la grosseur et aux besoins de l'animal. Pour contourner ces difficultés, des changements furent apportés à ce modèle. Des sections de l'intestin de l'animal furent liées en boucles afin d'utiliser un seul et même animal pour plusieurs expériences (différentes doses infectieuses, divers mutants, etc.) [582]. Un modèle murin reproduisant la gastro-entérite humaine fut ensuite développé suite à l'acquisition de données démontrant que les souris sans flore microbienne sont atteintes d'entérocolite lorsqu'exposées à *S. Typhimurium*. Ce modèle est basé sur le traitement du microbiote intestinal avec de la streptomycine 24 heures avant l'inoculation orale du sérovar Typhimurium [327,514,583]. La pathologie chez cette souris se caractérise par l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau du caecum et du colon, ainsi que la création d'oedèmes. Cependant, l'animal ne présente aucune diarrhée ni inflammation du petit intestin telles qu'observées chez l'humain. Ce modèle représente tout de même une avancée remarquable pour l'étude de l'infection localisée associée à *Salmonella* [584]. De plus, le macaque rhésus préalablement infecté avec le Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS), reproduisant les conditions immunodépressives générées chez l'individu humain infecté par le VIH, est utilisé comme modèle de bactériémie systémique associée aux NTS et également comme modèle d'entérocolite causée par *S. Typhimurium* [585,586]. La colonisation

intestinale par *Salmonella* peut également être étudiée en inoculant le ver *Caenorhabditis elegans* [587].

Une souris en santé inoculée avec le sérovar Typhi est résistante à l'infection et ne développe aucune maladie [588]. L'administration orale de *S. Typhi* mènera à son internalisation par les cellules M au niveau de l'épithélium, suivie de son élimination au sein des plaques de Peyer [588,589]. L'inoculation de doses plus élevées, administrées par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, ne suffit pas pour créer des symptômes chez les lignées murines *C57/BL6* et *BALB/c* [590]. *S. Typhi* représente un pathogène adapté spécifiquement aux tissus et organes du SRE humain et la composition de ce système modulerait donc la spécificité d'hôte de la bactérie [591]. Ainsi, l'implantation de cellules du système immunitaire humain dans le SRE de souris immunosupprimées permettrait à *S. Typhi* de se propager jusqu'aux organes secondaires, tels que le foie et la rate, et de mettre en place une infection systémique [592]. Les notions acquises sur la pathogenèse de *S. Typhi* chez l'humain proviennent en grande partie d'extrapolations issues d'expériences impliquant l'infection de modèles murins par *S. Typhimurium* décrits plus haut. Cependant, ces modèles ne reproduisent pas complètement les réponses immunitaires innées et acquises de l'humain face à *S. Typhi* [580,593]. De plus, les gènes de virulence critiques qui distinguent les sérovares Typhimurium et Typhi leur confèrent des mécanismes moléculaires spécifiques qui ne peuvent pas être étudiés adéquatement, par exemple la capsule Vi qui est présente seulement chez *S. Typhi*. L'absence d'un modèle animal de petites dimensions demeure un obstacle majeur pour l'étude de la pathogenèse de *S. Typhi*. Au cours des dernières années, des lignées de souris humanisées ont été mises au point comme modèles d'infection pour plusieurs virus spécifiques à l'humain, tels que le virus Herpes Simplex 2 [594], le VIH-1 [595], le virus de l'Hépatite C [596] et le virus de la Dengue [597].

De telles souris humanisées ont récemment été utilisées comme modèles pour étudier l'interaction entre *S. Typhi* et l'hôte. Ces souris *Rag2^{-/-} γc^{-/-}* ou *Non-*

Obese Diabetic (NOD)-SCID-IL12 γ ^{null} immunosupprimées et greffées de cellules souches hématopoïétiques humaines peuvent être sévèrement infectées par *S. Typhi* [461,598,599]. Lorsqu'inoculées par voie intrapéritonéale ou intraveineuse, ces souris exhibent les signes typiques de la maladie humaine, tels que la fièvre, la perte de poids, les traits neurologiques associés à la méningite et la mortalité. Les bactéries se propagent jusqu'au foie et la rate, et se multiplient dans ces organes. Ainsi, *S. Typhi* colonise de façon systémique les souris dotées d'un système immunitaire humain (*Human Immune System* ou HIS) [592]. Ces animaux développent un système hématopoïétique comprenant des cellules humaines telles que des leucocytes CD45⁺, des cellules *Natural Killer* (NK), des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, des macrophages et des cellules dendritiques qui sont permissives à l'infection par *S. Typhi* [592,594,595]. Parmi les trois modèles murins avec HIS existant présentement [461,598,599], certaines distinctions au niveau de l'essor de l'infection sont observées. Effectivement, malgré des doses d'infection équivalentes, certaines souris sont infectées de manière persistante, alors que d'autres décèdent. Cela est probablement dû à des différences auprès des protocoles expérimentaux et à des variations dans la nature et la fréquence des cellules humaines du HIS de chaque souris. Malgré les degrés variés de colonisation et de signes cliniques, tous ces modèles ont démontré la dissémination systémique de *S. Typhi* [592]. Tout dernièrement, un modèle de souris *tlr11*^{-/-} a été développé [600]. Le TLR-11 reconnaît la flagelline de *Salmonella* dans l'intestin de la souris et son absence rend l'animal plus susceptible à *S. Typhimurium* qui se dissémine davantage systématiquement et provoque plus de mortalité. Le TLR-11 n'est pas retrouvé chez l'humain. La souris *tlr11*^{-/-} inoculée oralement avec *S. Typhi* développe une infection systémique létale reproduisant les traits de la fièvre typhoïde humaine. De plus, ce modèle murin peut être immunisé contre *S. Typhi* par vaccination avec des bactéries inactivées par la chaleur ou par transfert de sérum prélevé d'un animal immunisé [600]. La mise au point des modèles murins d'infection par le sérovar Typhi représente une avancée majeure pour l'étude de *Salmonella*.

1.5.2 – Techniques génétiques et moléculaires

Les facteurs de virulence de *Salmonella* sont loin d'être tous connus. L'identification et la caractérisation de nouveaux facteurs de virulence devraient permettre la création de meilleures stratégies pour éradiquer efficacement les infections causées par *Salmonella*. De multiples techniques de biologie moléculaire basées sur la génomique et la protéomique de la bactérie ont été développées au courant des dernières décennies [34,601]. Cette section portera sur les méthodes à haut débit ayant contribué au savoir sur la virulence de *Salmonella* (Tableau III).

Type d'approche	Technique (abr.)	Description	Mesure de l'induction/viabilité
Identification de gènes induits <i>in vivo</i>	In Vivo Expression Technology (IVET)	détection de promoteurs induits durant l'infection par fusion d'ADNg de <i>Salmonella</i> à un gène essentiel <i>in vivo</i>	rapporteur <i>purA-lacZY</i>
	Recombinase-based IVET (RIVET)	détection de promoteurs induits durant l'infection par fusion d'ADNg à une recombinase excisant une cassette de résistance	recombinase <i>tnpR</i>
	Differential Fluorescence Induction (DFI)	détection de promoteurs induits durant l'infection par fusion d'ADNg à une protéine fluorescente suivie d'un tri cellulaire par cytométrie en flux	<i>green fluorescent protein</i> (GFP)
Profilage transcriptionnel	Hybridation de transcrits sur biopuces	mesure des changements transcriptionnels par hybridation	biopuce d'ORF
	Selective Capture of Transcribed Sequences (SCOTS)	mesure des changements transcriptionnels par capture de transcrits bactériens durant l'infection suivie d'hybridation	biopuce d'ORF
	High-Throughput Sequencing (HTS)	profil d'expression obtenu par séquençage quantitatif des transcrits	séquençage à haut débit
Analyse d'interactions protéomiques	Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)	capture de séquences génomiques associées à une protéine liant l'ADN	biopuce incluant des séquences intergéniques
	Analyse de gel à deux dimensions et Spectrométrie de masse	détection des protéines synthétisées dans des conditions données	NA
Sélection négative de mutants par Tn	Signature-Tagged Mutagenesis (STM)	mesure de la viabilité de mutants Tn par retraçage d'étiquettes spécifiques à chaque insertion	étiquette de séquence unique/PCR
	Transposon Site Hybridization (TraSH)	mesure de la viabilité de mutants Tn par hybridation de transcrits uniques, identification de l'ORF inactivé	biopuces d'ORF
	Transposon-Mediated Differential Hybridization (TMDH)	mesure de la viabilité de mutants Tn par hybridation de transcrits uniques, identification de l'endroit précis d'insertion du Tn dans le génome	<i>tiling array</i>
	Transposon-Directed Insertion Site Sequencing (TraDIS)	mesure de la viabilité de mutants Tn par séquençage quantitatif de transcrits uniques, identification de l'endroit précis d'insertion du Tn dans le génome	séquençage à haut débit
Sélection négative de mutants définis	Array-Based Analysis of Cistrons Under Selection (ABACUS)	mesure de la viabilité de mutants définis par hybridation de transcrits uniques représentant chaque gène inactivé	biopuce d'oligonucléotides

NA, non applicable; Tn, transposon

Tableau III. Méthodes à haut débit pour l'identification de gènes de virulence.

Adapté de [601].

1.5.2.1 – Séquençage de génomes, biopuces d'ADN et génomique comparative

Le séquençage du génome auprès d'une bactérie comme *Salmonella* constitue une étape importante vers la meilleure compréhension de son comportement pathogène. Les premières séquences génomiques annotées de

Salmonella ont été publiées en 2001. Les sérovars Typhimurium (souche LT2) et Typhi (souche CT18), grandement étudiés pour leur importance médicale, présentent des génomes de 4 857 432 et 4 809 037 paires de bases (pb), respectivement [36,37]. La réduction récente des coûts associés au séquençage et le développement de nouvelles technologies ont permis l'obtention rapide des séquences chromosomiques de plusieurs souches de *Salmonella*. Par exemple, les technologies 454 (Roche) et Solexa (Illumina) ont permis le séquençage de 19 isolats du sérovar Typhi en 2008 [79]. Les séquences complètes de 23 génomes sont maintenant connues, dont celles de souches appartenant à 15 sérovars distincts de la sous-espèce *enterica*, d'une souche de la sous-espèce *arizonae* et d'une de l'espèce *S. bongori* [34,601]. En plus des séquences codantes (*Open Reading Frame* ou ORF) annotées, d'autres caractéristiques des génomes sont continuellement mises en lumière, dont des petits ARN régulateurs (*small regulatory RNA* ou sRNA) et de très petites protéines membranaires, ce qui améliore les analyses génomiques [602,603].

Le séquençage de génomes a permis la création de biopuces d'ADN constituées d'ORF [32,397] et de biopuces *tiling array* plus complètes [604]. Des travaux de génomique comparative, de profilage transcriptionnel et de criblage à haut débit ont été réalisés grâce à ces précieux outils de biologie moléculaire [32,128,454,455,605-608]. De plus, les biopuces ont été employées comme outil de biotypage moléculaire, efficace pour l'identification d'isolats de *Salmonella* [609-612].

Malgré les avancées amenées par le séquençage et l'annotation des génomes, la fonction des gènes doit souvent être vérifiée et déterminée expérimentalement. Le génome de *S. Typhimurium* contient environ 4500 gènes et 1000 d'entre eux demeurent sans fonction attribuée. Ces gènes sont annotés uniquement selon une prédiction bio-informatique de leur localisation cellulaire [36]. *S. Typhi* contient environ 200 ORF hypothétiques et 600 ORF hypothétiques

conservés [37]. Une meilleure compréhension de la pathogénèse de *Salmonella* repose sur la découverte de la fonction de ces gènes [601].

Des expériences de génomique comparative avec hybridation sur biopuces (*Comparative Genomic Hybridization* ou CGH) ont par exemple permis l'analyse du contenu génétique de souches cliniques non séquencées, souvent responsables d'intoxications alimentaires [606,607,613,614]. Ce type d'analyse a démontré que les génomes de souches d'un même sérovar peuvent surprenamment différer entre elles davantage que les souches de divers sérovares. Ces profils génomiques (qu'on nomme « génovars ») diffèrent largement les uns par rapport aux autres et pourraient traduire des modes de virulence distinctifs au sein d'un même sérovar [96].

1.5.2.2 – Identification de facteurs de virulence par expression de gènes

1.5.2.2.1 – Expression de gènes in vivo

Les stratégies de « piège à promoteurs » (*promoter trap*) ont été développées au courant des années 1980. Elles ont permis l'identification de séquences promotrices induites dans certains environnements, comme les tissus infectés [615]. Décrite en 1993, la *In Vivo Expression Technology* (IVET) permet la détection de promoteurs activés spécifiquement durant l'infection par *Salmonella*. Une auxotrophie envers la purine chez un mutant *purA* empêche son infection de la souris. L'ADNg de *S. Typhimurium* fut alors cloné en amont d'une fusion *purA-lacZY* (sans promoteur) située au niveau du chromosome chez un mutant *purA*. Ainsi, cette librairie de promoteurs fut passée dans un modèle murin afin d'identifier des promoteurs induits dans cet environnement [616]. Le gène rapporteur a ensuite été changé pour une cassette de résistance au chloramphénicol (*cat*) [617]. Par la suite, la *Recombinase-based IVET* (RIVET) fut mise au point. Cette technique utilise une recombinaise de haute sensibilité (la résolvasse *tnpR*) en amont de laquelle l'ADNg bactérien est cloné. L'expression de la résolvasse provoque l'excision d'une cassette de résistance à un antibiotique. La perte de

cette cassette de résistance révèle l'induction d'un promoteur et le moment précis de cette induction durant l'infection, ce qui permet donc la détection d'activations transitoires de gènes [618]. La *Differential Fluorescence Induction* (DFI) est une stratégie de piège à promoteurs qui emploie une protéine fluorescence verte (*Green Fluorescent Protein* ou GFP) comme rapporteur. Des fragments d'ADNg sont clonés en amont d'un gène de GFP sans promoteur et ainsi l'induction de la fluorescence peut être détectée sous une variété de conditions expérimentales. Cette technique comprend ensuite une étape de tri cellulaire par cytométrie en flux (*Fluorescence-Activated Cell Sorting* ou FACS) en fonction de l'expression de la protéine fluorescente. La DFI permet d'identifier des promoteurs induits au cours de l'infection sans faire intervenir d'auxotrophies ou de mécanismes de résistance aux antibiotiques [619-621].

1.5.2.2.2 – *Profilage transcriptionnel*

Le profilage transcriptionnel par biopuce permet d'identifier l'ensemble des gènes sur-régulés ou sous-régulés lors d'une condition expérimentale définie. Cette technique fut utilisée chez *Salmonella* pour évaluer l'ensemble des changements transcriptionnels chez des mutants de régulation, chez des bactéries lors d'infections et au sein de conditions de croissance *in vitro* reproduisant les environnements retrouvés *in vivo*, comme la bile [622]. L'extraction d'ARN en conditions d'infection est compliquée par le fait que l'ARN bactérien est présent au sein d'un mélange où l'ARN de l'hôte prédomine. Cette difficulté fut surmontée grâce à une méthode d'enrichissement impliquant une stabilisation de l'ARN bactérien et l'utilisation d'un détergent lysant spécifiquement la membrane eucaryote et non bactérienne [478]). Cette méthode permet de tracer le profil transcriptionnel global du sérovar Typhimurium chez les macrophages murins [478] et auprès des cellules épithéliales [623].

La *Selective Capture of Transcribed Sequences* (SCOTS) est bien adaptée au problème de rareté lié à l'ARN bactérien au sein d'environnements eucaryotes. Il s'agit d'une technique isolant préférentiellement l'ARN bactérien au sein de

cellules infectées [624]. Au cours de cette technique, l'ARN total est extrait des cellules infectées par *Salmonella* puis converti en ADN complémentaire (ADNc). Par la suite, ce mélange d'ADNc est incubé avec une préparation d'ADNg bactérien biotinylé. L'ADNc bactérien qui s'hybride spécifiquement à l'ADNg biotinylé peut alors être isolé avec de la streptavidine qui se lie fortement à la biotine. Cela enrichit spécifiquement les gènes bactériens transcrits durant l'infection. SCOTS a permis d'identifier plusieurs gènes de *S. Typhi* exprimés lors de l'infection de macrophages humains [625] en plus de générer son transcriptome global chez ces cellules [626]. Cette technique a aussi été utilisée pour identifier des gènes transcrits chez *S. Typhimurium* dans les macrophages murins et absents chez *S. Typhi* [627] et également l'inverse dans les macrophages humains [628].

Les protocoles les plus récents pour l'identification des transcrits régulés différemment utilisent la *High-Throughput Sequencing Technology* (HTS) [136,629]. La technologie de séquençage d'ARN d'*Illumina* fut appliquée de manière quantitative (en utilisant la proportionnalité existant entre le nombre de lectures d'une séquence et son taux de transcription) afin d'obtenir des transcriptomes chez *Salmonella*, dont celui de *S. bongori* [629] et de *S. Typhi* chez qui de nouveaux ARN non codants (ARNnc) furent identifiés [136]. Les résultats obtenus par séquençage ont été comparés à ceux générés parallèlement à partir de biopuces. Cette analyse comparative démontra que les deux technologies sont en fait complémentaires, sans nécessairement être redondantes [136]. La méthodologie HTS sera plus largement adoptée à mesure que les coûts d'utilisation baisseront et que les applications techniques s'étendront [601].

1.5.2.2.3 – *Approches protéomiques*

La protéomique se combine à la génomique au sein de la méthode du *Chromatin Immunoprecipitation* (ChIP) qui s'applique à des séquences ciblées par un régulateur global. Lors de cette technique, une protéine d'intérêt liant l'ADN, notamment un facteur de transcription, est fixée *in vivo* à l'ADNg aux sites d'interaction. L'ADN bactérien est ensuite fragmenté et les séquences liées à la

protéine d'intérêt sont capturées à l'aide d'une étiquette spécifique ou d'un anticorps s'associant à cette protéine [630]. Les séquences d'ADN attachées à la protéine étudiée sont amplifiées puis identifiées par des méthodes variées, notamment par hybridation à des biopuces. Cette approche permet de caractériser les réseaux de gènes qui sont sous l'effet d'un régulateur à l'étude.

L'expression de protéines serait un meilleur indicateur de l'état physiologique de la bactérie que la transcription de gènes en ARNm. Cependant, des problèmes d'obtention reproductible de quantités suffisantes de protéines bactériennes limitent l'usage des techniques de protéomique. De plus, les protéines produites en quantités minimales sont difficiles à détecter au sein d'un assortiment complexe de protéines variées [601]. Néanmoins, des progrès considérables ont été réalisés grâce à une combinaison d'analyse sur gel à deux dimensions (*2D gel analysis*) et de spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry* ou MS). Des techniques de MS très sensibles ont permis l'analyse comparative de protéomes, offrant une meilleure compréhension de la régulation des protéines traduites et de leurs rôles lors de l'infection [477,631-636].

1.5.2.3 – Identification de facteurs de virulence par sélection négative de gènes

1.5.2.3.1 – Librairie de mutants par insertion de transposons

Les Tn stables ont été largement employés depuis les années 1980 pour la création de bibliothèques (ou banques) de mutants à des fins d'analyse phénotypique [368,637-648]. Le criblage traditionnel de mutants d'insertion est coûteux et fastidieux, car le séquençage de mutants individuels présentant des phénotypes d'intérêt est nécessaire afin d'identifier le lieu d'insertion dans le génome. L'arrivée des stratégies de sélection négative a résolu ce problème en permettant de cribler simultanément à haut débit de nombreux mutants non viables durant l'infection [601].

En 1995, Hensel *et al.* développèrent la première stratégie de sélection négative appliquée à l'infection par *Salmonella*, la *Signature-Tagged Mutagenesis*

(STM) [649]. La STM identifie les mutants d'insertion grâce à des étiquettes constituées de séquences génétiques uniques ajoutées extrinsèquement aux Tn. De petites banques de mutants chez *S. Typhimurium* furent criblées chez un modèle murin de fièvre typhoïde et les mutants sous-représentés suite à l'infection furent identifiés par *Southern Blot* [649]. Cette technique a d'ailleurs permis l'identification du SPI-2 chez *Salmonella* [336]. La STM fut ensuite adoptée dans le cadre de nombreuses études sur les gènes requis pour la survie et la croissance de la bactérie chez plusieurs hôtes et niches d'infection [275,650-654]. Au fil du temps, des améliorations ont été amenées à la technique originale, dont l'usage du PCR [655] pour évaluer l'atténuation des mutants lors de l'infection [390].

D'approche révolutionnaire, la STM présente tout de même un inconvénient : la nécessité de créer une étiquette spécifique pour chaque mutant. La construction de bibliothèques volumineuses est donc laborieuse [601]. Afin de réaliser des criblages plus complets, deux groupes de recherche de l'Université *Harvard* mirent au point une nouvelle méthode incorporant l'usage de biopuces pour la génération d'étiquettes uniques (ou de signatures), éliminant ainsi le besoin d'ajouter extrinsèquement ces étiquettes aux Tn. Les équipes de Rubin [656] et Church [657] modifièrent le Tn en y intégrant la séquence promotrice de la polymérase T7 avec une orientation vers l'extérieur du Tn. Cette dernière permet d'induire la transcription *in vitro* de l'ADNg adjacent au site d'insertion du Tn, générant ainsi un transcrit unique et spécifique (l'étiquette) pour chaque mutant. La représentation des transcrits est ensuite mesurée par leur hybridation à des biopuces d'ORF. Cela permet de répertorier les mutants sélectionnés négativement lors de la condition expérimentale choisie (Figure 5). Cette méthodologie fut appliquée auprès de *Mycobacterium* par l'équipe de Rubin qui nomma la technique *Transposon Site Hybridization* (TraSH) [656]. La version similaire de Church fut utilisée chez *E. coli* [657]. La technique fut par la suite utilisée dans le cadre d'études sur *Salmonella*. Une version quelque peu modifiée fut appliquée pour le criblage de 10^5 mutants par Tn du sérovar Typhimurium au sein de macrophages murins et chez un modèle murin d'infection aiguë [454]. Plusieurs

des gènes identifiés par la STM comme étant importants pour l'infection dans le modèle murin [649] furent également détectés avec la technique TraSH (dont le SPI-2) [454], démontrant l'efficacité de cette méthode réalisée grâce à la transcription par le T7. La méthodologie TraSH fut utilisée à nouveau pour déterminer les gènes impliqués dans la persistance à long terme (jusqu'à 28 jours d'infection) de *S. Typhimurium* dans les souris résistantes *slc11a1^{+/+}* [455].

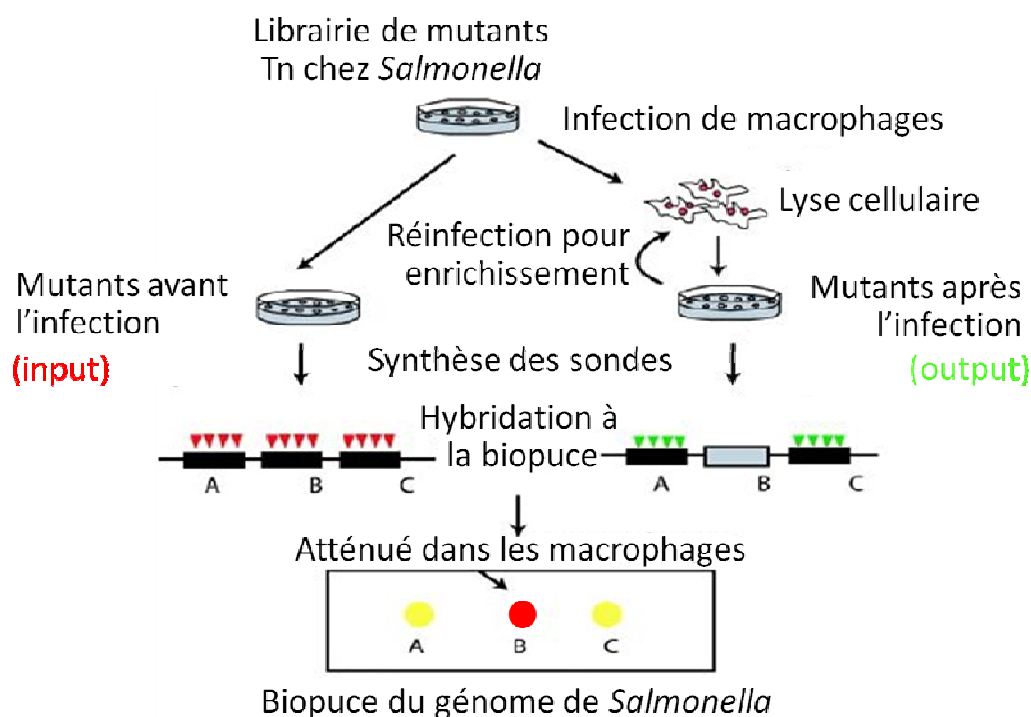


Figure 5. Représentation schématique de la technique TraSH. Adapté de [658].

La stratégie de sélection négative *Transposon Site Hybridization* (TraSH) crible les mutants par transposon d'une librairie couvrant les gènes non essentiels chez *Salmonella*. La librairie est soumise à la condition expérimentale testée (l'infection de macrophages en culture par exemple). Les mutants présents dans la librairie avant l'expérience (*input*) et ceux recueillis après (*output*) sont utilisés pour générer des transcrits uniques spécifiques à chaque mutant, obtenus par transcription *in vitro* à partir du promoteur T7 du transposon flanquant l'ADN génomique au site d'insertion. Les transcrits de l'input et de l'output seront marqués par des

fluorochromes différents et ces sondes seront hybridées simultanément à une biopuce comprenant les *Open Reading Frames* de la bactérie. L'analyse de la biopuce permettra d'identifier les gènes sélectionnés négativement par l'atténuation des mutants respectifs durant l'expérience. Tn, transposon

La représentation des mutants Tn d'une librairie était initialement vérifiée par l'usage de biopuces d'ORF. Il n'était alors pas possible de détecter les insertions de Tn au niveau des séquences intergéniques ou non codantes, ni au niveau des gènes de courte séquence non annotés en tant qu'ORF [601]. Pour contrer ce problème, la méthode *Transposon-Mediated Differential Hybridization* (TMDH) fut développée à partir de biopuces *tiling array* au contenu génétique très dense. Ces biopuces sont constituées d'oligonucléotides de 60 pb. En fait, les séquences de 60 pb sont prises au niveau des deux brins d'ADNg et sont espacées de seulement 100 pb au sein du génome [659]. Les Tn mis au point pour cette stratégie (Mu et Tn5) possèdent le promoteur pour la polymérase T7 positionné à une extrémité du Tn (comme pour TraSH), ainsi que le promoteur pour la polymérase SP6 situé à l'autre extrémité, chacun orienté vers l'extérieur du Tn vers l'ADNg adjacent. La représentation des transcrits de chaque mutant est mesurée par l'hybridation à la biopuce *tiling array*, qui indique la position de l'insertion du Tn avec plus de précision que les biopuces traditionnelles. Une collection de 10 000 mutants par Tn fut criblée, par groupes individuels comprenant de 400 à 500 mutants, dans un modèle d'infection murin [659]. Par contre, la représentation des mutants avant l'infection est comparée à celle des mutants recueillis suite à l'infection en hybridant les transcrits des deux groupes sur des biopuces *tiling array* séparées, contrairement aux stratégies de sélection initiales où les transcrits sont hybridés sur une même biopuce (Figure 5). Cependant, les Tn insérés à des positions très rapprochées ne peuvent pas être bien distingués, car les transcrits peuvent alors se lier au même oligonucléotide sur la biopuce. Cela peut causer un phénomène de compétition, qui est évité en réduisant la quantité de mutants par Tn criblés simultanément.

Une méthode de criblage permettant l'utilisation de bibliothèques de mutants très volumineuses fut élaborée à partir de la technologie de séquençage d'*Illumina* [660]. La stratégie *Transposon-Directed Insertion Site Sequencing* (TraDIS) emploie une amorce spécifique au Tn permettant de séquencer l'ADN adjacent au site d'insertion. Grâce à cette méthode, les 370 000 insertions d'une bibliothèque de mutants par Tn du sérovar Typhi furent cartographiées dans le génome bactérien, dont une insertion en moyenne à toutes les 13 pb. Cette collection fut criblée pour identifier les gènes participant à la croissance en conditions standards de laboratoire [660].

1.5.2.3.2 – Bibliothèques de mutants par délétions définies

Les bibliothèques volumineuses de mutants par Tn représentent un important outil pour étudier la génétique bactérienne. Par contre, dans certains environnements, des mutants de ces bibliothèques peuvent être exclus aléatoirement de la collection à cause d'un effet de goulot d'étranglement (*bottleneck effect*), c'est-à-dire une barrière biologique ne laissant passer qu'une quantité limitée de mutants dans les conditions à l'étude. Par exemple, dans le contexte d'infection d'un modèle animal avec une bibliothèque de mutants, la population bactérienne peut diminuer considérablement en nombre lors de son passage dans divers compartiments rencontrés *in vivo* (comme la survie au contact du pH acide de l'estomac, la traversée de l'intestin vers les organes systémiques ou même la circulation dans le système sanguin de l'hôte) [34,601,661,662]. Afin d'obtenir une bonne couverture génomique, les bibliothèques créées par insertion aléatoire du Tn doivent être très volumineuses. Une complexité de mutants d'insertion couvrant de 5 à 10 fois la quantité d'ORF du chromosome doit être atteinte pour générer, avec hautes probabilités, un mutant représentant chaque gène non essentiel chez la bactérie [601]. Lors de sélection négative de mutants avec des bibliothèques si volumineuses, une quantité significative de mutants peut être sous-représentée à cause du goulot biologique (et non dû à une atténuation au sein de l'environnement ou du procédé expérimental testé). Ainsi, l'usage de bibliothèques

moins volumineuses permet de limiter la perte aléatoire de mutants. Par contre, l'utilisation de bibliothèques de mutants par Tn moins volumineuses nécessite l'infection de plus d'animaux. De plus, la mutagenèse par Tn implique l'insertion aléatoire non contrôlée dans le génome, ainsi que la possibilité de générer des mutations polaires au niveau de gènes en aval de l'insertion.

Des bibliothèques obtenues par mutation définie de chaque gène non essentiel ont été construites chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [663] et la bactérie *E. coli* (collection KEIO) [664]. Au moment présent, une collection de cette sorte est en développement auprès du sérovar Typhimurium. Elle compte à présent un mutant pour chaque gène spécifique à *Salmonella*. Cette catégorie de gènes comprend la plupart des facteurs de virulence associés à ce pathogène [662]. Une technique nommée *Array-Based Analysis of Cistrons Under Selection* (ABACUS) fut créée par l'équipe de McClelland pour évaluer la représentation des mutants définis, à l'aide de la transcription à partir d'un promoteur T7 et de l'hybridation des transcrits à des biopuces d'oligonucléotides [662]. Cette bibliothèque de mutants définis fut générée par mutagenèse dirigée à l'aide de la technique de recombinaison *lambda red* de Datsenko et Wanner [665]. Les plasmides utilisés pour remplacer le gène ciblé par une cassette de résistance à un antibiotique furent modifiés par l'ajout d'un promoteur de la polymérase T7 dirigé vers l'ADNg. Des transcrits uniques peuvent donc être synthétisés afin d'évaluer la représentation de chaque mutant. Les traits importants des plasmides originaux furent conservés, dont la présence d'un codon d'arrêt et de sites de liaison pour ribosomes (*Ribosome Binding Site* ou RBS) minimisant la création de mutations polaires. Ils contiennent aussi des « sites de reconnaissance pour la flippase » (*Flippase Recognition Target* ou FRT) de part et d'autre de la cassette de résistance à l'antibiotique qui permettent l'excision de la cassette et la génération de mutants sans marqueurs [665]. Chez la bibliothèque du groupe de McClelland, environ 1000 gènes spécifiques à *Salmonella* et absents chez *E. coli* et d'autres bactéries apparentées furent délétés par cette technique de mutagenèse. Une bibliothèque renfermant tous ces mutants fut passée dans un modèle murin d'infection pour

évaluer la viabilité de chacun dans cet hôte. La représentation des mutants suivant l'infection fut vérifiée par hybridation à des biopuces fabriquées au laboratoire dans le cadre de cette étude [662].

1.6 – Problématique, Hypothèse et Objectifs

La fièvre typhoïde représente un véritable problème de santé publique dans plusieurs secteurs du globe. La situation se complexifie davantage avec l'apparition d'isolats multirésistants aux antibiotiques, en plus du besoin criant d'un vaccin plus efficace et facilement administrable dans les régions endémiques. Une meilleure connaissance des gènes de *S. Typhi* importants pour l'infection de l'être humain devrait révéler des composantes bactériennes à cibler pour le développement de nouvelles molécules antimicrobiennes et souches vaccinales atténuées.

La propagation systémique de *Salmonella* demande qu'elle soit adaptée pour survivre et se multiplier au sein des macrophages, tel que démontré *in vivo* auprès de l'hôte [368,382]. Par contre, l'étude de la virulence de *S. Typhi* est limitée par l'absence d'un modèle animal adéquat dont l'inoculation avec ce sérovar reproduit le syndrome systémique observé chez l'humain. Tel que discuté, *S. Typhi* est incapable de rendre la souris normale malade et les modèles murins humanisés, difficiles à produire, demeurent en cours d'optimisation. C'est pourquoi les chercheurs se sont tournés vers *S. Typhimurium* pour infecter la souris, chez laquelle se développe une infection systémique imitant la typhoïde humaine. Nos connaissances à propos des gènes de *Salmonella* requis pour la virulence chez l'hôte proviennent donc principalement de cette approche. *S. Typhimurium* cause une infection inflammatoire localisée chez l'être humain et ne se propage pas davantage dans l'organisme, contrairement à *S. Typhi* qui évite la réaction inflammatoire et cause une infection systémique chez l'hôte humain. De plus, *S. Typhimurium* est bien mieux adapté que *S. Typhi* dans les macrophages murins, mais à l'opposé, sa croissance chute par rapport à *S. Typhi* au sein des

macrophages humains [666]. En outre, malgré une grande ressemblance d'un point de vue génomique (90% de matériel génétique en commun parmi les deux sérovars), environ 480 gènes sont uniques chez *S. Typhimurium* et 600 chez *S. Typhi* [36,37]. C'est pour l'ensemble de ces raisons que nous avons choisi d'étudier la pathogénèse du sérovar Typhi en utilisant un modèle de culture cellulaire. Étant donné que l'infection systémique de l'être humain par *S. Typhi* menant à la fièvre typhoïde repose sur sa capacité à persister dans les macrophages [382], un modèle d'infection de macrophages humains a été choisi.

Malgré de nombreuses études et analyses à propos de la persistance de *Salmonella* au sein de macrophages infectés, les mécanismes moléculaires mis en place par la bactérie pour y parvenir sont encore mal compris. Cela dit, l'hypothèse de recherche émise dans le cadre de nos travaux stipule que plusieurs gènes de *Salmonella* participant à l'infection de macrophages restent à identifier et permettront de mieux percevoir son adaptation dans cette niche intracellulaire. Pour répondre à cette hypothèse, un objectif précis a été établi dans le cadre de notre projet, celui d'identifier et de caractériser de nouveaux gènes chez *Salmonella* impliqués dans l'interaction avec les macrophages. Le criblage à haut débit d'une librairie de mutants d'insertion par Tn du sérovar Typhi auprès de macrophages humains a mené à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans l'interaction. Grâce à la création de mutants de délétions définies, ces gènes ont ensuite été caractérisés au sein de différents essais d'infection.

CHAPITRE 2 – Matériel et Méthodes

2.1 – Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont répertoriés dans le Tableau IV. Pour l'obtention de colonies de culture pure, les souches furent striées sur géloses *Lysogeny Broth* (qu'on nomme également *Luria Bertani*; LB) à partir d'échantillons préalablement congelés à -80°C en LB liquide additionné de 20% de glycérol. Des colonies furent prélevées de ces milieux solides pour l'inoculation de bouillons LB. Ces bouillons furent généralement incubés à 37°C sans agitation (faible aération) pendant toute la nuit pour générer des cultures liquides des souches, sauf si mentionné autrement. Lorsque requis pour le cadre de l'expérience, les antibiotiques et suppléments furent ajoutés aux milieux à des concentrations de 50 µg/mL pour l'ampicilline (Ap), la kanamycine (Km), l'acide nalidixique (Nal) et l'acide diaminopimélique (DAP), de 34 µg/mL pour le chloramphénicol (Cm), et de 50 µM pour l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG).

Souche/Plasmide	Caractéristiques	Référence/Source
<i>S. Typhi</i>		
ISP1820	<i>S. Typhi</i> souche sauvage	[235]
DEF566	ISP1820 Nal ^r	[431]
DEF435	ISP1820 Δ <i>fliC</i>	Cette étude
DEF496	ISP1820 Δ <i>pgtE</i>	Cette étude
DEF510	ISP1820 Δ <i>csg</i>	Cette étude
DEF511	ISP1820 Δ <i>pagC</i>	Cette étude

DEF512	ISP1820 Δ <i>typA</i>	Cette étude
DEF534	ISP1820 Δ <i>mlc</i>	Cette étude
DEF535	ISP1820 Δ STY1358-67	Cette étude
DEF541	ISP1820 Δ <i>exbDB</i>	Cette étude
DEF544	ISP1820 Δ <i>waaQGP</i>	Cette étude
DEF546	ISP1820 Δ CS54	Cette étude
DEF547	ISP1820 Δ STY1867-68	Cette étude
DEF548	ISP1820 Δ STY1869	Cette étude
DEF555	ISP1820 Δ <i>acrA</i>	Cette étude
DEF556	ISP1820 Δ STY1398	Cette étude
DEF557	ISP1820 Δ <i>ompN</i>	Cette étude
DEF560	ISP1820 Δ <i>rfbIC</i>	Cette étude
DEF561	ISP1820 Δ <i>sipF</i>	Cette étude
DEF562	ISP1820 Δ STY0041	Cette étude
DEF563	ISP1820 Δ <i>bcf</i>	Cette étude
DEF564	ISP1820 Δ <i>stb</i>	Cette étude
DEF571	ISP1820 Δ <i>flhCD</i>	Cette étude
DEF601	ISP1820 Δ <i>gppA</i>	Cette étude
DEF602	ISP1820 Δ <i>stc</i>	Cette étude
DEF625	ISP1820 Δ STY0016	Cette étude
DEF627	ISP1820 Δ STY2346	Cette étude
DEF628	ISP1820 Δ SP1-4	Cette étude
DEF632	DEF555 (pWSK <i>acrA</i>)	Cette étude

DEF646	DEF435 (pWSK <i>fliC</i>)	Cette étude
DEF656	ISP1820 Δ STY4679	Cette étude
DEF662	ISP1820 Δ STY4842-43	Cette étude
DEF766	DEF571 (pWSK <i>flhCD</i>)	Cette étude
DEF767	DEF544 (pWSK <i>waqQGP</i>)	Cette étude
DEF768	DEF556 (pWSKSTY1398)	Cette étude
DEF769	DEF548 (pWSKSTY1869)	Cette étude
DEF770	DEF627 (pWSKSTY2346)	Cette étude

E. coli

MGN-617	SM10 λ pir <i>asd thi thr leu tonA lacY supE</i> [667] <i>recA RP4 2-Tc::Mu[λpir] ΔasdA4</i>
---------	--

Plasmides

pLOFKm	Plasmide pour le transfert du mini-Tn10- Km avec transposase IS10 _R inductible à l'IPTG et activée par le promoteur <i>ptac</i> , <i>lacI^q mobRP4 oriR6K; Km^r Ap^r</i> [668]
pLOFKm-T7 (pSIF117)	pLOFKm avec promoteur de l'ARN polymérase T7 inséré en position <i>NotI</i> dans la région 3' du mini-Tn10-Km, générant le mini-Tn10-T7 Cette étude
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K; Cm^r Ap^r</i> R. Curtiss III, ASU

pWSK29	Vecteur de clonage à faible nombre de copies, pSC101; Ap ^r	[669]
pWSKacrA	pWSK29 portant <i>acrA</i>	Cette étude
pWSKfliC	pWSK29 portant <i>fliC</i>	Cette étude
pSIF113	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>fliC</i> utilisé pour délétion de <i>fliC</i>	Cette étude
pSIF133	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>pgtE</i> utilisé pour délétion de <i>pgtE</i>	Cette étude
pSIF143	pMEG-375 avec régions flanquantes de l'opéron <i>csg</i> utilisé pour délétion de l'opéron <i>csg</i>	Cette étude
pSIF144	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>pagC</i> utilisé pour délétion de <i>pagC</i>	Cette étude
pSIF145	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>typA</i> utilisé pour délétion de <i>typA</i>	Cette étude
pSIF156	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>mlc</i> utilisé pour délétion de <i>mlc</i>	Cette étude
pSIF157	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>exbDB</i> utilisé pour délétion de <i>exbDB</i>	Cette étude
pSIF159	pMEG-375 avec régions flanquantes de STY1358-67 utilisé pour délétion de STY1358-67	Cette étude
pSIF160	pMEG-375 avec régions flanquantes de	Cette étude

	<i>waaQGP</i> utilisé pour délétion de <i>waaQGP</i>	
pSIF162	pMEG-375 avec régions flanquantes de STY1869 utilisé pour délétion de STY1869	Cette étude
pSIF163	pMEG-375 avec régions flanquantes de STY1867-68 utilisé pour délétion de STY1867-68	Cette étude
pSIF164	pMEG-375 avec régions flanquantes de CS54 utilisé pour délétion de CS54	Cette étude
pSIF165	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>acrA</i> utilisé pour délétion de <i>acrA</i>	Cette étude
pSIF166	pMEG-375 avec régions flanquantes de STY1398 utilisé pour délétion de STY1398	Cette étude
pSIF167	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>ompN</i> utilisé pour délétion de <i>ompN</i>	Cette étude
pSIF171	pMEG-375 avec régions flanquantes de STY0041 utilisé pour délétion de STY0041	Cette étude
pSIF173	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>sipF</i> utilisé pour délétion de <i>sipF</i>	Cette étude
pSIF174	pMEG-375 avec régions flanquantes de	Cette étude

	<i>rfbIC</i> utilisé pour délétion de <i>rfbIC</i>	
pSIF175	pMEG-375 avec régions flanquantes de l'opéron <i>bcf</i> utilisé pour délétion de l'opéron <i>bcf</i>	Cette étude
pSIF176	pMEG-375 avec régions flanquantes de l'opéron <i>stb</i> utilisé pour délétion de l'opéron <i>stb</i>	Cette étude
pSIF184	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>flhCD</i> utilisé pour délétion de <i>flhCD</i>	Cette étude
pSIF198	pMEG-375 avec régions flanquantes de l'opéron <i>stc</i> utilisé pour délétion de l'opéron <i>stc</i>	Cette étude
pSIF204	pMEG-375 avec régions flanquantes de <i>gppA</i> utilisé pour délétion de <i>gppA</i>	Cette étude
pSIF212	pMEG-375 avec régions flanquantes de SPI-4 utilisé pour délétion de SPI-4	Cette étude
pSIF213	pMEG-375 avec régions flanquantes de STY4842-43 utilisé pour délétion de STY4842-43	Cette étude
pSIF214	pMEG-375 avec régions flanquantes de STY2346 utilisé pour délétion de STY2346	Cette étude
pSIF215	pMEG-375 avec régions flanquantes de	Cette étude

	STY0016 utilisé pour délétion de STY0016	
pSIF217	pMEG-375 avec régions flanquantes de STY4679 utilisé pour délétion de STY4679	Cette étude
pSIF285	pWSK29 portant <i>flhCD</i>	Cette étude
pSIF286	pWSK29 portant <i>waaQGP</i>	Cette étude
pSIF287	pWSK29 portant STY1398	Cette étude
pSIF288	pWSK29 portant STY1869	Cette étude
pSIF289	pWSK29 portant STY2346	Cette étude

Tableau IV. Souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude. Adapté de [670].

Les auxotrophies chez les mutants de délétions définies furent détectées par croissance en milieu minimal M63-glucose liquide supplémenté de tryptophane à 40 mg/L, de cystéine à 40 mg/L et de glucose à 0.6% (m/v) pendant toute la nuit, et en comparant leurs densités optiques à 600 nm (DO₆₀₀) à celle de la souche sauvage. Afin d'évaluer la résistance des souches face au désoxycholate de sodium (DOC), un détergent, le milieu liquide RPMI 1640 (*Wisent*) pour culture cellulaire modifié avec du DOC à 0.1% (m/v) futensemencé avec chacun des mutants à tester et ces cultures furent placées sous agitation à 37°C pendant toute la nuit. Le lendemain, les DO₆₀₀ des cultures furent comparées à celle d'une culture de la souche sauvage pour déterminer la capacité de croissance des mutants en présence du détergent. Pour analyser plus précisément la survie du mutant Δ *acrA* en présence de DOC par rapport à celle de la souche sauvage, 5 x 10⁶ Unités Formatrices de Colonies (UFC) provenant de bouillons de culture obtenus sans

agitation à 37°C furent ajoutées à 1 mL de DOC à 0.1% dans du tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline* ou PBS). Ces échantillons inoculés furent transférés sur glace et les bactéries viables de chaque souche furent quantifiées en terme d'UFC obtenues sur géloses LB à 0 et après 2 heures (h) suivant l'inoculation.

Le transfert d'ADN plasmidique par transformation fut réalisé soit par électroporation avec un appareil *Bio-Rad* [671] ou par méthode classique de choc thermique en milieu riche en calcium et manganèse [672].

2.2 – Stratégie de sélection négative

2.2.1 – Mutagenèse par transposon pour générer la librairie de mutants

Le mini-Tn10-Km fut utilisé comme Tn pour la mutagenèse aléatoire du génome de *S. Typhi* dans le but de créer la librairie de mutants. Ce Tn est porté par le plasmide suicide pLOFKm [668] qui est transférable par conjugaison et qui fut obtenu de Kenneth E. Sanderson de l'Université de Calgary. Le mini-Tn10-Km comprend une cassette de résistance à la kanamycine (Km^r) délimitée de part et d'autre par des séquences répétées inversées IS10. Le vecteur compte également une transposase inductible à l'IPTG, dont la séquence codante est localisée à l'extérieur du Tn. Une approche par PCR fut appliquée pour insérer extrinsèquement la séquence promotrice de l'ARN polymérase T7 à l'extrémité 3' du Tn. La cassette Km^r fut d'abord amplifiée à l'aide d'une amorce comprenant la séquence du promoteur T7, de manière à l'incorporer à l'extrémité 3' du Tn lors de la réaction PCR (amorces Front NotI-Kan et Rear NotI-Kan, la séquence de la deuxième comprend le promoteur spécifique à la polymérase T7; Tableau V). Ce produit PCR fut ensuite digéré aux deux extrémités par l'enzyme de restriction *NotI* et ligué au sein du plasmide pLOFKm, lui-même également digéré au site *NotI*. Ainsi, le nouveau vecteur pLOFKm-T7 (pSIF117) portant le Tn modifié

mini-Tn10-T7 fut transformé par choc thermique chez la souche MGN-617 d'*E. coli* [667]. Cette souche donneuse fut utilisée pour transférer le pLOFKm-T7 par conjugaison à la souche sauvage ISP1820 de *S. Typhi* [235], tel que décrit précédemment [480] avec de l'IPTG en supplément dans les géloses de conjugaison. Les transformants générés par insertion du Tn furent sélectionnés par inoculation sur géloses Km. Une proportion des transformants fut comptée pour estimer la quantité totale sur chaque gélose et ces chiffres furent utilisés pour déterminer approximativement le nombre de mutants d'insertion de la librairie créée. Par la suite, un mL de LB fut déposé sur chaque gélose pour y gratter et prélever les transformants. Les transformants récupérés par récolte du LB furent combinés, centrifugés et resuspendus dans un volume final 5 mL de LB avec Km et 20% de glycérol. Des aliquots de 100 µL de ce volume furent congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

Amorce	Séquence (5'-3') ^a
Front NotI-Kan	AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCG
Rear NotI-Kan	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACTCTGATGTTACATTGCACAAG
pLOF F seq	CAAGACGTTTCCCGTTGAAT
STY:PCRNiche#2	CTTGTGCAATGTAACATCAGAG
CCT ₂₄ VN	CCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
STY0016 F1	CGGGATCCGTGATATCGCCATTATCGCG
STY0016 R2	TGAGGGCTTCGCCTTCAAGCGCAATAATT
STY0016 F3	TTGAAGGCGAAGCCCTCAATTGCAGTCAG
STY0016 R4	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATATCAGGCTCATCCGTGAG
STY0041 F1	CGGGATCCACCTCATGGAGTTGAGCATG
STY0041 R2	GGTCGCCGTAGTCGCCAT ATCCGAAGCTA

STY0041 F3 ATGGCGACTACGGCGACCGTATGAATTAC

STY0041 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCACAAACCAATGCACAGCGAC

STY1358-67 F1 CGGGATCCGTGTACACATTGCTTGCCGA

STY1358-67 R2 TTCGATGATGAATACTGCCGGATGTAGAGAG

STY1358-67 F3 CGGCAGTATTCTCATCGAAGCATGGACT

STY1358-67 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCCATGTTAACGCTGGCGATG

STY1398 F1 CGGGATCCGATGAATTGTACGCGGCAGA

STY1398 R2 TGCCAGCGGCTCAATCCAGCCATCCAGTT

STY1398 F3 TGGATTGAGCCGCTGGCATCATTTTCAGT

STY1398 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCATGTTAGTGTACCACGAG

STY1398 compl R CCGCTCGAGGCATGTTAGTGTACCACGAG

STY1649 F1 CGGGATCCAGGATGCCTTTGATTCAACG (*ompN*)

STY1649 R2 CGTCGTCATTCCCGTAAAGGTCCAGTTTG (*ompN*)

STY1649 F3 TTACGGGAATGACGACGACCCGTTCTAT (*ompN*)

STY1649 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCTGTCGGGAGATAAGCAAACC (*ompN*)

STY1867-68 F1 GCTCTAGACCATCAGGTACGACATCAAC

STY1867-68 R2 GAGAAAAGTCCGTATATAAGCCAATCCCT

STY1867-68 F3 TATATACGGACTTTTCTCGCCTTACCGCT

STY1867-68 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCAATGGTGAAACAACGCCGCT

STY1869 F1 CGGGATCCCTCTCGACATTCTGCCTGTT

STY1869 R2 AACCAGATCATAGCGAGATAGCCAGATGG

STY1869 F3 TCTCGCTATGATCTGGTTAGTATGCAGGAC

STY1869 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCATTCCAGCGCTATCGGTTTC

STY1869 compl R CCGCTCGAGATTCCAGCGCTATCGGTTTC

STY2346 F1 CGGGATCCTTCTCACGTTTACCCTGTG

STY2346 R2 ATCAACAACCAGCACGGTAAAGCAGTTGA
 STY2346 F3 ACCGTGCTGGTTGTTGATCCTAACGTGGC
 STY2346 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCACGCAGATCCTTCAGACGAT
 STY2346 compl R CCGCTCGAGACGCAGATCCTTCAGACGAT
 STY2378-81 F1 GCTCTAGATGTTGACTGCCTTCACTACC (*stc*)
 STY2378-81 R2 GCTGAAATTAAGCGACTGCGCTGATCTAT (*stc*)
 STY2378-81 F3 CAGTCGCTTAATTTAGCGGTGTTCTGAC (*stc*)
 STY2378-81 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCAGATAACTTCCTGTCTATG (*stc*)
 STY3641 F1 CGGGATCCGTAATCGTCGTCGTTCAAGT (*gppA*)
 STY3641 R2 AACGTCAGATCAATGGCGGCATACAACGA (*gppA*)
 STY3641 F3 CGCCATTGATCTGACGTTAACCTTGCCTG (*gppA*)
 STY3641 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCAGCAAAGTCACCTGGCTAAT (*gppA*)
 STY4452-60 F1 GCTCTAGACTATAAAGCGTATTGGTAGC (SPI-4)
 STY4452-60 R2 TGATCAACGTCAACAAAAGTAGGCCACGG (SPI-4)
 STY4452-60 F3 TTTTGTGACGTTGATCATGGTGACGCAT (SPI-4)
 STY4452-60 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTGCCGACTCGTTAAATGAC (SPI-4)
 STY4679 F1 CGGGATCCACGAATGATTGCCACACAG
 STY4679 R2 TGACCCAACCTTGAGGGCTTGATGGTAAG
 STY4679 F3 AGCCCTCAAGTTGGGTCAATCGTTCCTAT
 STY4679 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCCACAGACTTCGGTTTTGGT
 STY4842-43 F1 CGGGATCCACTCGAGTGACTCTGATGAA
 STY4842-43 R2 GACCCACAACCTCATTACGATATGGTCA
 STY4842-43 F3 TAATGAGGTTGTGGGTCGGAAGCTGGATA
 STY4842-43 R4 AAGGAAAAAAGCGGCCGCAGCCGGAATATTCCGGTCAT
 acrA F1 CGGGATCCACGCAGCAATGGGTTTAAGG

88

acrA R2 *CCACTTATCTTGCTGGTCCTGTTTGCCTG*

acrA F3 *GACCAGCAAGATAAGTGGCTGGTACTGA*

acrA R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCAAGTTAAGACCTGGGCTGAG*

bcf F1 *CGGGATCCACTCACGACGTTGAGTAGCT*

bcf R2 *ACGTCATTCTGACGGTTGTAGTATCCGCT*

bcf F3 *CAACCGTCAGAATGACG TGGGAACCTTAG*

bcf R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCTGCTACGCGGTTTCAGTCATA*

CS54 F1 *GCTCTAGACCTGCTGATTTAGAATTTGATCC*

CS54 R2 *GAGTCACGCGCAGGCTGCGTGAAATTAGA*

CS54 F3 *GCAGCCTGCGCGTGACTCGCTTTTACTTG*

CS54 R4 *CCCGGGGAGAACCCGTATGCGAACAA*

csg F *CGGGATCCTGGGGCTAATCTTTGGCTAT*

csg R over *AACTCAATCTATGAAGTACAGGCAGGCGT*

csg F over *TACTTCATAGATTGAGTTGTCTCGTCTTA*

csg R *AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCCTATGGCAGGGATATTTT*

exbD/B F1 *CGGGATCCTGATGCAGACGGATCTTTCC*

exbD/B R2 *ACTCTACGGTTAAGCGGCGCTTTTGCCT*

exbD/B F3 *GCCGCTTAACCGTAGAGTATGAAACCCTG*

exbD/B R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCGGGAACATTTAGGCTAACGC*

flhC/D F1 *CGGGATCCCTATGACAGGATGCGCAGTC*

flhC/D R2 *CAGCGTTTGTGCGTGTAGTTTATGCCAG*

flhC/D F3 *TACACGCAACAAACGCTGTGCAAGGAGTA*

flhC/D R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCTGGGAAGCTGCGTTATACGT*

fliC F *CGGGATCCAAGCCATGCCTTCTTCTTT*

fliC R-over *AGAGGACGTACAGCGACAGGCTGTTTGT*

fliC F-over	<i>TGTCGCTGTACGTCCTCTCTTTACTGCGTTA</i>
fliC R	<i>GCTCTAGAGGGAAAGAGGAACAGGTATGA</i>
LPS compl F	<i>CGGGATCCCCCAGACAATGGGAATGACC</i>
LPS compl R	<i>CCGCTCGAGCCCCAATGATAAGAGTTACCT</i>
mlc F1	<i>CGGGATCCGCCTGGGCATATCGATCAAA</i>
mlc R2	<i>CAGAAATGCGTTTGCTGCTAAGATCGCGCA</i>
mlc F3	<i>AGCAGCAAACGCATTCTGGCTATCATGGT</i>
mlc R4	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCCTCCACCGTTATGCTTCGAA</i>
pagC F	<i>CGGGATCCCATTTAGTAACCGTTACCT</i>
pagC R over	<i>CACCCGCGCAATCCTGAACCTTACTTTGTG</i>
pagC F over	<i>TTCAGGATTGCGCGGGTGTACAGATGAAT</i>
pagC R	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCATCACCTACCTGAGCAACCT</i>
pgtE F	<i>CGGGATCCATTATGATTATAGATTGCTTATT</i>
pgtE R over	<i>ATAATATCCGGTGTGCGGTATCATAAACCA</i>
pgtE F over	<i>ACCGACACCGGATATTATATTACCAGTAATGC</i>
pgtE R	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCCACAAAGAGTATATGGAAAG</i>
rfbI/C F1	<i>CGGGATCCCCAGGATGACCGCTTTCATA</i>
rfbI/C R2	<i>TTGGCGATGTGTCCATCATGCTGTGATGG</i>
rfbI/C F3	<i>TGATGGACACATCGCCAAAACTTTAGGC</i>
rfbI/C R4	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCATAAACTGGCCGGGCCAT</i>
sipF F1	<i>CGGGATCCCCTTATCGGAGACGGTAGCT</i>
sipF R2	<i>GAGCGAGAGCATCAACGGCAATACAGGAG</i>
sipF F3	<i>CCGTTGATGCTCTCGCTCGACAACAATTG</i>
sipF R4	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCCAGCAGTTCCTTCGGATCAT</i>
stb F1	<i>CGGGATCCTGCTGAATTCTGGCCTGTCT</i>

stb R2	<i>GTTATTGCCCGCCGAAAACAGCACTTGAT</i>
stb F3	<i>TTTTCGGCGGGCAATAACACGACGGGTTT</i>
stb R4	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCCAGGAGGGTATAGCTCACAT</i>
STY LPS F1	<i>CGGGATCCATCAGCACGCTGAAGCAGAA (waaQGP)</i>
STY LPS R2	<i>AACACGCTTACGATTACCGAAATCTTGCG (waaQGP)</i>
STY LPS F3	<i>GGTAATCGTAAGCGTGTGCGACTATGGT (waaQGP)</i>
STY LPS R4	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCATCTTTGTCACGCCAGCGAA (waaQGP)</i>
typA F	<i>CGGGATCCCAAAGAGACTCTGCAATACT</i>
typA R over	<i>TCAGTTTCTCAACGATGTTGATACGATAA</i>
typA F over	<i>ACATCGTTGAGAACTGACCAACATGCGT</i>
typA R	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCTCATTGGTCGGCATAATACG</i>

^aLes sites d'enzymes de restriction sont soulignés. Les nucléotides aux positions 1 à 9 (en italiques) chez une amorce intitulée « R2 » ou « R over » sont inversement complémentaires aux nucléotides aux positions 10 à 18 de l'amorce « F3 » ou « F over », respectivement, et vice versa. Les caractères en gras représentent la séquence promotrice de l'ARN polymérase T7. Le nom du gène correspondant est entre parenthèses suivant la séquence, lorsque nécessaire.

Tableau V. Amorces utilisées dans cette étude. Adapté de [670].

2.2.2 – Sélection compétitive des mutants de la librairie dans les macrophages

La lignée cellulaire immortalisée de monocytes humains *THP-1* (ATCC[®] TIB-202[™]) fut mise en culture en milieu RPMI 1640 supplémenté de sérum de veau fœtal (*Wisent*) à 10% (v/v) préalablement inactivé à la chaleur, d'HEPES (*Wisent*) à 25 mM, de L-glutamine (*Wisent*) à 2 mM, de sodium pyruvate (*Wisent*) à 1 mM et d'acides aminés non essentiels de milieu *Eagle* modifié (ou *modified Eagle's medium nonessential amino acids*; *Wisent*) à 1%. Une culture mère de ces cellules sous forme de monocytes non adhérents fut maintenue à 37°C au sein

d'une atmosphère de 5% (v/v) de CO₂. Pour le criblage de mutants de la librairie, 10⁷ cellules monocytaires furent cultivées en boîte de Petri 100 x 20 mm (*Sarstedt*) et différenciées en macrophages adhérents pendant 48 h par l'ajout de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) à 10⁻⁷ M au moment de la mise en culture. Avant l'inoculation de la librairie, le surnageant fut changé pour du milieu de culture frais préchauffé à 37°C. La librairie de mutants, considérée comme l'*input* (Figure 5), fut mise en culture dans 20 mL de LB avec Km à 37°C sans agitation pendant la nuit. Cette dernière fut employée pour infecter deux cultures séparées de macrophages pour la génération de deux échantillons indépendants d'*output* (Figure 5). L'inoculation bactérienne fut réalisée en respectant une multiplicité d'infection (*multiplicity of infection* ou MOI) de 10 : 1 (bactéries : cellule). Suite à l'ajout de bactéries, les cultures cellulaires furent incubées pendant 30 minutes (min) à 37°C afin de permettre l'internalisation des mutants au sein de ces macrophages. Lors de cette première période d'interaction avec les macrophages, certaines bactéries se retrouvent associées aux cellules (adhérence) et d'autres sont internalisées au sein du compartiment intracellulaire (entrée). Ensuite, les cellules furent soumises à 3 lavages au PBS (pH 7.4) et du milieu de culture préchauffé à 37°C contenant de la gentamycine (*Wisent*) à 100 µg/mL fut ajouté aux cellules afin d'éliminer les bactéries extracellulaires (0 h). Après 2 h d'incubation à 37°C avec cette haute concentration d'antibiotique (qui permet d'éliminer plus de 95% des bactéries extracellulaires [673]), les cellules furent à nouveau lavées 3 fois avec du PBS préchauffé et du milieu de culture avec gentamycine cette fois à 12 µg/mL fut ajoutée aux cellules. Lors d'une période d'incubation prolongée, il arrive qu'une faible dose de gentamycine pénètre à l'intérieur des cellules et une diminution de la concentration d'antibiotique (passée de 100 à 12 µg/mL au temps 2 h ici) dans le milieu évite ce problème tout en permettant la génération de résultats de répllication intracellulaire reproductibles [674,675]. Les cellules furent remises à 37°C et incubées 22 h supplémentaires avec cette concentration d'antibiotique plus faible. Au terme de cette incubation marquant la fin de 24 h d'infection, les cellules furent lavées encore 3 fois avec du PBS et finalement

lysées au contact de 10 ml de DOC à 0.1% (m/v) dans du PBS. Ce lysat cellulaire fut centrifugé et le culot contenant les bactéries fut resuspendu dans 20 mL de LB avec Km et placé à 37°C sans agitation pendant la nuit, en vue du prochain passage en série de la librairie au sein des macrophages (Figure 5).

En outre, deux passages supplémentaires furent effectués de la manière décrite plus haut, totalisant trois passages en série complets de la librairie chez les macrophages humains *THP-1*. À la fin du troisième passage, les bactéries récoltées de chacun des deux Petri de macrophages infectés furent cultivées séparément dans 20 mL de LB avec Km à 37°C avec agitation pendant la nuit et permirent de générer deux échantillons d'*output*.

2.2.3 – Synthèse des sondes d'ADNc marqué

Les bactéries des échantillons *output* et *input* initial furent utilisées pour générer les sondes qui seront ultérieurement hybridées aux biopuces. Pour ce faire, l'ADNg des bactéries des *output* et de l'*input* fut isolé par la méthode d'extraction classique au phénol/chloroforme, suivi de précipitation à l'éthanol [676]. De chaque échantillon, 4 µg d'ADNg furent fractionnés par ultrasons en appliquant 5 pulsions de 2 secondes (sec) chaque, à l'aide d'un sonicateur *Vibra-cell VC600* (*Sonics & Materials Inc.*). L'ADNg soniqué fut ensuite polyadénylé (ou *poly(A)-tailed*) aux extrémités des fragments avec une transférase terminale (*terminal transférase* ou *TdT*; *New England Biolabs*) et purifié tel que décrit antérieurement [662]. L'ADNg soniqué, polyadénylé et purifié provenant des échantillons *input* et *output* fut employé comme matrice au sein de réactions de PCR nichés (*nested PCR*), tel que décrit précédemment [662] et avec quelques modifications expliquées ci-après. Ces PCR permettent d'amplifier spécifiquement les régions des fragments englobant l'extrémité 3' du Tn qui comprend la séquence promotrice T7 ainsi que l'ADNg de *S. Typhi* adjacent à ce promoteur. Pour ce faire, 50 ng de fragments polyadénylés et purifiés furent soumis à une première ronde de PCR niché au sein d'un volume total de 25 µL. Cette réaction combine du tampon pour PCR (*PCR buffer*) 1x, des dNTP à 0.2 mM, du MgCl₂ à 2.5 mM,

les amorces pLOF F seq et CCT₂₄VN à 0.2 µM chacune (cette dernière amorce s'hybride à l'extrémité poly(A)) et 1.25 unité de Taq polymérase (*Feldan*). Cette réaction de PCR fut réalisée en appliquant une dénaturation initiale (*hot start*) à 94°C pendant 1 min, suivie par 30 cycles comprenant i) une dénaturation à 94°C pendant 30 sec, ii) une hybridation à 50°C pendant 30 sec et iii) une élongation à 72°C pendant 30 sec. Finalement, une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 3 min conclut cette ronde de PCR. La seconde ronde de PCR niché fut effectuée cette fois dans un volume total de 50 µL. Celle-ci inclut 1 µL de la réaction précédente, l'amorce STY : PCRNiche#2 (plus interne par rapport à pLOF seq) et l'amorce CCT₂₄VN utilisée initialement.

Par la suite, ce produit de PCR niché fut l'objet d'une réaction de transcription *in vitro*, à l'aide du *MEGAscript T7 High yield transcription kit* (*Ambion*). Lors de celle-ci, 5 µL de produit du PCR niché furent intégrés en tant que matrice à une réaction de 20 µL et en appliquant le protocole du manufacturier, avec certaines modifications décrites ci-après. Brièvement, la réaction de transcription fut effectuée à 37°C pendant 2 h et l'ARN synthétisé fut soumis à un traitement par DNase (*Ambion*) pour une durée de 30 min à 37°C. Cet ARN traité à la DNase fut purifié à l'aide du *RNeasy Mini kit* (*Qiagen*) en éluant le produit dans de l'eau exempte de RNase. L'ARN purifié fut employé pour générer de l'ADNc marqué constituant la sonde pour l'hybridation aux biopuces, à la manière décrite précédemment [677], à quelques exceptions près. Pour cette réaction utilisant la reverse transcriptase *SuperScriptII* (*Invitrogen*), 4.8 µg d'ARN furent combinés à 4 µg d'hexamères aléatoires (ou *random hexamers*) (*Sigma*), en incorporant à la fois des fluorochromes : le Cy5-dCTP (*Amersham Biosciences*) pour l'*input* (condition contrôle) et le Cy3-dCTP (*Amersham Biosciences*) pour l'*output* (condition expérimentale). L'ADNc de premier brin (ou *first-strand*) fut purifié sur colonne par l'entremise du *QIAquick PCR purification kit* (*Qiagen*), en éluant l'ADNc dans de l'eau pure sans RNase.

2.2.4 – Hybridation des sondes aux biopuces

L'hybridation aux biopuces comprenant >98% des ORF de la souche CT18 de *S. Typhi* fut réalisée en suivant les procédures décrites par [626,677]. Suite à l'hybridation, les signaux des biopuces furent numérisés par l'usage d'un appareil de lecture au laser *GenePix 4000B (Molecular Devices)* réglé à une résolution de 5 µm. Le programme informatique *GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments)* fut utilisé pour quantifier les intensités de signaux détectées chez les biopuces hybridées. La soustraction du bruit de fond (*background subtraction*) fut effectuée avec *GenePix Pro*, en appliquant la procédure par défaut *local median intensity* fournie par le programme. Les résultats furent normalisés et analysés en employant le programme *WebArrayDB* [678] disponible en ligne (www.webarraydb.org). Les gènes d'une intensité de signal plus élevée que le bruit de fond moyen par deux écarts-types furent considérés comme des gènes détectés au sein de la biopuce [677]. Les données à propos de la plateforme appliquée pour l'analyse des biopuces et celles concernant les sondes hybridées ont toutes été déposées en ligne sur *WebArrayDB* (MPMDB ID 144) conformément aux standards *Minimum Information About a Microarray Experiment* (MIAME).

2.3 – Création de mutants individuels de délétions définies et complémentation de mutants

La délétion de gènes pour la création de mutants individuels fut réalisée par échange allélique tel que décrit précédemment [480], grâce à la méthode de chevauchement d'extensions générées par PCR (ou *overlap-extension PCR method*) [679]. Les amorces employées pour chaque délétion sont répertoriées dans le Tableau V. Pour la complémentation de mutants, une copie du gène ou du groupe de gènes chez la souche sauvage ISP1820 de *S. Typhi* (incluant son promoteur natif) fut clonée au sein du plasmide à faible nombre de copies pWSK29 portant l'origine de répllication pSC101 [669]. Ce plasmide ne présente

aucun effet nuisible envers *S. Typhi* lors de l'infection bactérienne de cellules hôtes [680].

2.4 – Expériences d'infection de macrophages

2.4.1 – Test d'indice de compétition

Dans le cadre d'expériences évaluant l'indice de compétition (*Competitive Index* ou CI) des mutants définis lors d'infections de macrophages [681], une souche de *S. Typhi* ISP1820 résistante à l'acide nalidixique (Nal^r) fut obtenue et utilisée comme souche sauvage (DEF566). Aucune atténuation intracellulaire ne fut observée chez cette souche Nal^r lorsqu'en compétition vis-à-vis la souche ISP1820 au sein de macrophages *THP-1* [431]. Pour réaliser les expériences d'indice de compétition, la souche sauvage Nal^r et les mutants définis furent mis en culture séparément en LB sans agitation à 37°C pendant la nuit et le lendemain, les concentrations en UFC/ mL de chaque souche furent déterminées par mesure de la DO₆₀₀ des cultures bactériennes. Un mélange 1 : 1 (UFC/mL) constitué de la souche sauvage et du mutant à tester fut préparé et l'inoculation sur géloses LB avec et sans Nal permit de vérifier que ce mélange contenait bel et bien des quantités équivalentes de bactéries viables provenant de chaque culture. Le mélange fut ajouté aux macrophages en culture tel que décrit plus haut lors du criblage des mutants de la librairie, à l'exception 1) des macrophages cultivés à 5 x 10⁵ cellules/puits au sein de plaques de culture tissulaire de 24 puits et 2) de l'inoculation des bactéries effectuée à une MOI de 50 : 1 selon le modèle d'indice de compétition mis au point par Segura et collègues [681]. Une fois l'infection menée à terme, les cellules furent lysées par l'ajout de 1 mL de DOC à 0.1% (m/v) dans du PBS chez chaque puits. La quantité de bactéries intracellulaires viables fut évaluée en UFC/mL à 0 et 24 h d'infection, par inoculation de géloses LB et de géloses LB avec Nal. Lors des expériences de CI impliquant les mutants portant un vecteur de complémentation, ces derniers furent mis en culture chacun séparément en LB avec Ap pendant la nuit et resuspendu le lendemain en LB sans antibiotique

pour être combinés à leurs mutants respectifs, afin de préparer le mélange 1 : 1 (UFC/mL) nécessaire pour l'infection. Le CI représentant l'entrée dans les cellules se définit comme le ratio de bactéries mutantes : sauvages récoltées à 0 h, divisé par le ratio équivalent de bactéries présentes dans le mélange 1 : 1 utilisé pour l'inoculation. Quant au CI représentant la survie intracellulaire, il se définit comme le ratio de bactéries mutantes : sauvages récoltées à 24 h d'infection, divisé par le ratio équivalent de bactéries récoltées à 0 h. Les résultats de CI sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (ESM) d'au moins trois expériences indépendantes réalisées chacune en duplicata. Le test *t* bilatéral de Student (*Student's two-tailed t-test*) fut adopté pour l'analyse statistique des résultats générés.

2.4.2 – Infection avec les mutants individuels

Les infections de macrophages avec les mutants testés individuellement furent réalisées tel que décrit plus haut pour les expériences de CI, à l'exception d'une MOI de 10 : 1 utilisée pour l'inoculation des souches. L'entrée dans les cellules se définit comme la quantité de bactéries récoltées à 0 h, divisée par la quantité dans l'inoculum. Quant à elle, la survie intracellulaire se définit comme la quantité de bactéries récoltées à 24 h d'infection, divisée par la quantité récoltée à 0 h. Afin de permettre la comparaison de résultats générés lors de plusieurs expériences menées séparément, les valeurs en taux (%) de bactéries mutantes récoltées (0 h/inoculum ou 24 h/0 h) furent normalisées par rapport à celles de la souche sauvage, qui fut attribué la valeur 100% à chaque temps, à moins d'indications contraires. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm ESM d'au moins trois expériences indépendantes réalisées chacune en duplicata. Le test *t* bilatéral de *Student* fut adopté pour l'analyse statistique des résultats.

2.5 – Test de motilité

Les mutants de délétions définies furent soumis à un test de motilité, lors duquel leurs capacités de nage (*swimming motility*) en géloses LB d'agar à 0.3%

furent vérifiées comme décrit précédemment [682], à l'exception de quelques modifications décrites ici. Avant l'inoculation, les géloses furent séchées pendant 1 h sous une hotte à flux laminaire stérile à température de la pièce. Les souches à tester, préalablement mises en culture en LB à 37°C avec agitation pendant la nuit, furent le lendemain diluées 1 : 100 en LB et mis à nouveau sous agitation à 37°C, jusqu'à l'atteinte d'une DO_{600} allant de 0.4 à 0.5. Chacun des mutants fut testé parallèlement à la souche sauvage en inoculant les deux souches au sein d'une même gélose, à raison de 6 μ L chaque injectés dans l'agar. Par la suite, les géloses furent incubées à 30°C pendant 16 à 17 h, à l'exception du mutant $\Delta typA$ dont la gélose fut incubée à 37°C pendant 10 à 11 h (ce mutant montra un ralentissement de croissance à 30°C comparativement à 37°C; donnée non présentée). Le gène *typA*, portant également le nom *bipA*, est associé à la croissance bactérienne à basse température [683-686]. Au terme de l'incubation, le diamètre de migration externe pour chaque mutant fut mesuré et comparé à celui de la souche sauvage respective se trouvant au sein de la même gélose, afin d'identifier les mutants exprimant un défaut de motilité par nage. Les taux de motilité des mutants sont présentés sous forme de pourcentages générés en divisant le diamètre de migration de chacun d'eux par celui de la souche sauvage. Les résultats de motilité représentent la moyenne \pm ESM d'au moins trois expériences indépendantes et le test *t* bilatéral de Student fut sollicité pour l'analyse statistique.

2.6 – Sensibilité des mutants au peroxyde d'hydrogène

La sensibilité des mutants de délétions définies face au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) fut déterminée par une méthode de diffusion par recouvrement d'agar, tel que décrit antérieurement [575], avec certaines modifications décrites ici. Les mutants et la souche sauvage furent mis en culture en LB à 37°C sans agitation jusqu'à l'atteinte d'une DO_{600} entre 0.5 et 0.6. Pour chaque souche testée, 100 μ L de culture bactérienne furent incorporés à 3 mL de *top agar* fondu (agar à 0.5%). Ce mélange fut coulé uniformément par-dessus une gélose LB (agar à 1.5%) et le tout fut laissé à sécher à la température de la pièce,

jusqu'à ce que le *top agar* coulé soit complètement solidifié. Par la suite, un papier filtre de 6 mm de diamètre (*Becton Dickinson*) fut disposé au centre du revêtement de *top agar* solidifié et 10 μL de H_2O_2 à 29.9% (*Sigma*) furent ajoutés à ce disque de papier. Ces géloses furent incubées à 37°C pendant la nuit et suite à la croissance, les diamètres des zones d'inhibition furent mesurés le lendemain pour chaque mutant et comparés à celui de la souche sauvage, afin d'identifier les souches sensibles au H_2O_2 . Cette sensibilité se définit comme la différence entre le diamètre d'inhibition du mutant et celui de la souche sauvage, présentée en mm. Les résultats de sensibilité représentent la moyenne \pm ESM d'au moins deux expériences indépendantes et le test *t* bilatéral de Student fut sollicité pour l'analyse statistique.

CHAPITRE 3 – Résultats

3.1 – Mutagenèse globale du génome de *S. Typhi*

Afin de cribler les gènes de *S. Typhi* exerçant potentiellement un rôle lors de l'interaction de la bactérie avec les macrophages humains, une librairie complexe de mutants d'insertion par Tn a été créée. Pour ce faire, le plasmide pLOFKm portant le mini-Tn10-Km [668] a d'abord été transformé auprès de la souche MGN-617 d'*E. coli* [667] possédant la machinerie moléculaire nécessaire pour son transfert conjugatif vers la souche ISP1820 de *S. Typhi* [235]. Le pLOFKm possède une origine de répllication R6K (*oriR6K*) dont le fonctionnement nécessite la protéine π encodée par le gène *pir* [687] présent chez la souche MGN-617 [667]. Ce plasmide mobilisable aux propriétés suicides ne pourra donc pas se répliquer dans la souche de *S. Typhi* chez laquelle le gène *pir* est absent. Suite à la conjugaison du pLOFKm et à l'induction de sa transposase par l'IPTG, les transformants de *S. Typhi* ayant subi l'insertion du Tn dans leur génome furent sélectionnés sur géloses Km et leur nombre fut évalué. Une quantité de transformants Km^r bien supérieure à 10 fois le nombre de séquences codantes constituant le génome de *S. Typhi* (4599 ORF [37]) confirma la génération par ce Tn d'une librairie de complexité suffisante pour la stratégie de sélection envisagée [601]. Le mini-Tn10-Km du pLOFKm fut ensuite modifié par l'ajout de la séquence promotrice de l'ARN polymérase T7 à son extrémité 3' et ce nouveau Tn (mini-Tn10-T7) du pLOFKm fut transféré par la même procédure chez *S. Typhi*. Ainsi, une librairie comptant environ 10⁵ mutants d'insertion par le Tn a été obtenue pour la technique de sélection négative dans les macrophages humains. La complexité de la librairie couvrait approximativement 20 fois le génome de *S. Typhi*, avec une insertion du Tn à environ toutes les 50 pb. Les ADN_g de quelques mutants d'insertion choisis au hasard furent extraits, digérés par l'enzyme *Pst*I et hybridés par *Southern Blot* à l'aide du *Dig High Prime DNA labeling and detection starter kit II (Roche)* avec comme sonde la cassette Km^r

amplifiée par PCR et marquée. Cette analyse permet de vérifier et confirmer que l'insertion par le Tn était unique et aléatoire au niveau du génome bactérien des mutants (Figure 6). Par ailleurs, ~86.7% (3859 sur 4452) des ORF imprimés sur le modèle de biopuce adopté pour l'étude ont été détectés dans la librairie servant d'*input* (voir plus loin), confirmant que celle-ci était diversifiée dans sa représentation du génome de *S. Typhi*. Lors de la mutagenèse aléatoire par le Tn, une portion substantielle des insertions ont lieu au niveau de gènes considérés essentiels pour la viabilité bactérienne (par exemple, les gènes encodant les protéines ribosomales essentielles). Des mutants de tels gènes ne seront donc pas détectés au sein de la librairie et explique la couverture incomplète de tous les ORF sur la biopuce.

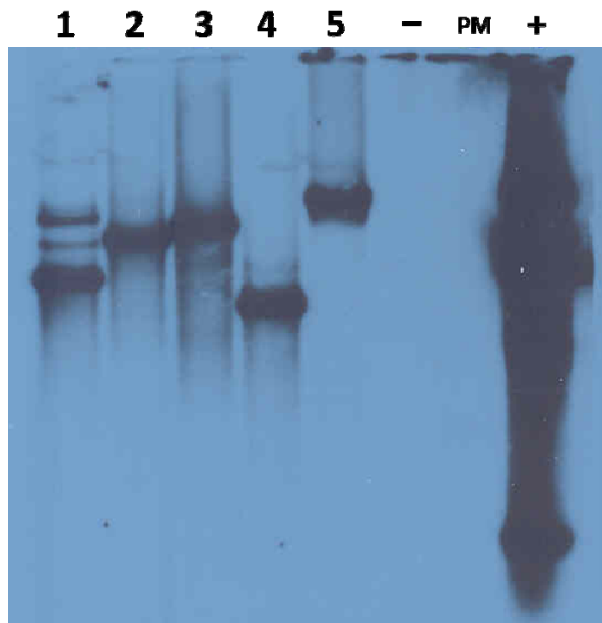


Figure 6. ADN génomique de mutants d'insertion par transposon de la librairie. Les ADN génomiques insérés par le transposon mini-Tn10-T7, extraits de mutants d'insertion chez *S. Typhi* (1-5), furent digérés par *Pst*I et utilisés pour hybridation par *Southern Blot*. La cassette de résistance Km^r amplifiée par PCR et marquée par la digoxigénine fut employée comme sonde pour détecter la présence du transposon au sein des échantillons d'ADN. Notons que deux bandes considérées non spécifiques apparaissent en haut de la bande spécifique au transposon chez l'ADN « 1 ». Le plasmide pLOFKm-T7 non digéré fut utilisé comme contrôle positif (+) et l'ADN génomique de *S. Typhi* sans transposon inséré fut inclus comme contrôle négatif (-). Un marqueur de poids moléculaire (PM) fut également inclus dans l'expérience.

3.2 – Sélection compétitive de la librairie de mutants d'insertion dans les macrophages humains

La librairie de mutants d'insertion par Tn a été soumise au passage dans les macrophages humains *THP-1* en culture. Les bactéries de la librairie (considérées

comme l'*input* dans la stratégie de sélection) ont été inoculées dans le surnageant d'une culture de 10^7 macrophages adhérents à une MOI de 10 : 1 (10^8 bactéries totales) et en allouant une période d'internalisation bactérienne de 30 min. En raison d'un pourcentage d'entrée bactérienne de 10% chez ce modèle cellulaire (donnée en laboratoire non publiée), qui représenterait un goulot d'étranglement (*bottleneck*) potentiel dans l'expérience, les 10^7 bactéries (couvrant les 10^5 mutants de la librairie) passées à l'intérieur des cellules génèrent un ratio mutant : cellule de 1 : 1. Cela permet le criblage individuel d'un mutant par macrophage et réduit les risques de complémentation. Suite à la période d'entrée bactérienne, les cellules ont été lavées et traitées à la gentamycine. L'antibiotique élimine rapidement les bactéries extracellulaires, mais sa pénétration au sein des cellules eucaryotes est limitée. Ainsi, les bactéries nichées à l'intérieur des macrophages sont protégées par l'effet bactéricide de la gentamycine [674,675,688], ce qui permet une sélection spécifique des mutants intracellulaires lors du criblage de la librairie. L'infection des macrophages a été continuée pendant 24 heures, afin de détecter les gènes contribuant à la persistance intracellulaire à long terme [689]. Après 24 h d'infection, les mutants au sein des macrophages ont été récoltés par lyse cellulaire, mis en croissance en LB avec Km pour amplifier la densité bactérienne nécessaire à l'inoculation subséquente de 10^7 nouveaux macrophages en culture par MOI de 10 : 1, par le même processus d'infection décrit ici. De cette manière, trois rondes de passages en série de la librairie chez les macrophages en culture ont été réalisées afin de sélectionner négativement les mutants sous-représentés dans ce modèle d'infection, tel qu'illustré à la Figure 5 et réalisé précédemment [658]. Ces trois rondes resserrent la détection des faibles degrés d'atténuation chez les mutants de la librairie, dont la représentation ne varie que subtilement après seulement un passage. Ainsi, les passages en série multiples amplifient la sélectivité et la fiabilité de la méthode de criblage [658,690,691].

L'ADNg des bactéries de l'*input* (mutants avant l'infection) et des deux *output* générés chacun par l'infection indépendante de macrophages en culture (mutants après trois rondes d'infection) a été extrait. À partir de ces échantillons

d'acide nucléique, des sondes d'ADNc correspondant à l'ADNg des mutants adjacents au Tn inséré ont été produites et marquées. Ces sondes ont été hybridées aux biopuces d'ORF afin de cerner les gènes de *S. Typhi* sélectionnés lors des passages compétitifs des mutants de la librairie dans les macrophages. Un seuil de sélection comprenant un facteur de variation (ou *fold-change*) de 4 (ratio *input* : *output* de 4 : 1, représenté par une valeur du $\log_2 \left[\frac{\text{output}}{\text{input}} \right] \leq -2$) ainsi qu'une valeur $P < 0.0005$ a été appliqué à partir des signaux d'intensité des gènes analysés par le programme *WebArrayDB* [678]. Parmi les 3859 séquences incluses dans l'*input*, un total 130 gènes ont été identifiés pour leur implication potentielle auprès des macrophages, grâce à la sélection négative de mutants d'insertion par Tn (Tableau VI). Parmi ces 130 gènes, 10 d'entre eux sont annotés comme pseudogènes et sont indiqués au Tableau VI.

ORF <i>S. Typhi</i> ^a	Nom de gène <i>S. Typhi</i>	ORF <i>S. Typhimurium</i> ^b	Nom de gène <i>S. Typhimurium</i>	Produit <i>S. Typhi</i> selon <i>Sanger</i> ^c	Classe fonctionnelle ^d	Facteur de variation ^e	Valeur <i>P</i>
STY0015	<i>f</i>	STM0015		<i>putative phage protein</i>	Phages et éléments d'insertion	-2.54	0.00001
STY0016		STM0016		<i>conserved hypothetical protein</i>	Inconnue	-3.13	0.00000
STY0021		STM0020		<i>conserved hypothetical protein</i>	Inconnue	-3.57	0.00001
STY0031	<i>bcfF</i>	STM0026	<i>bcfF</i>	<i>fimbrial subunit</i>	Enveloppe bactérienne	-2.12	0.00004
STY0039		STM0032		<i>possible sulfatase</i>	Métabolisme de molécules simples	-4.00	0.00035
STY0040		STM0033		<i>putative secreted 5'-nucleotidase</i>	Inconnue	-2.13	0.00005
STY0041		STM0034		<i>putative exported protein</i>	Enveloppe bactérienne	-5.75	0.00001
STY0134	<i>leuO</i>	STM0115	<i>leuO</i>	<i>probable activator protein in leuABCD operon</i>	Biosynthèse/ Dégradation d'acides aminés	-2.69	0.00001
STY0207	<i>staA, yadN</i>			<i>putative fimbrial protein</i>	Enveloppe bactérienne	-3.06	0.00002
STY0231	<i>htrA</i>	STM0209	<i>htrA</i>	<i>protease DO precursor; heat shock protein HtrA</i>	Biosynthèse/ Dégradation de protéines	-3.69	0.00000

STY0329		STM0298		<i>IS element transposase (pseudogène)^g</i>	Phages et éléments d'insertion	-2.04	0.00015
STY0372	<i>stbB</i>	STM0339	<i>stbB</i>	<i>fimbrial chaperone protein</i>	Enveloppe bactérienne	-3.69	0.00000
STY0419	<i>proC</i>	STM0386	<i>proC</i>	<i>pyrroline-5-carboxylate reductase</i>	Biosynthèse/ Dégradation d'acides aminés	-3.57	0.00009
STY0477		STM0437		<i>conserved hypothetical protein</i>	Inconnue	-2.29	0.00001
STY0520	<i>acrA</i>	STM0476	<i>acrA</i>	<i>acriflavin resistance protein A precursor</i>	Enveloppe bactérienne	-4.13	0.00014
STY0569	<i>ybbW</i>	STM0522	<i>ybbV</i>	<i>putative allantoin permease (pseudogène)</i>	Protéines de transport et liaison	-2.60	0.00011
STY0605		STM0557		<i>putative membrane protein</i>	Enveloppe bactérienne	-4.55	0.00032
STY0651	<i>ybdO</i>	STM0606	<i>ybdO</i>	<i>putative lysR-family transcriptional regulator</i>	Fonctions régulatrices	-2.91	0.00041
STY0804	<i>gpmA</i>	STM0772	<i>gpmA</i>	<i>phosphoglycerate mutase 1</i>	Métabolisme énergétique	-4.71	0.00023
STY0878	<i>ybiS</i>	STM0837	<i>ybiS</i>	<i>putative exported protein</i>	Enveloppe bactérienne	-4.52	0.00004
STY0917	<i>ulaA</i>	STM0884	<i>ulaA</i>	<i>possible transport protein</i>	Protéines de transport et liaison	-2.42	0.00008
STY0968	<i>pflA</i>	STM0970	<i>pflA</i>	<i>pyruvate formate-lyase 1 activating enzyme</i>	Métabolisme énergétique	-4.12	0.00005
STY0973	<i>pflB</i>	STM0973	<i>pflB</i>	<i>formate acetyl-transferase 1</i>	Métabolisme énergétique	-6.02	0.00015
STY0974	<i>focA</i>	STM0974	<i>focA</i>	<i>probable formate transporter (formate channel)</i>	Protéines de transport et liaison	-6.17	0.00002
STY0977	<i>serC</i>	STM0977	<i>serC</i>	<i>phosphoserine amino-transferase</i>	Biosynthèse/ Dégradation d'acides aminés	-2.24	0.00005
STY1041				<i>putative prophage membrane protein</i>	Phages et éléments d'insertion	-2.33	0.00044
STY1121	<i>sigD, sopB</i>	STM1091	<i>sopB</i>	<i>cell invasion protein</i>	Pathogenèse	-2.08	0.00004
STY1129		STM1097		<i>putative exported protein</i>	Enveloppe bactérienne	-2.57	0.00004

STY1157		STM1122	<i>ycdC</i>	<i>putative transcriptional regulator</i>	Fonctions régulatrices	-3.16	0.00038
STY1177	<i>csgF</i>	STM1140	<i>csgF</i>	<i>assembly/transport component in curli production</i>	Enveloppe bactérienne	-4.74	0.00041
STY1187	<i>mdoG</i>	STM1150	<i>mdoG</i>	<i>periplasmic glucans biosynthesis protein MdoG precursor</i>	Processus cellulaires divers	-3.16	0.00018
STY1220	<i>flgI</i>	STM1181	<i>flgI</i>	<i>flagellar P-ring protein precursor</i>	Enveloppe bactérienne	-4.16	0.00032
STY1312	<i>cls</i>	STM1739	<i>cls</i>	<i>cardiolipin synthetase</i>	Enveloppe bactérienne	-3.72	0.00039
STY1364				<i>hypothetical periplasmic protein</i>	Enveloppe bactérienne	-3.47	0.00003
STY1397		STM1667		<i>putative thiol peroxidase</i>	Inconnue	-2.33	0.00010
STY1398		STM1666		<i>hypothetical protein</i>	Inconnue	-3.84	0.00001
STY1401		STM1663	<i>ynaI</i>	<i>putative membrane protein</i>	Enveloppe bactérienne	-2.22	0.00044
STY1408		STM1657		<i>putative chemo-receptor protein</i>	Processus cellulaires divers	-2.79	0.00042
STY1427	<i>acpD</i>	STM1642	<i>acpD</i>	<i>acyl carrier protein phosphodiesterase</i>	Métabolisme de molécules simples	-2.37	0.00044
STY1497	<i>osmC</i>	STM1563	<i>osmC</i>	<i>osmotically inducible protein C</i>	Processus cellulaires divers	-3.90	0.00019
STY1523	<i>hyaA2</i>	STM1539		<i>uptake hydrogenase small subunit</i>	Métabolisme énergétique	-4.89	0.00007
STY1534		STM1527		<i>putative membrane protein</i>	Enveloppe bactérienne	-2.02	0.00002
STY1554		STM1507	<i>ydfJ</i>	<i>putative membrane transport protein</i>	Protéines de transport et liaison	-2.77	0.00021
STY1576		STM1488	<i>mlc</i>	<i>putative regulatory protein</i>	Fonctions régulatrices	-2.25	0.00018
STY1585		STM1482	<i>ydgF</i>	<i>putative conserved membrane protein</i>	Enveloppe bactérienne	-5.21	0.00002
STY1643				<i>DNA-invertase</i>	Phages et éléments d'insertion	-2.28	0.00008
STY1649		STM1473	<i>ompN</i>	<i>outer membrane protein</i>	Protéines de transport et liaison	-3.87	0.00005

STY1690		STM1432	<i>ydhO</i>	<i>putative secreted protein</i>	Enveloppe bactérienne	-2.70	0.00003
STY1702	<i>ssaQ</i>	STM1418	<i>ssaQ</i>	<i>putative type III secretion protein</i>	Pathogenèse	-2.55	0.00048
STY1703	<i>ssaP</i>	STM1417	<i>ssaP</i>	<i>putative type III secretion protein</i>	Pathogenèse	-3.43	0.00028
STY1705	<i>ssaN</i>	STM1415	<i>ssaN</i>	<i>putative type III secretion ATP synthase</i>	Pathogenèse	-2.46	0.00023
STY1739		STM1382	<i>orf408</i>	<i>putative ribokinase (pseudogène)</i>	Pathogenèse	-2.26	0.00022
STY1770	<i>btuC</i>	STM1340	<i>btuC</i>	<i>vitamin B12 transport system permease</i>	Protéines de transport et liaison	-2.25	0.00033
STY1852	<i>aroQ</i>	STM1269		<i>putative chorismate mutase</i>	Biosynthèse/ Dégradation d'acides aminés	-2.95	0.00001
STY1859		STM1261		<i>conserved hypothetical protein</i>	Inconnue	-2.76	0.00024
STY1867		STM1254		<i>putative lipoprotein</i>	Enveloppe bactérienne	-5.46	0.00018
STY1868		STM1253		<i>putative cytochrome</i>	Inconnue	-4.14	0.00003
STY1869		STM1252		<i>hypothetical protein</i>	Inconnue	-2.10	0.00042
STY1878	<i>pagC</i>	STM1246	<i>pagC</i>	<i>outer membrane invasion protein</i>	Pathogenèse	-2.23	0.00049
STY1886	<i>cdtB</i>			<i>putative toxin-like protein</i>	Pathogenèse	-3.86	0.00006
STY1910		STM1784	<i>ychF</i>	<i>putative ATP/GTP-binding protein</i>	Inconnue	-3.28	0.00039
STY1976	<i>prc</i>	STM1845	<i>prc</i>	<i>tail-specific protease precursor</i>	Biosynthèse/ Dégradation de protéines	-4.85	0.00016
STY2091	<i>kdgA</i>	STM1884	<i>eda</i>	<i>multifunctional: 2-keto-3-deoxygluconate 6-phosphate aldolase; 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase; oxaloacetate decarboxylase</i>	Métabolisme énergétique	-4.16	0.00003
STY2134	<i>flhD</i>	STM1925	<i>flhD</i>	<i>flagellar transcriptional activator FlhD</i>	Fonctions régulatrices	-3.22	0.00043
STY2167	<i>fliC, flaG</i>	STM1959	<i>fliC</i>	<i>flagellin</i>	Enveloppe bactérienne	-2.72	0.00000
STY2168	<i>fliD</i>	STM1960	<i>fliD</i>	<i>flagellar hook associated protein 2</i>	Enveloppe bactérienne	-7.08	0.00009

STY2171	<i>amyA</i>	STM1963	<i>amyA</i>	<i>cytoplasmic alpha-amylase</i>	Métabolisme de macro-molécules	-2.18	0.00042
STY2251	<i>pduK</i>	STM2046	<i>pduK</i>	<i>putative propanediol utilization protein PduK</i>	Métabolisme de molécules simples	-2.10	0.00008
STY2276	<i>sbcB</i>	STM2067	<i>sbcB</i>	<i>Exodeoxyribonuclease I</i>	Réplication, dégradation et modification d'ADN/ARN	-2.04	0.00003
STY2289	<i>ugd, udg</i>	STM2080	<i>udg</i>	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>	Métabolisme de molécules simples	-2.54	0.00001
STY2303	<i>rfbI</i>	STM2093	<i>rfbI</i>	<i>putative reductase RfbI</i>	Enveloppe bactérienne	-2.87	0.00024
STY2304	<i>rfbC</i>	STM2094	<i>rfbC</i>	<i>dTDP-4-dehydro-rhamnose 3,5-epimerase</i>	Enveloppe bactérienne	-3.48	0.00009
STY2346		STM2133		<i>hypothetical protein</i>	Inconnue	-4.47	0.00035
STY2347		STM2134		<i>hypothetical protein</i>	Inconnue	-2.40	0.00004
STY2378	<i>stcD, yehA</i>	STM2149	<i>stcD</i>	<i>putative exported protein</i>	Enveloppe bactérienne	-2.85	0.00002
STY2403		STM2173		<i>hypothetical protein</i>	Inconnue	-3.61	0.00001
STY2432		STM2198		<i>putative transport protein (pseudogène)</i>	Protéines de transport et liaison	-2.19	0.00004
STY2444		STM2208		<i>putative membrane protein</i>	Enveloppe bactérienne	-4.39	0.00039
STY2469		STM2243		<i>putative bacteriophage tail protein (pseudogène)</i>	Inconnue	-2.50	0.00003
STY2501		STM2274		<i>putative transmembrane transport protein (pseudogène)</i>	Protéines de transport et liaison	-3.76	0.00016
STY2504		STM2275		<i>putative transcriptional regulator (pseudogène)</i>	Fonctions régulatrices	-2.33	0.00002
STY2509		STM2280		<i>putative transmembrane transport protein</i>	Protéines de transport et liaison	-2.44	0.00026
STY2574		STM2344		<i>putative sugar phosphotransferase component II A</i>	Métabolisme de molécules simples	-2.06	0.00010

STY2582	<i>hisM</i>	STM2352	<i>hisM</i>	<i>histidine transport system permease</i>	Protéines de transport et liaison	-2.61	0.00003
STY2607		STM2376		<i>putative lipoprotein</i>	Enveloppe bactérienne	-2.15	0.00013
STY2608		STM2377		<i>conserved hypothetical protein</i>	Inconnue	-2.76	0.00016
STY2621	<i>fadI</i>	STM2389	<i>yfcY</i>	<i>putative 3-ketoacyl-CoA thiolase</i>	Métabolisme de molécules simples	-2.11	0.00009
STY2632	<i>pgtE, prtA</i>	STM2395	<i>pgtE</i>	<i>outer membrane protease E, protease VII precursor</i>	Enveloppe bactérienne	-3.20	0.00038
STY2725	<i>purC</i>	STM2487	<i>purC</i>	<i>Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase</i>	Réplication, dégradation et modification d'ADN/ARN	-2.73	0.00020
STY2762	<i>shivH, sinH</i>	STM2517	<i>sinH</i>	<i>putative intimin (pseudogène)</i>	Pathogenèse	-2.32	0.00017
STY2820		STM2574		<i>putative transmembrane transport protein</i>	Protéines de transport et liaison	-2.57	0.00001
STY2860	<i>rplS</i>	STM2673	<i>rplS</i>	<i>50S ribosomal subunit protein L19</i>	Biosynthèse/ Dégradation de protéines	-2.42	0.00008
STY2982	<i>ygbA</i>	STM2860	<i>ygbA</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	Inconnue	-2.89	0.00010
STY2988	<i>sprA, hilC</i>	STM2867	<i>hilC</i>	<i>possible AraC-family transcriptional regulator</i>	Pathogenèse	-3.90	0.00002
STY2994	<i>prgI</i>	STM2873	<i>prgI</i>	<i>pathogenicity 1 island effector protein</i>	Pathogenèse	-3.42	0.00024
STY3004	<i>sipF</i>	STM2881	<i>iacP</i>	<i>probable acyl carrier protein</i>	Pathogenèse	-5.00	0.00003
STY3007	<i>sipC, sspC</i>	STM2884	<i>sipC</i>	<i>pathogenicity island 1 effector protein</i>	Pathogenèse	-2.01	0.00010
STY3010	<i>spaS</i>	STM2887	<i>spaS</i>	<i>secretory protein (associated with virulence)</i>	Pathogenèse	-2.05	0.00045
STY3047		STM2922		<i>conserved hypothetical protein</i>	Inconnue	-3.08	0.00019
STY3167		STM3022		<i>probable amino acid transport protein</i>	Protéines de transport et liaison	-2.06	0.00043
STY3309		STM3138		<i>hypothetical protein</i>	Inconnue	-2.43	0.00001
STY3331	<i>exbD</i>	STM3158	<i>exbD</i>	<i>biopolymer transport ExbD protein</i>	Protéines de transport et liaison	-6.04	0.00010

STY3332	<i>exbB</i>	STM3159	<i>exbB</i>	<i>biopolymer transport ExbB protein</i>	Protéines de transport et liaison	-3.53	0.00012
STY3340		STM3166.S		<i>possible membrane transport protein</i>	Protéines de transport et liaison	-2.58	0.00044
STY3456		STM3273	<i>yhbT</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	Inconnue	-2.07	0.00027
STY3537		STM3357		<i>possible transcriptional regulator</i>	Fonctions régulatrices	-4.71	0.00021
STY3605		STM3954	<i>yigG</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	Inconnue	-3.03	0.00046
STY3862	<i>ompL</i>	STM4016	<i>ompL, yshA</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	Inconnue	-2.78	0.00010
STY3871	<i>typA</i>	STM4009	<i>typA, bipA</i>	<i>GTP-binding protein</i>	Fonctions régulatrices	-2.94	0.00049
STY4049	<i>trmH, spoU</i>	STM3743	<i>spoU</i>	<i>tRNA (guanosine-2'-O)-methyltransferase</i>	Biosynthèse/ Dégradation de protéines	-2.53	0.00033
STY4072	<i>waaG, rfaG</i>	STM3722	<i>rfaG</i>	<i>Lipopoly-saccharide core biosynthesis protein</i>	Enveloppe bactérienne	-3.25	0.00001
STY4077	<i>waal, rfaI</i>	STM3718	<i>rfaI</i>	<i>Lipopoly-saccharide 1,3-galactosyltransferase</i>	Enveloppe bactérienne	-6.82	0.00005
STY4081	<i>waaK, rfak</i>	STM3714	<i>rfaK</i>	<i>Lipopoly-saccharide 1,2-N-acetylglucosamine-transferase</i>	Enveloppe bactérienne	-2.31	0.00007
STY4082	<i>waaL, rfaL, rfbT</i>	STM3713	<i>rfaL</i>	<i>O-antigen ligase</i>	Enveloppe bactérienne	-2.26	0.00002
STY4106		STM3690		<i>putative lipoprotein</i>	Enveloppe bactérienne	-4.77	0.00031
STY4264		STM3547.Sc		<i>putative ribokinase</i>	Inconnue	-3.09	0.00022
STY4400	<i>metA</i>	STM4182	<i>metA</i>	<i>homoserine O-succinyltransferase</i>	Biosynthèse/ Dégradation d'acides aminés	-2.27	0.00015
STY4426	<i>malk</i>	STM4230	<i>malk</i>	<i>maltose/ maltodextrin transport ATP-binding protein</i>	Protéines de transport et liaison	-2.01	0.00026
STY4453		STM4258	<i>siiB</i>	<i>putative integral membrane protein</i>	Pathogenèse	-3.55	0.00020
STY4456		STM4259	<i>siiC</i>	<i>putative type-I secretion protein</i>	Pathogenèse	-3.43	0.00002

STY4458		STM4261	<i>siiE</i>	<i>large repetitive protein (pseudogène)</i>	Pathogenèse	-2.35	0.00004
STY4582				<i>possible exported protein</i>	Pathogenèse	-2.89	0.00038
STY4679				<i>putative membrane protein</i>	Pathogenèse	-3.33	0.00001
STY4725	<i>rnr</i>	STM4368	<i>vacB</i>	<i>ribonuclease R (RNase R)</i>	Réplication, dégradation et modification d'ADN/ARN	-3.84	0.00009
STY4728	<i>yjfJ</i>	STM4371	<i>yjfJ</i>	<i>conserved hypothetical protein (pseudogène)</i>	Inconnue	-3.37	0.00004
STY4805		STM4467		<i>arginine deiminase</i>	Biosynthèse/ Dégradation d'acides aminés	-3.06	0.00024
STY4842				<i>probable regulatory protein</i>	Pathogenèse	-3.74	0.00000
STY4863	<i>trpS2</i>	STM4508	<i>trpS2</i>	<i>probable tryptophanyl-tRNA synthetase</i>	Biosynthèse/ Dégradation de protéines	-2.85	0.00015
STY4881	<i>hsdS</i>	STM4524	<i>hsdS</i>	<i>subunit S of type I restriction - modification system</i>	Réplication, dégradation et modification d'ADN/ARN	-2.51	0.00006
STY4899		STM4546	<i>yjjP</i>	<i>putative membrane protein</i>	Enveloppe bactérienne	-2.96	0.00035

^aORF annotés du génome séquencé de la souche CT18 de *S. Typhi* [37].

^bORF homologues annotés du génome séquencé de la souche LT2 de *S. Typhimurium* [36].

^cProduits des gènes de la souche CT18 de *S. Typhi* selon l'Institut *Sanger* (www.sanger.ac.uk) où le génome fut séquencé [37].

^dLes classes fonctionnelles sont basées principalement sur le système de classification des gènes de *S. Typhi* mis au point par l'Institut *Sanger*.

^eLes facteurs de variation (*fold-change*) du ratio *input* : *output* ont été générés à l'aide du programme *WebArrayDB* (www.webarraydb.org) [678], en appliquant le $\log_2[\text{output}/\text{input}]$ selon les intensités de signal des gènes détectés sur les biopuces.

^fAucun nom de gène chez le sérovar.

^gLes pseudogènes, annotés selon [37], sont indiqués en caractères gras.

Tableau VI. Gènes de *S. Typhi* identifiés par sélection négative des mutants d'insertion par transposon de la librairie passée au sein des macrophages humains *THP-1*. Adapté de [670].

Parmi cette sélection de gènes identifiés, plusieurs d'entre eux étaient associés à la biosynthèse des LPS, des flagelles et des fimbriae, en plus de plusieurs gènes participant à la virulence de *Salmonella* (Tableau VI). En outre, plusieurs des gènes sélectionnés appartenaient aux SPI-1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, et 16 chez *S. Typhi*. Issus des mutants sous-représentés au cours de la stratégie de sélection compétitive dans les macrophages, les 130 gènes identifiés ont chacun été associés à une classe fonctionnelle, parmi plusieurs (Tableau VI) créées principalement selon le système de classification de l'Institut *Sanger* (www.sanger.ac.uk) et qui sont répertoriées en ordre de grandeur à la Figure 7. Les classes fonctionnelles les plus fortement représentées étaient *Enveloppe bactérienne* (24%), *Protéines hypothétiques de fonctions inconnues* (nommée *Fonction inconnue* à partir d'ici) (18%), *Pathogenèse* (15%), ainsi que *Protéines de transport et liaison* (12%) (Figure 7). Par ailleurs, seulement 10 des 130 gènes ont été précédemment sélectionnés négativement lors de l'identification des mutants atténués d'une librairie cultivée répétitivement en série au sein de milieu de croissance riche (*btuC*, *gpmA*, *kdgA*, *mlc*, *prc*, *proC*, *rplS*, *ydcC*, *waaG* et *ybiS*) (Tableau VI) [660]. Cela dit, les mutants d'insertion sous-représentés ici suite au criblage de la librairie de *S. Typhi* avaient principalement une déficience au sein des macrophages et non un défaut de croissance généralisé.

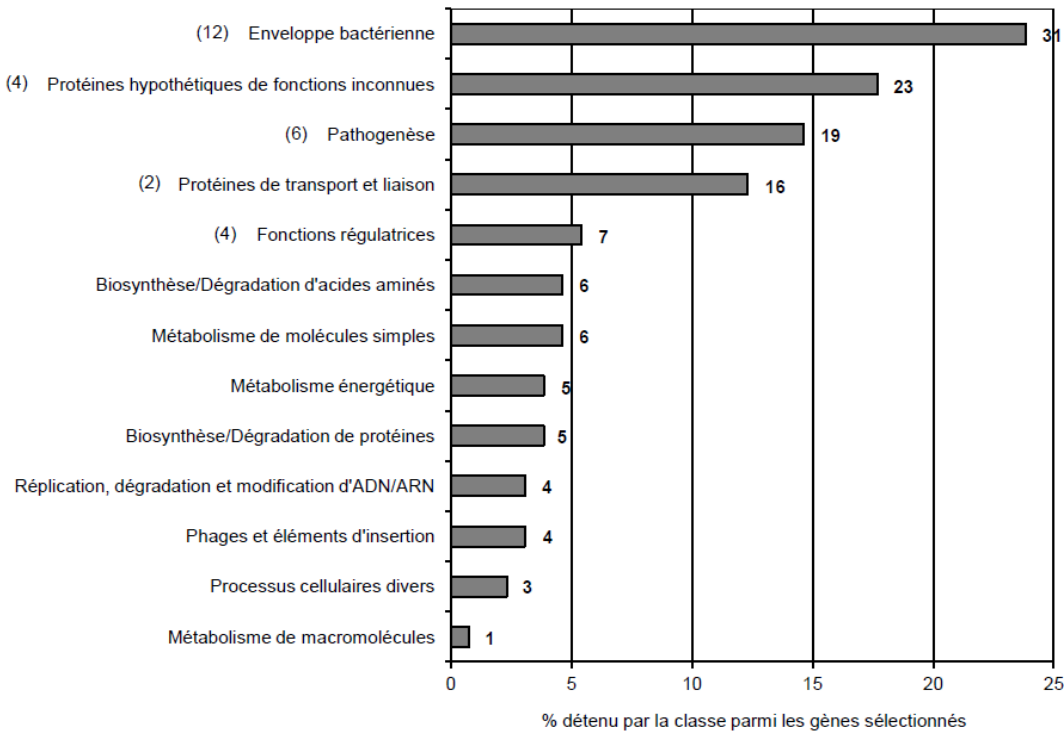


Figure 7. Classification fonctionnelle des 130 gènes de *S. Typhi* identifiés par sélection compétitive des mutants de la librairie dans les macrophages humains. Adapté de [670]. Les classes fonctionnelles (telles qu'attribuées à chaque gène au Tableau VI) sont indiquées à gauche et le nombre de gènes parmi la classe est indiqué en caractères gras à droite de chaque barre. Le nombre de mutants de délétions définies créés pour la classe est indiqué entre parenthèses à la gauche de chacune.

3.3 – Caractérisation *in vitro* des mutants de délétions définies

Un total de 28 mutants de délétions définies sans marqueur de résistance Km^r ont été créés chez la souche ISP1820 de *S. Typhi* (Tableau VII), choisis parmi les gènes des classes fonctionnelles les plus représentées (Figure 7). Ces délétions non polaires ciblaient un gène spécifique ou un groupe de gènes, tels que ceux d'un opéron complet (ou d'un opéron putatif) ou d'une portion d'un opéron. Ces

groupes de gènes comprennent *exbDB*, *waaQGP*, *rfbIC*, *flhCD*, les opérons fimbriaires *bcf*, *csg*, *stb* et *stc*, les îlots de pathogénicité SPI-4 et CS54, ainsi que les groupes d'ORF *STY1358-67*, *STY1867-1868* et *STY4842-4843* (ce dernier provenant du SPI-10). Chacun de ces groupes de séquences inclut au moins un gène parmi les 130 initialement sélectionnés (indiqués en caractères gras ici) (Tableau VI).

Défauts d'entrée/survie observés chez les macrophages						
ORF(s) (nom de gène) ^a	Description	Facteur de variation ^b	<i>S. Typhi</i> ^c (patients typhoïdiques) ^d	Autres sérovars de <i>Salmonella</i>	Niveau de motilité (%) ^e	Sensibilité au H ₂ O ₂ (mm) ^f
Enveloppe bactérienne						
<i>STY0520 (acrA)</i>	protéine de résistance à l'acriflavine	-4.13	entrée/survie (AcrA)	entrée [692]	-	-
<i>STY2167 (fliC)</i>	flagelline	-2.72	entrée/survie	entrée [693]	20 (± 0.7) ^g	-
<i>STY2632 (pgtE)</i>	protéase de membrane externe E	-3.20	entrée	survie [694]	-	-
<i>STY4071-73 (waaQGP)</i>	protéines de biosynthèse de base du LPS	-3.25	entrée/survie	survie [695,696]	62 (± 11.9) ^g	3 (± 0.6)
<i>STY2303-04 (rfbIC)</i>	biosynthèse d'antigène O du LPS	-2.87/-3.48	survie	AD ^h	70 (± 5.7) ^g	-
<i>STY0024-34 (bcfABCDEFHG)</i>	structure fimbriaire	-2.12	entrée (BcfD)	AD	-	1.3 (± 0.3) ^g
<i>STY1176-82 (csgGFEDBAC)</i>	structure fimbriaire	-4.74	entrée (CsgEFG)	AD	-	-

<i>STY0369-73 (stbABCDE)</i>	structure fimbriaire	-3.69	entrée (StbD)	AD	-	-
<i>STY2378-81 (stcABCD)</i>	structure fimbriaire	-2.85	survie	AD	-	2 (± 1.0)
<i>STY0041</i>	protéine exportée putative	-5.75	survie	AD	-	-
<i>STY1358-67^j (64)</i>	îlot génétique	-3.47	AD (<i>STY1364</i>)	AD	-	2.5 (± 0.5) ^g
<i>STY1867-1868</i>	protéines putatives	-5.46/-4.14	entrée/survie	AD	-	1.5 (± 0.5)

Pathogénèse

<i>STY2753-63a (sinH)</i>	îlot de pathogénicité (CS54)	-2.32	entrée (ShdA)	AD	-	-
<i>STY1878 (pagC)</i>	protéine d'invasion de membrane externe	-2.23	entrée/survie (PagC)	survie [333]	-	-
<i>STY3004 (sipF)</i>	protéine porteuse d'acyle (SPI-1)	-5.00	entrée/survie	AD	-	-
<i>STY4452-60 (siiABCDE^fF)</i>	SST1 et adhésine (SPI-4)	-3.55/ -3.43/-2.35	entrée/survie	AD	-	2 (± 0.0) ^g
<i>STY4679^j</i>	protéine de membrane putative (SPI-7)	-3.33	entrée	AD	84 (± 2.6)	-
^j <i>STY4842-43</i>	protéines régulatrices putatives (SPI-10)	-3.74	entrée/survie	AD	-	2.5 (± 0.5)

Fonctions régulatrices

<i>STY2133-34 (flhCD)</i>	régulateurs flagellaires principaux	-3.22	entrée/survie	AD	21 (± 0.9) ^g	-
---------------------------	---	-------	---------------	----	-------------------------	---

<i>STY3641 (gppA)</i>	guanosine pentaphosphatase	-4.16	entrée/survie	AD	-	2 (\pm 0.6) ^g
<i>STY1576 (mlc)</i>	protéine régulatrice putative	-2.25	survie	AD	-	3 (\pm 0.0) ^g
<i>STY3871 (typA)</i>	protéine liant le GTP	-2.94	entrée/survie	AD	76 (\pm 4.5) ^{g,k}	2 (\pm 0.0)
Protéines de transport et liaison						
<i>STY3331-32 (exbDB)</i>	protéines de transport de biopolymères	-6.04/-3.53	entrée/survie	AD	-	1.5 (\pm 0.9)
<i>STY1649 (ompN)</i>	protéine de membrane externe N	-3.87	survie	AD	-	-
Fonction inconnue						
<i>STY0016</i>	protéine hypothétique	-3.13	AD	AD	-	-
<i>STY1398</i>	protéine hypothétique	-3.84	survie	AD	-	1.5 (\pm 0.5)
<i>STY1869</i>	protéine hypothétique	-2.10	entrée/survie	AD	-	-
<i>STY2346</i>	protéine hypothétique	-4.47	entrée	AD	-	2 (\pm 1.0)

^aLes séquences ayant été inactivées chez chacun des 28 mutants de délétions définies sans marqueur créés pour cette étude sont répertoriés. Les nombres ou caractères en gras parmi un groupe de gènes représentent le/les ORF ou gènes sélectionnés lors du criblage initial dans les macrophages.

^bLes valeurs du \log_2 de l'*output*/l'*input* pour les gènes identifiés suite au criblage des mutants de la librairie dans les macrophages. Pour les groupes de gènes, les facteurs de variation sont associés aux gènes sélectionnés (caractères gras) parmi le groupe de gènes.

^cLes phénotypes ont été déduits à partir des résultats d'expériences d'indice de compétition en combinaison avec ceux d'infections individuelles réalisées lors de cette étude avec les mutants de délétions définies chez *S. Typhi*, la souche sauvage et la souche sauvage résistante à l'acide nalidixique (DEF566).

^dLes produits de gènes ou d'ORF parmi les antigènes de *S. Typhi* détectés dans le sang de patients atteints de fièvre typhoïde, selon les études antérieures [543,697,698].

^eLes pourcentages représentent le diamètre de migration du mutant en mm divisé par celui de la souche sauvage, indiquant ainsi le taux de motilité restant pour les mutants comparativement à la souche sauvage. Les résultats représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes et le test *t* bilatéral de *Student* a été appliqué pour l'analyse statistique. Les traits d'union (-) indiquent un niveau de motilité du mutant identique à celui de la souche sauvage.

^fLes valeurs ont été obtenues en soustrayant le diamètre d'inhibition du mutant en mm par celui de la souche sauvage. Les résultats représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne d'au moins deux expériences indépendantes et le test *t* bilatéral de *Student* a été appliqué pour l'analyse statistique. Les traits d'union (-) indiquent une sensibilité du mutant identique à celle de la souche sauvage.

^gLes résultats des mutants sont significativement différents de ceux de la souche sauvage ($P < 0.05$).

^hAD, aucun défaut durant l'interaction avec les macrophages n'est rapporté parmi la littérature publiée antérieurement sur les sérovars de *Salmonella* autres que *Typhi*.

ⁱPseudogène chez les souches CT18 [37] et Ty2 [127] de *S. Typhi*.

^jUnique à *S. Typhi* comparativement à *S. Typhimurium* [37].

^kTest de motilité réalisé à 37°C pour $\Delta typA$, au lieu de 30°C appliqué pour les autres mutants, car ce mutant présentait une croissance *in vitro* réduite à 30°C (donnée non présentée).

Tableau VII. Sommaire des résultats de caractérisation des mutants de délétions définies chez *S. Typhi*. Adapté de [670].

Les mutants définis furent d'abord mis en culture en milieu liquide, afin de vérifier si l'inactivation des gènes affectait la croissance *in vitro*. Les courbes de croissance générées par les mutants étaient toutes semblables à celle de la souche sauvage lorsque cultivés en milieu LB, à l'exception des mutants *mlc* et *waaQGP*,

chez qui de légers défauts ont été observés (Figure 8). De tels défauts de croissance ont d'ailleurs été notés antérieurement lors de travaux portant sur un mutant *mlc* chez *E. coli* [699] et *waaG* chez *S. Typhimurium* [700]. Par ailleurs, aucun des mutants définis n'exprimait d'auxotrophie lorsque testé en milieu minimal M63-glucose liquide. La résistance face au DOC, le détergent employé pour la lyse cellulaire lors des expériences d'infection de macrophages, fut ensuite évaluée auprès des mutants définis. Parmi ces derniers, le mutant *acrA* fut le seul à montrer une absence de croissance pendant la nuit en milieu liquide *RPMI* comprenant du DOC à 0.1%. De plus, ce mutant exprima environ 10% de mortalité sur une période de 2 h passée au sein de PBS contenant du DOC à 0.1%.

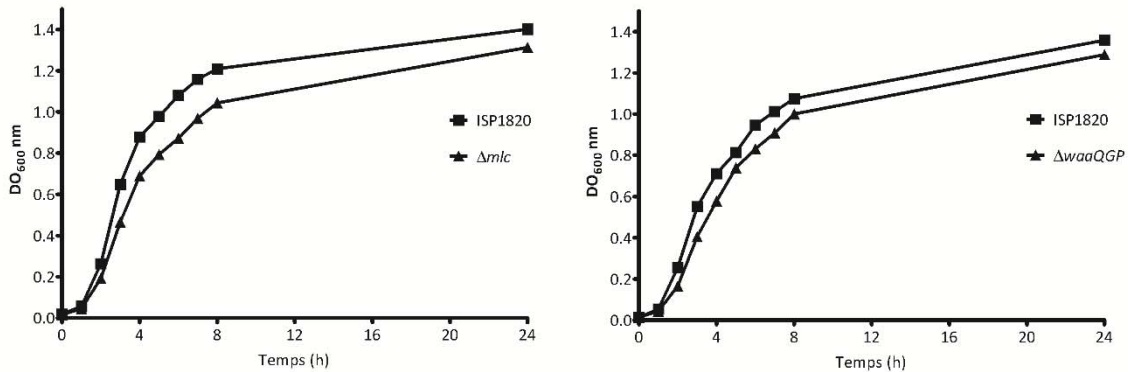


Figure 8. Croissance *in vitro* en milieu riche de mutants de délétions définies.

Les mutants isogéniques *mlc* et *waaQGP*, ainsi que la souche sauvage ISP1820 de *S. Typhi* ont tous été inoculés en milieu liquide LB et mis en croissance avec agitation à 37°C pendant 24 heures. Les densités optiques à 600 nm (DO₆₀₀nm) des mutants ont été mesurées à différents temps et comparées à celles de la souche sauvage afin de détecter une atténuation de la croissance due à l'inactivation de ces gènes. Les courbes présentées ici sont chacune représentatives des résultats générés par au moins trois expériences indépendantes, lors desquelles chaque mutant fut mis en croissance parallèlement avec une souche sauvage lors de chaque essai. h, heures.

La motilité représente un comportement bactérien précédemment lié à la virulence de *S. Typhi* envers les cellules eucaryotes ciblées pour l'infection [701] et conséquemment, la capacité des mutants à nager (*swimming motility*) en géloses LB semi-solide fut évaluée. Les mutants *fliC*, *waaQGP*, *rfaB*, *flhCD* et *typA* ont migré significativement moins loin en géloses LB à 0.3% d'agar que la souche sauvage ($P < 0.05$) (Tableau VII). De tels défauts de motilité étaient attendus à l'égard des mutants *flhCD* et *fliC*, car ces derniers représentent les régulateurs principaux et la sous-unité structurale majeure des flagelles, respectivement [702]. De plus, l'inactivation du gène *waaG* (nommé aussi *rfaG*) fut précédemment associée à un phénotype d'atténuation de la motilité chez les bactéries *E. coli*, *S. Typhimurium* et *S. Typhi* [700,703,704]. Par ailleurs, le mutant STY4679 exprima

également un défaut de migration sur gélose semi-solide, tombant en deçà cependant du seuil de significativité ($P = 0.226$) (Tableau VII).

Les cellules phagocytaires possèdent la capacité de générer des *ROS*, parmi lesquels on retrouve le H_2O_2 , un important mécanisme du système immunitaire qui soumet les microorganismes intrusifs à un stress oxydatif [705]. Ainsi, la sensibilité des mutants au contact du H_2O_2 a été déterminée par un test de diffusion sur gélose. Parmi ceux-ci, plusieurs ont montré des phénotypes de sensibilité légèrement plus élevée que celle de la souche sauvage, dont les mutants *waaQGP*, *bcf*, *stc*, *STY1358-67*, *STY1867-68*, *SPI-4*, *STY4842-43*, *gppA*, *mlc*, *typA*, *exbDB*, *STY1398* et *STY2346*. Notamment, ces sensibilités étaient significativement supérieures par rapport à la souche sauvage chez les mutants *bcf*, *STY1358-67*, *SPI-4*, *gppA* et *mlc* ($P < 0.05$) (Tableau VII).

3.4 – Interaction des mutants définis avec les macrophages humains lors du test d'indice de compétition

Lors de la stratégie de sélection négative réalisée auprès des mutants d'insertion par Tn de la librairie, ces derniers étaient sujets à une compétition les uns envers les autres pour leur entrée et répllication intracellulaire dans les macrophages. Conséquemment, les mutants de délétions définies ont chacun été assujettis à un test évaluant leur CI contre une souche isogénique Nal^f de *S. Typhi* (DEF566), représentant la souche sauvage lors des expériences. Ainsi, des valeurs CI ont été générées pour les 28 mutants lors des processus d'entrée (0 h) et de survie intracellulaire (24 h post-infection) chez les macrophages humains *THP-1*. Neuf mutants présentaient des CI significativement plus faibles lors de l'entrée dans les cellules (*pgtE*, *bcf*, *csg*, *stb*, *STY1867-68*, *CS54*, *STY4679*, *STY4842-43* et *STY2346*), tandis que huit mutants démontraient des CI significativement plus bas au cours de la survie intracellulaire (*ompN*, *rfbIC*, *stc*, *STY0041*, *pagC*, *gppA*, *mlc* et *STY1398*) ($P < 0.05$) (Figure 9). Par ailleurs, neuf mutants se sont montrés significativement moins compétitifs que la souche sauvage pendant l'entrée et

aussi la survie au sein des macrophages (*acrA*, *exbDB*, *fliC*, *waaQGP*, *sipF*, SPI-4, *flhCD*, *typA* et *STY1869*) ($P < 0.05$) (Figure 9).

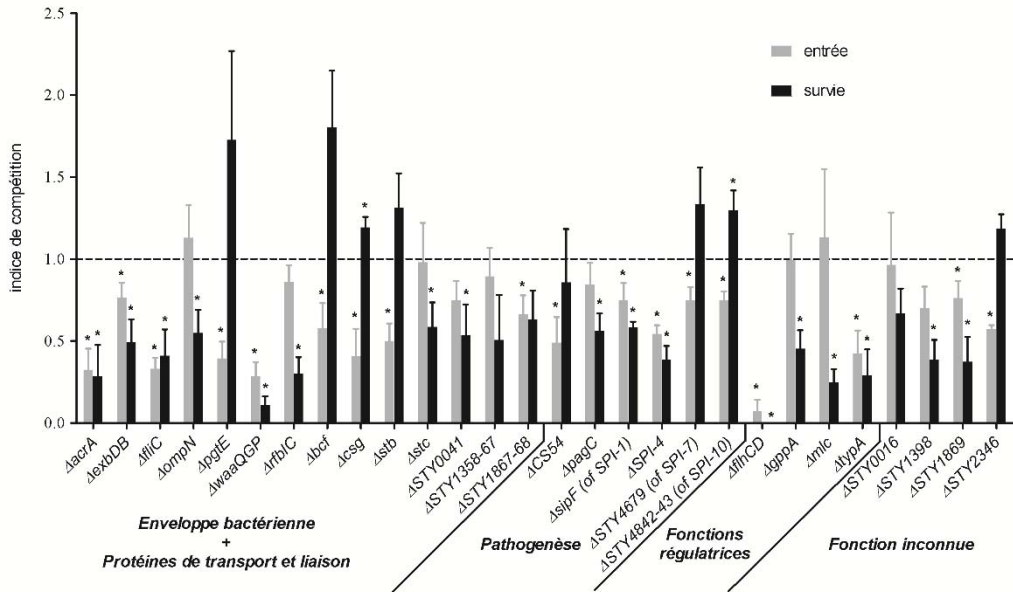


Figure 9. Entrée et survie des mutants de délétions définies lorsqu'ils sont testés en infection mixte dans les macrophages humains. Adapté de [670]. Des tests d'indice de compétition (CI) ont été réalisés auprès de 28 mutants isogéniques contre la souche sauvage de *S. Typhi* résistante à l'acide nalidixique (DEF566) lors de l'entrée (0 h) et de la survie intracellulaire (24 h post-infection) dans les macrophages humains *THP-1*. Les classes fonctionnelles sont indiquées sous les noms de gènes. Les données représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes réalisées chacune en duplicata. Les astérisques (*) indiquent les valeurs de CI de mutants qui sont significativement différentes de la valeur « 1 » ($P < 0.05$).

Parmi les mutants évalués quant à leur CI, ceux fortement surpassés par la souche sauvage, dont *fliC*, *waaQGP*, *flhCD*, ainsi que ceux représentant les ORF de fonctions inconnues *STY1398*, *STY1869* et *STY2346* furent complétés par

l'entremise du/des gène(s) sauvage(s) portés par un plasmide. Ces souches mutantes complémentées furent soumises au test de CI contre leur mutant respectif. La compétition bactérienne entreprise entre les mutants et leurs souches complémentées associées reproduisirent les phénotypes notés lors des tests de CI initiaux effectués entre ces mutants et la souche sauvage (Tableau VIII). Effectivement, tout comme la souche sauvage, les souches complémentées surpassèrent leurs homologues mutants lors des phases d'entrée et de survie intracellulaire, à l'exception des mutants *waaQGP* au niveau de l'entrée (CI = 1.04) et *STY1398* pendant la survie dans les cellules (CI = 1.19) (Tableau VIII).

ORF(s) (nom du gène)	Valeur du CI pour l'entrée ^a		Valeur du CI pour la survie	
	vs souche sauvage ^b	vs mutant complémenté ^c	vs souche sauvage	vs mutant complémenté
<i>STY2167 (flhC)</i>	0.33 (± 0.068) * ^d	0.41 (± 0.086) *	0.41 (± 0.16) *	0.10 (± 0.066) *
<i>STY4071-73 (waaQGP)</i>	0.28 (± 0.09) *	1.04 (± 0.141)	0.11 (± 0.056) *	0.19 (± 0.102) *
<i>STY2133-34 (flhCD)</i>	0.07 (± 0.069) *	0.15 (± 0.045) *	0.00 (± 0.00) *	0.07 (± 0.066) *
<i>STY1398</i>	0.7 (± 0.131)	0.97 (± 0.185)	0.39 (± 0.122)*	1.19 (± 0.127)
<i>STY1869</i>	0.76 (± 0.105) *	0.73 (± 0.033) *	0.37 (± 0.151) *	0.53 (± 0.095) *
<i>STY2346</i>	0.57 (± 0.026) *	0.67 (± 0.122) *	1.19 (± 0.087)	0.76 (± 0.118)

^aCI, indice de compétition.

^bLa souche sauvage est représentée par la souche sauvage de *S. Typhi* résistante à l'acide nalidixique (DEF566).

^cLes mutants complémentés possèdent tous le vecteur de clonage à faible nombre de copies pWSK29 [669] portant le gène ou groupe de gènes délétés respectif.

^dLes données représentent la moyenne ± l'erreur standard de la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes réalisées chacune en duplicata, lors desquelles les mutants définis étaient combinés avec la souche sauvage ou le mutant complémenté respectif durant l'infection de macrophages humains. Les astérisques (*) indiquent les valeurs de CI de mutants qui sont significativement différentes de la valeur « 1 » ($P < 0.05$).

Tableau VIII. Effet de la complémentation génétique par plasmide auprès des mutants de délétions définies chez *S. Typhi* lors de tests d'indice de compétition au sein des macrophages humains. Adapté de [670].

3.5 – Interaction entre les macrophages humains et les mutants définis testés individuellement

Les mutants de délétions définies ont par après été testés chacun individuellement lors d'infection de macrophages humains *THP-1*. Pour cette expérience, les taux d'entrée et de survie intracellulaire dans ces cellules en culture furent évalués auprès de tous les mutants isogéniques et comparés à ceux de la souche sauvage ISP1820 de *S. Typhi* testée en parallèle. Six mutants démontraient un taux d'entrée dans les macrophages significativement plus bas (*exbDB*, *pgtE*, *pagC*, SPI-4, *typA* et *STY2346*) et deux mutants exhibaient des taux de survie intracellulaire significativement moindres (*STY4842-43* et *mlc*) ($P < 0.05$) (Figure 10). Par ailleurs, six mutants ont présenté des atténuations au niveau de l'ensemble de l'infection, avec des taux d'entrée et également de survie tous les deux significativement plus faibles (*acrA*, *fliC*, *waaQGP*, *STY1867-68*, *flhCD* et *gppA*) ($P < 0.05$) (Figure 10). Le mutant *acrA* fortement atténué fut complémenté par une copie du gène sauvage porté par un plasmide (pWSK*acrA*). Le défaut de survie significatif ($P < 0.05$) initialement observé chez le mutant *acrA* infectant les macrophages fut inversé auprès de la souche complémentée : le taux de répllication intracellulaire de la souche complémentée de 0 à 24 h post-infection se montra équivalent à celui exprimé par la souche sauvage de *S. Typhi* (Figure 10). Les courbes de croissance intracellulaire de la souche complémentée et sauvage sont significativement différentes en terme d'UFC/mL aux temps 0h, 2h et 24 h post-infection, mais démontrent des taux de répllication équivalents au courant de la période d'infection de 24 h (Figure 11). Ce phénotype de complémentation confirma que le défaut de croissance intracellulaire exhibé par le mutant était effectivement associé à la délétion du gène *acrA*.

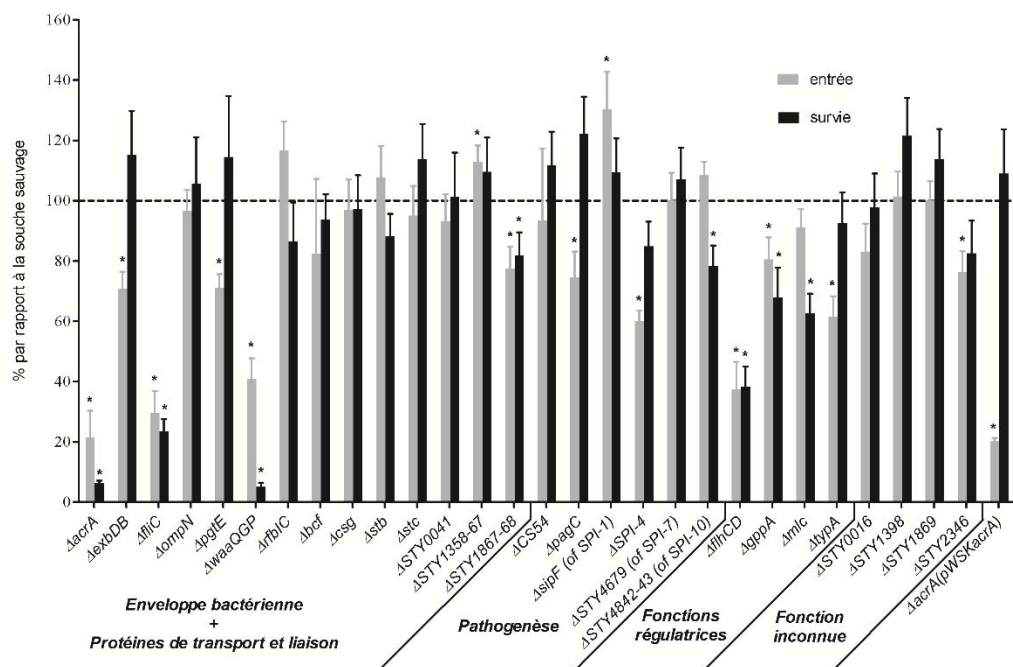


Figure 10. Taux d'entrée et de survie intracellulaire des mutants de délétions définies testés individuellement dans les macrophages humains. Adapté de [670]. Les macrophages humains *THP-1* ont été infectés avec la souche sauvage ISP1820 de *S. Typhi*, les 28 mutants isogéniques de délétions définies et la souche complétée Δ acrA(pWSKacrA). Le nombre de bactéries intracellulaires a été déterminé lors de l'entrée (0 h) et pendant la survie (24 h post-infection) au sein des macrophages. Les classes fonctionnelles sont indiquées sous les noms de gènes. Les valeurs de pourcentages de bactéries récoltées ont été normalisées par rapport à la valeur contrôle de la souche sauvage, définie comme étant de 100% à chaque temps. Les données représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes réalisées chacune en duplicata. Les astérisques (*) indiquent les pourcentages de mutants ou du complément qui sont significativement différents de la souche sauvage isogénique ($P < 0.05$).

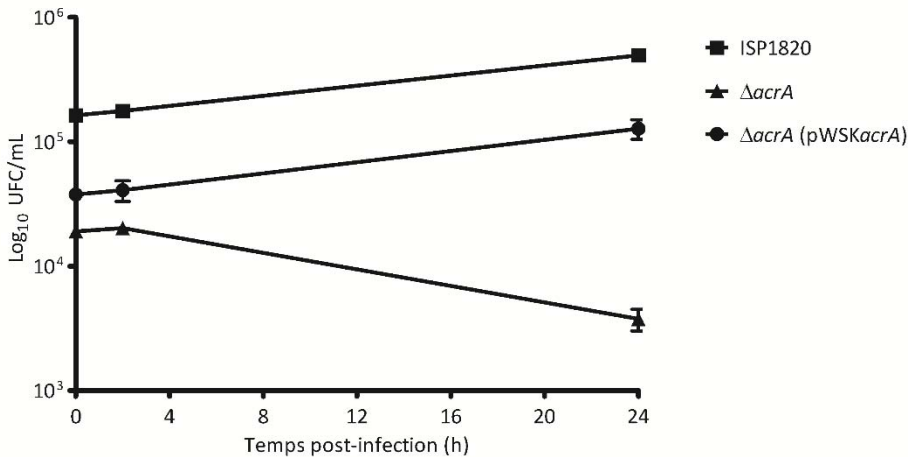


Figure 11. Implication du gène *acrA* durant l'interaction de *S. Typhi* avec les macrophages humains. Les macrophages humains *THP-1* ont été infectés avec la souche sauvage ISP1820 de *S. Typhi*, le mutant *acrA* et la souche complétée *ΔacrA*(pWSK*acrA*). Les données représentent la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes réalisées chacune en duplicata. Les comptes bactériens en Unités Formatives de Colonies (UFC)/mL de la souche mutante et complétée étaient significativement différents de la souche sauvage isogénique à tous les temps ($P < 0.05$). h, heures

Globalement, les expériences d'infection présentées ici ont révélé chez certains mutants définis des atténuations uniquement exprimées lorsqu'en compétition : huit mutants durant l'entrée dans les cellules (*bcf*, *csg*, *stb*, *CS54*, *sipF*, *STY4679*, *STY4842-43* et *STY1869*) et 11 mutants au courant de la survie intracellulaire (*exbDB*, *ompN*, *rfbIC*, *stc*, *STY0041*, *pagC*, *sipF*, *SPI-4*, *STY1398*, *typA* et *STY1869*) ($P < 0.05$) (Figures 9 et 10). En outre, 12 mutants se sont retrouvés significativement atténués lorsqu'en compétition et également lorsque testés seuls, incluant 10 mutants avec un défaut au niveau de l'entrée dans les macrophages (*acrA*, *exbDB*, *fliC*, *pgtE*, *waaQGP*, *STY1867-68*, *SPI-4*, *flhCD*, *typA* et *STY2346*), ainsi que six mutants lors de la survie intracellulaire (*acrA*, *fliC*, *waaQGP*, *flhCD*, *gppA* et *mlc*) ($P < 0.05$) (Figures 9 et 10). Quelques-uns des

mutants testés ont démontré des degrés de compétitivité intracellulaire (*csg* et *STY4842-43*; Figure 9) ou des taux d'entrée (*STY1358-67* et *sipF*; Figure 10) significativement supérieurs à ceux de la souche sauvage. Cette opposition entre les phénotypes générés par criblage d'une librairie et par test individuel a été observée antérieurement, notamment chez des mutants des bactéries pathogènes *Moraxella catarrhalis* [706] et *Streptococcus pneumoniae* [707]. Ce phénomène inattendu demeure difficile à expliquer, mais des différences subtiles entre les conditions environnementales du criblage et celles des expériences d'infection mixte ou individuelle pourraient être responsables de cette divergence. De plus, certaines interactions bactérie-bactérie provoquées par l'inactivation d'un gène spécifique pourraient avoir provoqué l'entrée ou la survie plus élevée chez ces souches mutantes par rapport à la souche sauvage, lors des expériences d'infection [706].

CHAPITRE 4 – Discussion

4.1 – Étudier la fièvre typhoïde avec le sérovar Typhi spécifique à la maladie chez l'humain

Les résultats présentés dans cet ouvrage ont été produits à partir de *S. Typhi*, associé à l'infection systémique que représente la fièvre typhoïde chez l'Homme, alors que *S. Typhimurium* cause une pathologie localisée moins grave se limitant au tractus intestinal de l'espèce humaine. L'état actuel des connaissances sur la pathogénèse de *S. Typhi* chez l'humain et la réponse immunitaire développée par cet hôte a été établi principalement grâce à des études utilisant *S. Typhimurium* chez des modèles murins de divers fonds génétiques. Chez ces modèles d'infections, le sérovar Typhimurium peut causer une infection systémique lors de laquelle la bactérie peut se propager vers les organes du SRE [133,140] ou même jusqu'au niveau du système nerveux central [708]. Par contre, il est reconnu que ces modèles d'infection ne reproduisent pas tous les aspects immunologiques des réponses innées et acquises générées lors de l'infection de l'Homme par *S. Typhi* [580,593]. De plus, le phénotype d'infection par *S. Typhimurium* chez la souris dépend également du gène *slc11a1* (ou NRAMP1) qui contribue au contrôle de la pathologie chez cet hôte [380,577,578]. La présence d'un allèle fonctionnel *slc11a1*^{+/+} rendra la souris résistante à l'infection et représente un modèle de persistance chronique asymptomatique [281], alors que la souris *slc11a1*^{-/-} meurt des suites d'une typhoïde aiguë seulement quelques jours après l'inoculation [581]. L'expression de l'allèle *slc11a1* n'est pas détectée chez des lignées cellulaires transformées érythroïdes ou lymphoïdes (T et B), chez des progéniteurs des voies monocytaires/macrophagiques dont la lignée *THP-1* employée ici, ainsi que dans la lignée cellulaire de leucémie promyélocytaire *HL-60*. Par contre, *slc11a1* peut être fortement induit chez les cellules *HL-60* lorsque celles-ci sont différenciées vers la voie monocytaire/macrophagique avec de la vitamine D₃ ou du PMA, et aussi vers la voie granulocytaire à l'aide de

diméthylformamide (DMF), de diméthylsulfoxyde (DMSO) ou d'acide rétinoïque [709]. Quoiqu'il en soit, une étude récente auprès d'un modèle murin humanisé doté d'un HIS indiquait qu'une souris *slc11a1*^{-/-} était tout aussi susceptible qu'une souris *slc11a1*^{+/+} face à l'infection par *S. Typhi* [598], corroborant les données antérieures qui révèlent une absence d'implication de cet allèle dans la résistance de l'être humain contre ce sérovar [580].

Par ailleurs, les composantes génétiques de *S. Typhimurium* et *S. Typhi* se distinguent au niveau de facteurs de virulence clés portés par des éléments mobiles au sein de leurs génomes, offrant à chacun des caractères de virulence uniques [33,35]. Un exemple notoire demeure la capsule polysaccharidique Vi présente seulement chez *S. Typhi*, qui prévient chez ce sérovar la fixation par le complément de l'immunité innée et ainsi l'élimination de la bactérie chez l'hôte [710]. Les évidences expérimentales montrent en plus que cette capsule permet à *S. Typhi* de pénétrer la muqueuse intestinale en empêchant la sécrétion de cytokines de l'immunité innée, telles que la *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α), l'IL-6 et l'IL-8 induites par les voies signalétiques associées aux TLR [496,503].

Malgré l'étendue du contenu génétique partagé entre les deux sérovares, chez lesquels presque 90% des gènes sont partagés [36], 601 gènes sont uniques chez *S. Typhi* comparativement à *S. Typhimurium*. De plus, l'annotation du génome de *S. Typhi* révèle 204 pseudogènes, parmi lesquels 145 apparaissent intacts et seulement 23 sont également pseudogènes chez *S. Typhimurium* [37]. Cette dégradation du génome de *S. Typhi* par la présence notable de pseudogènes expliquerait potentiellement son spectre d'hôte limité à l'Homme, mais la combinaison de multiples éléments génétiques spécifiques à ce sérovar par rapport au deuxième pourrait être derrière sa capacité d'infecter systématiquement l'humain. Les gènes participant à la dissémination vers les organes du SRE humain seraient multiples et leur dispersion à travers différentes positions du génome compliquerait la détection de portions génomiques ou d'îlots contribuant à la virulence de *S. Typhi* [35]. Les études de vaccination montrent également des

distinctions au niveau du bagage génétique sollicité pour la virulence de chaque sérovar. En effet, des souches vaccinales de *S. Typhimurium* et *S. Typhi* ayant subi les mêmes délétions ne colonisaient pas l'intestin au même degré lorsqu'administrées oralement chez des volontaires humains, chez qui une excrétion bactérienne prolongée était observée chez *S. Typhimurium* seulement [253,711,712]. D'autant plus, il arrive que la mutation de gènes chez *S. Typhimurium* rende ce sérovar avirulent et immunogénique dans la souris, mais que l'inactivation de ces mêmes gènes au sein de souches vaccinales de *S. Typhi* ne reproduise pas l'effet atténuant escompté lorsqu'administré chez l'humain [236,237,713]. De plus, malgré que l'inactivation des gènes *aro* et *phoP* atténue *S. Typhimurium* et *S. Typhi* [232,237,251,333,714], d'autres mutations qui atténuent la virulence de *S. Typhimurium*, par exemple auprès des gènes *galE* ou *cya-crp*, n'empêche pas *S. Typhi* de rendre l'être humain malade [212,247,713]. Cela dit, les extrapolations au sujet de *S. Typhi* tirées à partir d'expériences effectuées avec *S. Typhimurium* doivent donc être considérées avec prudence et les résultats des travaux réalisés ici ont l'avantage d'avoir été générés à l'aide de la bactérie spécifique à la typhoïde humaine.

4.2 – Mutagenèse par insertion pour créer la librairie de mutants

La réalisation de ce projet de recherche a d'abord nécessité la création d'une librairie de mutants chez *S. Typhi*, qui permettrait de cibler systématiquement les séquences de son chromosome, contribuant à l'infection de macrophages humains. Plusieurs approches de mutagenèse globale aléatoire par insertion d'un Tn dans le génome de *S. Typhi* ont été entreprises, dans le but de générer une librairie suffisamment complexe. D'abord, une technique utilisant un complexe de transposition nommé TransposomeTM [715,716] a été envisagée. Ce procédé implique au préalable la formation *in vitro* d'un complexe stable constitué d'un Tn5 et de sa transposase, dont le système d'insertion est rendu hyperactif par

mutations au niveau de la transposase et de ses séquences de reconnaissance dans le Tn5. Une fois reconstitué, le complexe est transféré par électroporation au sein de la bactérie étudiée, dans laquelle la transposase est activée par le Mg^{2+} trouvé au sein des bactéries, induisant l'insertion aléatoire du Tn5 dans le génome [716]. Les mutants d'insertion portant la cassette de résistance Km^r du Tn5 sont obtenus par sélection des transformants sur milieu avec l'antibiotique approprié et une transposition d'efficacité élevée est observée chez *E. coli* et *S. Typhimurium* avec ce système [716].

L'électroporation du Transposome *EZ-Tn5TM <T7/KAN-2>* (*Epicentre Biotechnologies*) dans la souche sauvage ISP1820 de *S. Typhi* adoptée dans cette étude a généré un nombre de transformants trop faible pour constituer une librairie assez complexe. Pourtant, des Transposomes à base de Tn5 ont précédemment permis la création de bibliothèques volumineuses de mutants d'insertion chez *S. Typhimurium* [659,717-719] et *S. Typhi* [660,717,720], mais les données scientifiques publiées n'en répertorient aucune chez la souche ISP1820 du sérovar Typhi. Il a été postulé que l'insertion par le Transposome Tn5 moins fréquente notée chez *S. Typhimurium*, comparativement à celle observée chez *E. coli*, pourrait être compensée en modifiant l'ADN du Tn de manière à le protéger de la dégradation par les systèmes bactériens de restriction/modification des acides nucléiques [716]. On indique cependant que *S. Typhimurium* possède une efficacité d'électroporation généralement inférieure à celle d'*E. coli* et que sa fréquence d'insertion pourrait rejoindre celle d'*E. coli* en employant des conditions d'électroporation spécifiques et optimales à *Salmonella enterica* [721]. Quoiqu'il en soit, il est en effet possible d'améliorer l'efficacité de transformation en bloquant l'action des systèmes de restriction/modification de type I retrouvés chez plusieurs espèces, dont *E. coli* et *Salmonella enterica* [722,723] chez qui ces systèmes reconnaissent l'ADN du Tn comme du matériel génétique d'origine étrangère et le dégradent par clivage [724]. Notons que le système de restriction/modification de type I chez *S. Typhi*, composé des gènes *hsd*, comporte *hsdM* qui est annoté comme un pseudogène [37,127] et qui est essentiel

à la formation du complexe entre les sous-unités du système [723]. Par contre, certaines évidences montrent que ce dernier serait tout de même fonctionnel (voir section 4.6.1)[136]. Un exemple d'outil moléculaire pour contourner ces systèmes chez la bactérie hôte est le *TypeOneTM Restriction Inhibitor* (*Epicentre Biotechnologies*) constitué de la protéine de phage Ocr [725] qui masque chez les enzymes de restriction/modification leurs sites de liaison à l'ADN, empêchant par conséquent la dégradation du Tn pendant l'électroporation. Ce produit a d'ailleurs été utilisé précédemment chez *S. Typhimurium* et *S. Typhi* pour la création de bibliothèques complexes de mutants chez ces deux sérovars [717]. Ainsi, l'intégration d'un tel outil lors de l'électroporation du Transposome chez la souche ISP1820 de *S. Typhi* utilisée ici représente un paramètre à envisager lors d'éventuelles expériences de mutagenèse par insertion de Tn.

En deuxième temps, le transfert conjugatif du plasmide suicide pUT [668] d'origine de répllication *R6K* portant un Tn5, le mini-Tn5-Cm [726], a été considéré pour construire la bibliothèque chez *S. Typhi*. Ce Tn5 comporte une cassette de résistance au Cm et son insertion est médiée par une transposase localisée à l'extérieur de l'élément mobile dans le plasmide. Le Tn5 et ses dérivés ont été grandement utilisés pour muter globalement le génome chez plusieurs espèces bactériennes [454,727-736] et leur intégration chromosomique aléatoire est reconnue [737]. Malgré plusieurs essais et ajustements, il est demeuré impossible de générer une bibliothèque de complexité suffisante auprès de la souche ISP1820 de *S. Typhi* lors de cette étude. La structure originale de type sauvage du Tn5, un Tn détecté pour la première fois chez le bactériophage λ cultivé dans une souche d'*E. coli* [738], encode une protéine qui inhibe sa transposition et ainsi abaisse sa fréquence d'insertion. De plus, cette protéine peut agir *en trans* vis-à-vis un nouveau Tn5 introduit au sein de la bactérie et inhibe sa transposition [739,740]. Un mécanisme similaire a également été identifié auprès du Tn10 [741]. Il est plausible que la souche ISP1820 de *S. Typhi* utilisée pour générer la bibliothèque de mutants possède dans son génome un Tn5 (ou un vestige de Tn5) dont la protéine inhibitrice encore fonctionnelle contribuerait à réduire significativement l'insertion

spécifique par ce Tn. Cette hypothèse expliquerait le faible taux de mutants d'insertion obtenu avec le Transposome *EZ-Tn5TM <T7/KAN-2>* et le mini-Tn5-Cm. Le séquençage du génome de la souche ISP1820, qui n'a toujours pas été effectué, permettra peut-être de mieux comprendre la faible efficacité d'insertion du Tn5 observée ici.

Finalement, la troisième approche de mutagenèse globale essayée auprès de *S. Typhi* a permis de générer une bibliothèque de complexité souhaitée, grâce à l'insertion cette fois d'un Tn10, transféré par conjugaison au sein du plasmide suicide pLOFKm [668]. Le mini-Tn10-T7 chez les mutants de la bibliothèque générée est une version du mini-Tn10-Km [668] modifiée par l'ajout de la séquence promotrice pour la transcription par l'ARN polymérase T7 (Tableau IV). L'avantage des mini-Tn, tels que ceux portés par les vecteurs pLOFKm ou pUT testés ici, est en fait que le gène de transposase est situé à l'extérieur du Tn. Ainsi, la transposase n'accompagne pas le Tn lors de l'intégration dans le génome, offrant ainsi des insertions très stables, sans possibilité de réarrangements secondaires [668,742,743]. Le Tn10 et ses dérivés sont reconnus comme d'importants outils de génétique moléculaire pour la mutagenèse aléatoire, notamment chez *Salmonella* [743] et d'autres espèces bactériennes également [657,744-747]. Son insertion est reconnue comme suffisamment aléatoire pour générer des mutants représentant presque tous les gènes d'intérêt de la bactérie ciblée [743,748].

Une méthode appliquée pour vérifier le caractère aléatoire de l'insertion par un Tn auprès d'une banque de mutants est le transfert des mutants sélectionnés sur milieu avec antibiotique vers un milieu minimal. En effet, dû au grand nombre de gènes des produits pour la biosynthèse de nutriments et suppléments, l'insertion à travers différentes positions dans le génome donnera naissance à une variété de mutants auxotrophes. De tels mutants peuvent être identifiés sur milieu minimal par l'expression de phénotypes diversifiés (dont des suppléments divers pourront compléter les auxotrophies générées) [749]. Cependant, cette technique est

devenue désuète au fil du temps, suite à l'apparition de biopuces, de *tiling array* et de séquençage à haut débit de transcrits permettant de détecter systématiquement les séquences insérées par un Tn au sein de la librairie de mutants générée [601]. Les biopuces de *Salmonella* utilisée dans le cadre des travaux effectués ici [677] ont permis de déterminer, tel que décrit dans la section « Résultats », un degré de complexité approprié de la librairie créée chez *S. Typhi* (couvrant ~86.7% du génome). En principe, la complexité de cette librairie a sans doute été supérieure lorsqu'on considère strictement le nombre de séquences codantes ayant été insérées par un Tn. Cependant, plusieurs gènes essentiels pour la viabilité bactérienne ont inévitablement été inactivés et des mutants de ces gènes ne peuvent être présents dans l'*input* avant la sélection chez les macrophages. De plus, la présence d'un seul Tn à des positions aléatoires dans le génome des mutants fut évaluée par *Southern Blot* avant la sélection de la librairie dans les macrophages humains (Figure 6).

4.3 – Résultats en lien avec le contenu génomique de *Salmonella*

La méthodologie CGH fait usage de biopuces d'ADN pour vérifier la présence/absence de gènes entre des espèces étroitement apparentées [750,751]. Cette approche a été sollicitée à maintes reprises pour offrir une meilleure compréhension sur l'évolution et la virulence de multiples bactéries pathogènes, telles que *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pyogenes* et également *S. enterica* [96,105,397,605,752-757]. La notion stipulant que des différences génétiques parmi des souches de *Salmonella* peuvent entraîner des conséquences importantes au niveau de la virulence a déjà été rapportée plusieurs fois, notamment au niveau d'un même sérovar [96]. Chez le sérovar Paratyphi B par exemple, le gène *avrA* se retrouve toujours absent chez des souches provenant d'infections systémiques, alors qu'on retrouve généralement *sopEI* chez ces dernières. Cependant, les

souches d'infections entériques ont habituellement des profils d'absence et présence variés à l'égard de ces gènes [758]. Ainsi, CGH présente la possibilité de cibler des séquences uniques chez une souche de *Salmonella* par rapport à une autre qui seraient derrière le phénotype d'infection distinct [759]. Parmi les études d'analyse comparative répertoriées, l'une d'entre elles réalisée récemment par Suez *et al.* est particulièrement intéressante par rapport aux données sur la pathogenèse de *S. Typhi* générées ici. Plus précisément, celle-ci s'est attardée sur le contenu génomique d'isolats de NTS invasifs et gastro-entériques chez l'être humain représentant dans l'ensemble 12 sérovars de *Salmonella*. Grâce à la technique CGH, les auteurs ont récolté des résultats fortement utiles qui ouvrent la voie vers une meilleure caractérisation du profil génétique et de la pathogenèse des NTS invasifs responsables d'infections bactériémiques chez l'hôte humain [757].

L'infection systémique par *S. Typhi* et la bactériémie développée par les souches NTS invasives exposent les bactéries à de nombreuses conditions environnementales hostiles dans l'hôte qui se distinguent de celles rencontrées lors de l'infection localisée dans le tractus intestinal [760]. Ainsi, pour assurer la viabilité du pathogène dans ces foyers d'infection particuliers, une gamme précise de gènes d'importance cruciale est inévitablement sélectionnée positivement au sein du chromosome bactérien. En comparant les constitutions génétiques de 16 souches NTS invasives, Suez *et al.* ont établi un génome central renfermant 3233 gènes (sur un total de 4548 gènes de *Salmonella* détectés) communs à toutes ces souches. Ce génome central d'isolats bactériémiques comprend notamment dans leur intégralité (ou presque) les SPI-1 à 5, 9, 13 et 14, les opérons fimbriaires *bcf*, *csg*, *stb*, *sth* et *sti*, ainsi que la protéine de membrane externe encodée par *sinH* de l'îlot de pathogénicité CS54. La présence commune de ces gènes chez les NTS invasifs soulignerait leur caractère essentiel dans la dissémination systémique chez l'Homme et de plus, on note plusieurs rattachements aux éléments de *S. Typhi* identifiés ici par criblage dans les macrophages infectés. Effectivement, on remarque dans ce génome central de la collection de NTS invasifs la présence de 94 gènes parmi les 130 sélectionnés ici chez *S. Typhi* dans les macrophages

humains. Plusieurs de ces gènes proviennent d'ailleurs des SPI (SPI-1, 2, 4, 5, et 13) et fimbriae (*bcf*, *csg* et *stb*) détectés à travers les souches invasives. Ces gènes communs comprennent notamment l'adhésine géante *siiE* du SPI-4, ainsi que la protéine de membrane externe SinH de CS54, tous deux provenant d'îlots de pathogénicité dont l'inactivation s'est soldé par un phénotype d'atténuation chez les mutants définis de *S. Typhi* ici.

L'analyse de Suez *et al.* a également révélé la présence intrigante (et même l'expression native *in vitro*) chez certaines souches NTS invasives de gènes reconnus pour leur caractérisation spécifiquement chez *S. Typhi*. Ceux-ci incluent la toxine typhoïdale encodée par *cdtB* [761] qui fait partie des gènes identifiés dans les macrophages humains ici (Tableau VI). De plus, l'homologue du gène *STY1360* chez *S. Typhi* (une protéine putative de fonction inconnue [37]) fut détecté chez une portion des souches invasives. Sa séquence en acides aminés se trouve similaire à celle de EspS, un effecteur de SST3 chez la bactérie *Citrobacter rodentium* [757]. Le criblage chez *S. Typhi* a permis d'identifier ici le gène *STY1364* (Tableau VI) encodant une protéine périplasmique putative [37]. Ce dernier fait partie, tout comme *STY1360*, d'un îlot génétique unique chez *S. Typhi* comparativement à *S. Typhimurium* impliqué dans la susceptibilité aux peptides antimicrobiens et dans la stabilité de l'enveloppe bactérienne [762,763]. Par contre, la délétion de cet îlot auprès du mutant *STY1358-67* chez *S. Typhi* testé ici n'a montré aucun phénotype d'atténuation (Tableau VII, Figures 9 et 10). En outre, une série de 16 nouveaux îlots génomiques (de deux à huit ORF) jamais caractérisés auparavant chez *Salmonella* furent également identifiés par leurs travaux, dont *STM0437-STM0438*. Le premier ORF, *STM0438*, fut sélectionné ici dans les macrophages humains (homologue de *STY0477*, Tableau VI), mais *STM0438* impliqué dans la colonisation de poussins [757] est absent chez *S. Typhi* [36,37]. Les gènes de *S. Typhi* identifiés ici durant l'infection de macrophages qui furent également détectés chez des NTS invasifs par d'autres expériences suggèrent un apport substantiel de leur part dans la dissémination de *Salmonella* vers les foyers systémiques dans l'hôte humain. Par contre, plusieurs distinctions

importantes demeurent toujours entre les bagages génétiques de ces sérovars, qui pourraient expliquer les manifestations pathogéniques et immunologiques différentes rencontrées lors d'une infection systémique causée par *S. Typhi* par rapport à une bactériémie de la part d'un NTS [331].

4.4 – Résultats en lien avec les gènes et protéines induits chez *Salmonella*

Évaluer l'expression génétique demeure une première approche prometteuse pour définir les gènes intervenant dans la survie au sein de conditions précaires pour la bactérie. L'analyse de l'expression génétique auprès d'un microorganisme comme *Salmonella* comporte cependant certains défis. Notamment, dans un environnement au sein duquel la bactérie n'occupe qu'une mince fraction de la masse totale, l'ARN procaryote demeure difficile à obtenir. Par contre, certaines stratégies ont été développées pour la capture efficace d'ARN bactérien lorsque *Salmonella* se trouve dans un milieu complexe. La pratique de telles méthodes a permis de dresser le transcriptome de *S. Typhi* dans les macrophages humains *THP-1* [626]. En outre, une suite d'expériences conçues par le laboratoire de Bumann et collègues démontre que les gènes et protéines exprimés fortement par *S. Typhimurium* durant l'infection ont parallèlement une fonction significative dans la virulence chez la souris [764,765]. De plus, les antigènes hautement induits pour la virulence de *Salmonella in vivo* représentent des candidats attirants pour le développement de nouveaux vaccins contre la typhoïde [766].

Les données transcriptomiques de *S. Typhi* à 24 h post-infection dans les macrophages humains (générées en utilisant comme contrôle *in vitro* le profil d'expression des bactéries extracellulaires au temps 0 h) [626], ont été comparées ici aux gènes sélectionnés parmi la librairie de mutants d'insertion. Cette analyse comparative révèle une différence surprenante entre l'expression et la représentation des gènes au sein des macrophages infectés. En effet, parmi la série

de gènes sous-représentés lors du criblage de la librairie, seulement 8% d'entre eux (10 des 130 gènes) sont également sur-régulés spécifiquement dans ces cellules. Ce manque de corrélation entre la transcription d'un gène et sa contribution au niveau de la viabilité ou de la virulence a été observé antérieurement chez des bactéries pathogènes pour l'Homme telles que *S. Typhimurium* [767], *Mycobacterium tuberculosis* [768] et *Moraxella catarrhalis* [706], ainsi que chez le microorganisme eucaryote *Saccharomyces cerevisiae* [769]. Par exemple, les gènes de *S. Typhimurium* induits durant l'infection de macrophages [478] incluent peu de gènes également impliqués dans la virulence au sein du poulet, du porc et/ou du bovin [770]. Par ailleurs, les gènes de *Mycobacterium tuberculosis* exprimés spécifiquement dans la souris [771] sont significativement dissociés de ceux essentiels pour infecter cet hôte murin [772]. De plus, le profil des gènes bactériens sur-régulés au cours de l'infection de macrophages par *Mycobacterium tuberculosis* [773] ne corrèle que très peu avec ceux contribuant à sa viabilité intracellulaire [658], tel que constaté ici avec *S. Typhi*. Chez *Mycobacterium tuberculosis*, une quantité significative de gènes requis pour la survie intracellulaire optimale seraient exprimés constitutivement par le métabolisme bactérien. Cela dit, cette absence de régulation spécifique dans les macrophages les exclurait des gènes du transcriptome induits pendant l'infection. Il est également possible que la régulation soit exercée au niveau des protéines, ce qui permettrait une activation et mobilisation plus rapide des complexes peptidiques requis pour les divers mécanismes de virulence [658]. De tels modes de régulation post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles illustrent bien comment un gène essentiel dans une condition particulière n'apparaît pas induit au niveau du transcriptome obtenu dans cette même condition. Cependant, la situation inverse où l'on dénote un gène exprimé au sein d'une condition qui est à la fois sans implication pour le bon fonctionnement de la bactérie est plus difficile à concevoir. Une étude sur *Saccharomyces cerevisiae* a révélé un manque de corrélation entre les gènes exprimés et ceux essentiels à la croissance de cette levure dans divers milieux de culture. Les auteurs spéculent qu'un vaste

assortiment de gènes pourrait être induit lorsqu'en conditions environnementales hostiles, mais que seule une faible portion serait véritablement utile en réponse au stress [769]. Cela pourrait parallèlement être le cas chez *S. Typhi* au sein des macrophages dans notre modèle d'infection. Les travaux de Bumann et collègues décrits plus haut proposent également une redondance fonctionnelle à l'égard des réseaux métaboliques activés par *Salmonella* durant l'infection. Ces auteurs constatent que la majeure partie des enzymes de ces réseaux sont en fait dispensables pour la virulence bactérienne [764]. Quoi qu'il en soit, les gènes impliqués dans la survie intracellulaire de *S. Typhi* ne semblent pas être activés spécifiquement à 24 h post-infection, mais pourraient déjà avoir été induits lors de l'entrée dans la cellule ou à un moment précoce de l'infection. Par ailleurs, l'utilisation d'une librairie de mutants d'insertions par Tn, telle qu'employée dans notre stratégie de criblage, présente certains inconvénients qui se doivent d'être mentionnés. Effectivement, le Tn peut provoquer des effets polaires sur l'expression des gènes situés en aval et plus rarement, l'insertion peut produire des transcrits qui interfèrent avec l'expression de gènes en amont (faux positif) [34]. D'autre part, la carence chez un mutant d'insertion peut être complétée *en trans* grâce au produit du gène fonctionnel provenant d'un autre mutant de la librairie (faux négatif) [659]. En conclusion, le contraste remarquable entre les résultats d'infection recueillis ici et les données transcriptomiques de Faucher *et al.*[626] démontre la complémentarité des deux approches et reflète la nature complexe de l'interaction qui existe entre *S. Typhi* et le macrophage de son hôte spécifique.

Une autre approche à haut débit utilisée dernièrement pour identifier les gènes de virulence chez *S. Typhi* consiste à trouver les antigènes immunogéniques produits par la bactérie *in vivo*, notamment dans le sang de patients malades [543,697,698]. Parmi la multitude de protéines détectées au contact d'anticorps provenant d'individus atteints de fièvre typhoïde, on note la présence de CdtB, AcrA, PagC, PflB, *STY1364*, ainsi que des composantes des opérons fimbriaires *bcf*, *csg*, *stb* et de l'îlot CS54 qui se rattachent aux gènes sélectionnés ici dans les

macrophages humains (Tableau VI). De plus, les produits bactériens réagissant au sérum d'individus colonisés cette fois par *S. Paratyphi A* comprennent entre autres des membres des opérons fimbriaires *bcf* ainsi que *stc* [774], et ces deux structures sont également représentées au sein des gènes identifiés chez *S. Typhi* dans les macrophages humains (Tableau VI). Ces évidences suggèrent ensemble un apport significatif de la part de ces protéines et structures de surface au cours de l'infection systémique par *S. Typhi*.

4.5 – Résultats en lien avec le phénotype de mutants chez *Salmonella*

4.5.1 – Interprétation des données expérimentales

À l'aide de bibliothèques de mutants et de biopuces d'ADN, les stratégies de sélection négative permettent de sonder le génome d'un pathogène d'intérêt exerçant un effet direct sur la viabilité du microorganisme lors d'une condition *in vitro* ou *in vivo* quelconque. Cette approche systématique a permis ici de cibler 130 gènes chez *S. Typhi* potentiellement utiles pour l'infection du macrophage humain, qui ensemble représentent 13 classes fonctionnelles (Figure 7).

À la suite du processus de sélection, des séquences candidates provenant de cinq classes fonctionnelles ont été examinées de plus près, par la création de 28 mutants isogéniques de délétions définies et l'évaluation subséquente de leurs compétitivité et infectiosité chez le modèle cellulaire. Ces expériences de caractérisation ont mené à l'identification de multiples gènes chez *S. Typhi* impliqués dans l'interaction avec le macrophage humain, dont plusieurs sont sans association antérieure avec la virulence de *S. enterica*. En effet, 35 phénotypes défectueux au niveau de l'entrée ou de la survie intracellulaire ont été attribués pour la première fois ici aux gènes analysés dans cette étude (Tableau VII). Notamment, 26 des 28 mutants définis se sont montrés significativement moins compétitifs que la souche sauvage lors de l'internalisation, de la survie ou au cours

de ces deux processus d'infection des cellules (Figure 9). Cette cohésion entre la compétitivité compromise des mutants créés et les données des biopuces corroborent les prédictions révélées par la stratégie de sélection et démontrent la fiabilité de la méthode choisie. Les essais de complémentation confirment que les défauts de compétitivité sont associés directement à l'inactivation de la séquence en question, à l'exception de *waaQGP* à l'entrée et *STY1398* durant la survie intracellulaire (Tableau VIII). Les raisons derrière ces manques de complémentation sont possiblement reliées à un déséquilibre du nombre de copies plasmidiques chez les bactéries complémentées. Dans certains cas, une quantité anormalement élevée du produit du gène complémenté peut exercer un effet néfaste ou toxique envers la bactérie. Ainsi, la production surélevée des protéines Waa aurait pu nuire à l'entrée dans les macrophages et trop de produits du gène *STY1398* pourraient avoir affecté la réplication intracellulaire (Tableau VIII).

Lorsque les mutants définis furent inoculés individuellement chez les macrophages en culture, un défaut significatif fut noté auprès de la moitié d'entre eux (14 sur 28), soit au cours de l'entrée et/ou de la réplication dans les macrophages (Figure 10). Il est probable que la compétition exercée lors du passage de la librairie dans les macrophages amplifie des déficiences subtiles chez certains mutants, mais que ces défauts passent ensuite inaperçus lors d'infections avec les mêmes mutants testés individuellement. Cette notion explique pourquoi les expériences de compétition se sont avérées plus sensibles que les essais individuels pour la détection de phénotypes pendant l'infection. De façon remarquable, on note une atténuation par l'ensemble des mutants d'opérons fimbriaires seulement lorsque placés sous compétition, soit au cours de l'entrée (*bcf*, *csg* et *stb*) ou pendant la phase intracellulaire (*stc*) (Figure 9). Comme expliqué plus haut dans ce manuscrit, le sérovar Typhi possède un vaste assortiment d'opérons fimbriaires dans son génome [37]. Leur impact dénoté ici seulement lors d'une infection compétitive reflète une redondance significative ou même l'existence de mécanismes compensatoires. En effet, l'inactivation d'un seul fimbria pourrait moduler l'expression de fimbriae alternatifs ou de facteurs de

colonisation supplémentaires. Comme le démontrent certaines évidences antérieures, un mutant affecté par la délétion simultanée de multiples fimbriae pourrait amplifier l'atténuation qui demeure seulement modérée lorsqu'un fimbria unique est altéré [775]. Il est toutefois notable qu'un mutant du gène *sefD* du fimbria Sef chez *S. Enteritidis* est incapable de bien internaliser les macrophages et l'inactivation de l'opéron *sef* entier atténue la virulence de la bactérie dans les souris [776]. Malgré que l'opéron *sef* est absent chez *S. Typhimurium* [36,453] et criblé de pseudogènes chez *S. Typhi* (*sefA*, *sefD* et *sefR*) [37,453], ce phénotype chez *S. Enteritidis* appuie tout de même le fait que les fimbriae peuvent, comme observer ici avec *S. Typhi*, participer à l'assimilation du macrophage par *Salmonella*. À l'opposé des mutants fimbriaires, quelques mutants ont montré une atténuation seulement lorsqu'en infection individuelle, ce qui fut le cas pour les délétions *pagC* et *gppA* au niveau de l'entrée et *STY1867-68* et *STY4842-43* lors de la croissance intracellulaire (Figures 9 et 10). Le produit de *pagC* occupe un rôle notable dans la génération de vésicules de membrane qui émanent de la cellule infectée par *S. Typhimurium* [777]. Ainsi, la production par la souche sauvage de vésicules extracellulaires contribuant à la virulence pourrait alléger la déféctuosité du mutant *pagC* au moment de pénétrer dans la cellule. Ce phénomène de complémentation *en trans* réalisé grâce au gène fonctionnel chez la souche sauvage pendant la co-infection demeure donc plausible et a été rapporté précédemment lors d'expériences de compétition [659,662]. Par ailleurs, les mutants de délétion *STY0016* et *STY1358-67* n'ont montré aucune atténuation significative lorsque testés en compétition ou individuellement (Tableau VII, Figures 9 et 10), malgré la détection de leurs gènes à la suite du criblage (Tableau VI). La détection de *STY0016* représenterait possiblement un faux positif issu d'une mutation polaire par le Tn, tel qu'expliqué plus tôt dans cette section. Par contre, la notion de faux positif n'explique pas le manque d'atténuation du mutant *STY1358-67*. L'îlot génomique inactivé comprend non seulement *STY1364* détecté lors du criblage (Tableau VI), mais également les gènes avoisinants ayant pu être affectés de manière polaire chez le mutant d'insertion. Toutefois, des passages en

série de ces mutants définis dans les macrophages en culture (comme effectués initialement avec la librairie d'insertions) seraient à considérer afin d'assurer l'absence complète de tout phénotype d'atténuation. En effet, un phénotype d'atténuation subtil qui est difficile à détecter après seulement un passage du mutant dans les macrophages peut s'exacerber à mesure que les bactéries récoltées suite à l'infection sont inoculées à nouveau chez de nouvelles cellules en culture (voir section 3.2).

4.5.2 – Support des données antérieures chez *Salmonella*

L'habileté que possède *Salmonella* à persister dans les macrophages du système immunitaire représente une voie clé vers la dissémination systémique chez l'hôte [368,382]. Le passage d'une librairie de mutants chez *S. Typhi* dans un modèle de souris humanisée a identifié *STY0016*, *STY0039*, *STY2607*, *STY4458* et *ydhO* [461] retrouvés également parmi le groupe de 130 gènes rapporté ici (Tableau VI). Par contre, la librairie chez la souche Ty2 utilisée dans ce modèle de sélection ne comptait qu'environ 2000 gènes insérés par un Tn, représentant une librairie de complexité insuffisante pour couvrir les quelque 4600 séquences codantes du génome bactérien [127]. Cela expliquerait pourquoi seulement cinq des gènes sélectionnés chez la souris se retrouvent parmi ceux identifiés dans les macrophages ici. Néanmoins, la détection de ces gènes par les deux expériences suggère une implication de leur part au sein des macrophages du SRE humain lors de l'infection systémique par *S. Typhi*.

Certains phénotypes observés en examinant les capacités d'entrée et de survie intracellulaire des mutants chez *S. Typhi* créés ici ont été notés précédemment chez *Salmonella* (Tableau VII). Au niveau du LPS bactérien de *Salmonella*, *waaG* relie la portion centrale externe (ou *outer core*) à celle interne (ou *inner core*) [778,779]. L'inactivation de *waaG* chez *S. Typhimurium* atténue sa survie intracellulaire dans les macrophages [695,696] et le même phénotype a été noté ici pour le mutant *waaQGP* chez *S. Typhi* (Figure 10). La déficience de croissance intracellulaire d'un mutant *waaG* chez *S. Typhimurium* serait associée

à une forte sensibilité aux peptides antimicrobiens à l'intérieur des macrophages [695], ce qui expliquerait parallèlement le défaut qui fut observé ici auprès du mutant chez *S. Typhi*. Par contre, la délétion de *waaQGP* chez *S. Typhi* inhiba sa capacité d'entrée dans les macrophages (Figure 10), alors que le mutant *waaG* chez *S. Typhimurium* entre davantage dans ces cellules [695,696]. Des phénotypes d'invasion cellulaire surélevée chez des mutants aux LPS tronqués ont été observés auparavant chez *S. Typhimurium* [695,780] et aussi chez la bactérie pathogène *Shigella* [781]. Le raccourcissement des LPS diminuerait leur interférence avec les SST3 à la surface de ces bactéries (notamment le SST3 du SPI-1 chez *S. Typhimurium* [780]) ce qui permettrait davantage l'accès de ces aiguilles moléculaires à la membrane eucaryote et augmenterait l'invasion cellulaire. Chez *S. Typhi*, le raccourcissement des LPS du mutant *waaQGP* pourrait abaisser leur interférence avec les sous-unités de la capsule Vi. Ainsi, la recrudescence des sous-unités à la surface bactérienne expliquerait le défaut d'entrée observé chez le mutant *waaQGP*, étant donné que la capsule Vi inhibe la phagocytose de *S. Typhi* [498,500].

Les gènes *rfbC* et *rfbI* sont tout deux impliqués dans la synthèse de l'antigène O chez *Salmonella* [782,783] et contribuèrent à la compétitivité de *S. Typhi* à l'intérieur des macrophages ici (Figure 9). Ces résultats corroborent la détection de *rfbI* révélée par passage d'une librairie de mutants chez *S. Enteritidis* dans des macrophages aviaires [784]. Un mutant de la ligase *waaL* est incapable de rattacher l'antigène O à la portion centrale externe du LPS [782] et sans cette structure à sa surface, il éprouve une faible vulnérabilité intracellulaire face aux peptides antimicrobiens du macrophage [695]. L'inactivation de *rfbI* mène également à l'absence d'antigène O à la surface [785] et donc le mutant *rfbIC* chez *S. Typhi* aurait lui aussi une vulnérabilité intracellulaire mineure face aux peptides antimicrobiens (Figure 9). L'impact du LPS dans la virulence de *S. Typhi* fut davantage démontré ici par la sélection de *waaI* et *waaK* parmi la librairie (Tableau VI). En corrélation avec ces résultats, *waaI* (également nommé *rfaI*) a été sélectionné par criblage de mutants de *S. Enteritidis* chez des macrophages [784].

Les résultats du criblage révèlent aussi la sélection de *waaL* (Tableau VI) et parallèlement, la caractérisation d'un mutant *waaL* chez *S. Typhimurium* montre une atténuation intracellulaire dans les macrophages [695,696]. Sommairement, à l'exception des effets différents médiés par les LPS de *S. Typhimurium* et *S. Typhi* au cours de l'entrée dans les macrophages, les phénotypes d'infection observés ici chez *S. Typhi* sont en concordance avec ceux rapportés précédemment chez *S. enterica*.

D'autre part, les délétions *flhCD* et *fliC* ont généré ici des défauts d'infection remarquables chez *S. Typhi* au cours de l'entrée et de la survie (Figures 9 et 10). Un mutant *fliC* chez *S. Enteritidis* est moins internalisé par des monocytes porcins [693], tel qu'observé chez *S. Typhi* dans les macrophages humains (Figure 10). Par ailleurs les loci *flgI*, *fliD*, *flhC* et *flhD* ont tous été identifiés par processus de sélection de bibliothèques de mutants dans des macrophages chez *S. Typhimurium* [368,645] ou *S. Enteritidis* [784] et supportent la présence de ces séquences parmi la liste de gènes sélectionnés ici (Tableau VI). De plus, le régulateur *ybdO* (membre de la famille *LysR* (*LysR-Type Transcriptional Regulator* ou *LTTR*) [37]) apparaît parmi les 130 gènes (Tableau VI) et certaines évidences antérieures lui associent une participation dans la virulence de *S. Typhimurium* au sein des macrophages murins [454] et dans la souris [455]. En dernier lieu, l'activité de l'arginine déiminase *STM4467* participe à la réplication du sérovar *Typhimurium* au sein des macrophages murins [786] et ce phénotype de virulence valide sa sélection ici parmi la bibliothèque d'insertion chez *S. Typhi* décrite ici (Tableau VI).

4.5.3 – Caractérisation de nouveaux phénotypes chez *Salmonella*

Les phénotypes de mutants décrits ici lèvent le voile sur plusieurs nouveaux déterminants géniques dont bénéficie la virulence de *Salmonella* (Tableau VII). On note d'abord des défauts chez le mutant *exbDB* autant à l'entrée dans la cellule qu'au sein de son compartiment intracellulaire (Figures 9 et 10). Les produits ExbD et ExbB interagissent tous deux avec TonB au sein d'un complexe qui devient transducteur d'énergie envers les protéines de transport de la

membrane externe [787]. L'inactivation de ce complexe nuirait à l'assimilation de certains substrats importants pour la viabilité bactérienne au sein du macrophage infecté, tels que les sidérophores chélatant le fer et la vitamine B₁₂ [788], ce qui ralentirait la croissance intracellulaire de *S. Typhi*. AcrA est la composante d'une pompe à efflux [789,790] qui participe à l'entrée ici, tel qu'observé chez *S. Typhimurium* [692], mais joua également un rôle important jusqu'à 24 h post-infection jamais observé précédemment chez les macrophages (Figures 9, 10 et 11). Le profilage transcriptionnel obtenu par l'inactivation de *acrA* chez *S. Typhimurium* montre une moindre expression de *phoP* [791]. Ce dernier fait partie du système *phoP/phoQ* important dans la régulation de gènes médiant la virulence au sein des macrophages [333,416] et un mutant *phoP* chez *S. Typhi* est fortement atténué dans les *THP-1* [431] tout comme le mutant *acrA* ici. Ainsi, une baisse d'expression de *phoP* expliquerait le défaut de répllication intracellulaire observé ici chez *S. Typhi* lorsque *acrA* est délété. Le lien entre *phoP* et *acrA* demeure difficile à expliquer. Les études ayant établi le régulon de *phoP* chez *E. coli* [792], *S. Typhimurium* [793] et *S. Typhi* [794] n'ont pas détecté *acrA* parmi les gènes contrôlés par ce régulateur. De plus, *phoP* et *acrA* sont chacun importants pour résister à l'action antimicrobienne de la bile [795-798], mais la voie d'activation de *acrA* déclenchée au contact de la bile fonctionne de manière indépendante par rapport à *phoP* [305]. Par ailleurs, l'inactivation de *acrA* inhibe la croissance de *S. Typhimurium* en conditions anaérobiques [791]. Comme l'intérieur de la SCV est hypoxique [799], cela pourrait rendre la survie intracellulaire plus difficile pour le mutant. Malgré une baisse de résistance du mutant *acrA* après 2 h d'exposition au DOC (mortalité de 10%), le temps passé au contact de ce détergent lors des expériences poursuivies est nettement inférieur. À titre comparatif, le taux de mortalité du mutant lorsqu'ingéré par les macrophages s'est montré bien plus élevé, atteignant même 80% (Figure 10), et donc n'est pas faussement représenté par la létalité du DOC. Le taux de répllication intracellulaire fut rétabli par complémentarité du mutant avec le gène sauvage et prouve que l'effet est attribuable à l'inactivation de *acrA* (Figures 10 et 11).

Les ORF *STY1867* et *SY1868* ne sont séparés que par environ 150 pb et l'annotation génomique semble les situer au sein d'un même opéron chez *S. Typhi*, alors que *STY1869* est transcrit en direction opposée [37]. La séquence *STY1867* encoderait une lipoprotéine de surface [37] qui pourrait servir de facteur d'adhérence pour l'entrée bactérienne dans la cellule hôte (Figures 9 et 10). Les séquences *STY1868* et *STY1869* correspondent à des protéines hypothétiques de fonction inconnue [37]. Les peptides antimicrobiens produits par le système immunitaire de l'hôte sont retrouvés dans les granules des neutrophiles, les phagosomes des macrophages et sont également sécrétés dans les muqueuses épithéliales [800]. Chez *S. Typhimurium*, l'expression de l'homologue de *STY1868* (*STM1253*) est contrôlée par le système à deux composantes *pmrA/pmrB* qui protège la bactérie des peptides antimicrobiens [800,801]. Ce gène est également régulé, tout comme *STY1869* (*STM1252*), par le système à deux composantes *preA/preB* qui lui-même induit *pmrA/pmrB* et promeut l'invasion de cellules épithéliales [802,803]. Ces évidences proposent que *STY1868* et *STY1869* chez *S. Typhi* contribuent aux mécanismes de virulence médiés par le régulon *preA/preB*, malgré que l'inactivation de *STM1253* chez *S. Typhimurium* reste dispensable pour l'infection de la souris [801].

Les gènes sélectionnés par le passage de la librairie comptent de multiples gènes associés aux SPI. Curieusement, des gènes du SPI-1 (*hilC*, *prgI*, *sipC*, *sipF*, *spaS* et *ygbA*) ont été identifiés ici dans les macrophages (Tableau VI), alors que cet îlot est généralement reconnu pour son apport important dans l'invasion des cellules épithéliales non phagocytaires [323,383]. L'inactivation de *sipF* (*iacP*) affecta la compétitivité de *S. Typhi* chez les macrophages, tant à l'entrée qu'à l'intérieur des cellules (Figure 9). Ce gène du SPI-1 contribue à l'invasion de cellules épithéliales, mais aussi à la virulence de *Salmonella* chez l'hôte infecté *in vivo* [455,804,805]. D'ailleurs, plusieurs séquences du SPI-1 ont été identifiées suite au passage d'une banque de mutants chez *S. Typhi* dans la souris humanisée [461]. Cette corrélation par rapport aux phénotypes du mutant *sipF* observés ici supporte l'idée que SPI-1 contribuerait à maintenir la propagation systémique à

travers l'hôte en équilibrant la phase extracellulaire et intracellulaire de l'infection par *Salmonella* [455], permettant ainsi à la bactérie d'effectuer un transit d'une cellule vers une autre. De plus, le criblage d'une librairie de mutants par Tn chez *S. Typhimurium* dans des macrophages murins a révélé la sélection négative de plusieurs gènes du SPI-1 (dont *hilC* et *spaS* identifiés ici également (Tableau VI). Cependant, aucun mutant défini de ces gènes n'a montré d'atténuation intracellulaire lorsque testé individuellement par rapport à la souche sauvage, à l'exception d'un mutant du régulateur *sirA* [454]. Ici, les défauts du mutant *sipF* chez *S. Typhi* se sont manifestés seulement lorsqu'en compétition (Figures 9 et 10) et donc un rôle discret peut-être associé à *sipF* auprès des macrophages infectés. Ainsi, *sipF* jouerait un rôle de plus grande envergure lors de l'invasion de l'épithélium intestinal et possiblement au sein de niches cellulaires autres que celles des macrophages. Plusieurs gènes du groupe de 130 répertoriés ici se rapportent au SPI-2, une région génomique de *Salmonella* requise cette fois pour la survie dans les macrophages et dans l'hôte infecté [335,336,414]. Les gènes de cet îlot identifiés ici incluent *ssaN*, *ssaP*, *ssaQ* et *orf408* (Tableau VI). Cependant, des résultats récoltés antérieurement au laboratoire montre que *ssaP* est dispensable pour la compétitivité de *S. Typhi* dans les cellules *THP-1* (donnée en laboratoire non publiée) et même l'inactivation de la portion génomique encodant le SST3-2 de *S. Typhi* n'affecte aucunement la survie intracellulaire dans les macrophages [431]. Cette notion corrobore d'ailleurs des résultats générés précédemment chez *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis*, montrant que le système du SPI-2 n'est pas important non plus chez une lignée aviaire [806] ni auprès de macrophages qui résident *in vivo* chez l'hôte. Ainsi, ces preuves à propos du SPI-2 questionnent sa véritable fonction de virulence, qui serait plutôt attribuable à la propagation vers de nouveaux foyers d'infection au sein des tissus de l'hôte plutôt qu'à la réplication au sein d'une seule et unique cellule [807]. Lors de l'analyse des biopuces, les intensités de signal des gènes du SPI-2 sélectionnés indiquaient des valeurs d'*input* plus élevées que la moyenne, accompagnées de valeurs d'*output* rejoignant la moyenne et toujours plus élevées que celles des gènes

sélectionnés négativement. Ces statistiques auraient donc amené ces séquences du SPI-2 à s'afficher parmi le groupe des 130 gènes sélectionnés. Les SPI-7 et SPI-10 sont deux éléments génétiques uniques à *S. Typhi* comparativement au sérovar Typhimurium [35]. Les mutants *STY4679* et *STY4842-43* créés en représentation des SPI-7 et SPI-10, respectivement, sont demeurés moins compétitifs durant l'internalisation (Figure 9). De plus, le mutant associé au SPI-10 était déficient intracellulairement lorsqu'évalué seul et cela dit, de plus amples travaux devraient être réalisés pour mieux cerner le rôle de cet îlot de virulence encore peu caractérisé dans la littérature scientifique.

Le criblage de mutants à haut débit a capté plusieurs régulateurs d'expression géniques suite à la sélection (Tableau VI et Figure 7) et des mutants *flhCD*, *mlc*, *typA* et *gppA* ont été investigués. Le gène *gppA* n'apparaît pas au sein des 130 sélectionnés, car sa valeur $P = 0.008$. Toutefois, son facteur de variation selon les biopuces indiquait une forte chute de $\log_2 \left[\frac{\text{output}}{\text{input}} \right] = -4.16$. Une atténuation dans la survie intracellulaire d'un mutant *mlc* a été observée pour la première fois ici chez *Salmonella* (Figures 9 et 10), car sa caractérisation antérieure chez *S. Typhimurium* ne montrait aucun défaut dans les macrophages et seule une baisse d'invasion des cellules épithéliales fut remarquée [808]. Ce régulateur global du métabolisme des carbohydrates module l'expression d'une panoplie de gènes [809-811] dont l'îlot de virulence SPI-1 [808]. Comme *mlc*, le locus de régulation flagellaire *flhCD* induit aussi le SPI-1 et sa délétion chez *S. Typhi* compromet significativement l'entrée dans les cellules épithéliales [812]. Alors que des mutants *flhD* et *fljB fliC* chez *S. Typhimurium* se répliquent davantage que la souche sauvage dans les macrophages murins [525], les mutants *flhCD* et *fliC* créés ici chez *S. Typhi* révèlent de nouveaux phénotypes de survie déficiente, ainsi qu'une divergence dans le rôle des flagelles au niveau de la viabilité intracellulaire de ces deux sérovars (Figures 9 et 10). Il est possible que chez *S. Typhi*, plusieurs gènes assurant la croissance optimale dans les macrophages soient sous l'effet de *mlc*, ainsi que de *flhCD*, et donc une meilleure analyse de leurs régulons chez *S.*

Typhi est susceptible de mettre en lumière plusieurs nouveaux facteurs de virulence intracellulaires importants. L'inactivation de *typA* a compromis ici l'internalisation dans les macrophages et la compétitivité lorsqu'à l'intérieur (Figures 9 et 10). Une GTPase traductionnelle nommée également *bipA* [813], *typA* est reconnu par son apport à la virulence d'*E. coli*, ainsi qu'à la résistance aux peptides antimicrobiens par cette bactérie et *S. Typhimurium* également [814-816]. On lui confie un rôle possible dans la persistance de *S. Typhimurium* auprès d'un modèle d'infection chronique [455], mais une fonction reliée au contact de *Salmonella* avec le macrophage lui est nouvellement attribuée dans cette étude. Enfin, *gppA* est une enzyme convertissant la guanosine pentaphosphate (pppGpp) en guanosine tétraphosphate (ppGpp) dans la bactérie hôte [817,818] et ces deux molécules modulent l'activation de la réponse stringente [819]. L'altération de cette voie signalétique nuit à l'invasion et à la survie des sérovars Typhimurium et Gallinarum dans les macrophages [820-822]. Ainsi, le manque de compétitivité (Figure 9) et d'infectiosité (Figure 10) de la part du mutant chez *S. Typhi* est sans doute mené par une réponse stringente détériorée. Ces phénotypes d'atténuation ont permis de cibler une nouvelle enzyme contribuant à l'adaptation de *Salmonella* au sein des macrophages infectés.

4.6 – Perspectives et ouvertures du projet

4.6.1 – Fonctionnalité des pseudogènes

Un aspect notable caractérisant les sérovars spécifiques à l'être humain qui provoquent chez l'hôte une fièvre entérique, tels que *S. Typhi* et *S. Paratyphi*, demeure le nombre élevé de pseudogènes contenu dans leurs génomes par rapport aux sérovars généralistes [36,117,127]. Tout comme les opérons fimbriaires, les plasmides de virulence, les prophages et les gènes appartenant aux SPI, on propose que les pseudogènes jouent un rôle important envers la spécificité et la restriction d'hôte de la bactérie [389,396]. Chez les sérovars associés à la fièvre entérique, ces pseudogènes contribueraient particulièrement à l'adaptation au sein de leur

hôte humain [37,117]. Communément retrouvés dans les chromosomes des multiples sérovars de *Salmonella*, les pseudogènes sont souvent créés par insertions ou délétions qui génèrent ainsi un décalage du cadre de lecture (ou *frameshift*) ou une mutation non sens formant un codon d'arrêt prématuré au sein d'un ORF [117]. Historiquement, les pseudogènes ont été perçus comme évoluant de manière strictement neutre, façonnés par des mutations aléatoires et événements relevant de la chance [823]. Cependant, les pseudogènes chez les bactéries se font retirer du génome plutôt rapidement, tel que démontré auprès de *Salmonella* chez qui les gènes non sélectionnés sont hâtivement inactivés et éliminés par mutations menant à leur délétion [86,117,128,824]. Les pseudogènes peuvent potentiellement exercer des effets délétères sur la viabilité qui sont reliés au coût énergétique de la transcription et traduction continues de ces gènes non fonctionnels ou même à la production de protéines toxiques pour la bactérie [135]. En concordance avec cette idéologie, les pseudogènes retirés des génomes de *Salmonella* au cours de l'évolution sont effectivement ceux les plus transcrits (et également les plus associés à d'autres gènes au sein de réseaux génétiques) [135]. Le transcriptome de *S. Typhi* en milieu riche généré par la récente technologie de séquençage à haut débit d'ADNc révèle une forte transcription de la part de neuf pseudogènes, avec une absence d'expression par le reste d'entre eux. Cela indiquerait l'expression par ces pseudogènes de protéines ou d'ARN dotés de domaines fonctionnels potentiels [136]. Les auteurs de l'étude ont également détecté la production d'une protéine associée à la séquence en amont du codon d'arrêt dans le pseudogène *hsdM*. Ce dernier est associé étroitement avec *hsdR* et *hsdS* du système de restriction/modification de type I [724]. Le locus *hsdS* (*STY4881*) compte d'ailleurs parmi les 130 gènes de *S. Typhi* sélectionnés ici au sein des *THP-1* (Tableau VI) et fut également identifié par le criblage d'une librairie de mutants d'insertion chez *S. Typhimurium* auprès de macrophages murins [454]. Il fut envisagé de créer un mutant Δ *hsdS* chez la souche ISP1820 de *S. Typhi* pour caractériser davantage le rôle de ce gène pendant l'infection. Cependant, une des deux régions adjacentes au gène a été impossible à amplifier par PCR et a

empêché l'obtention de matériel génétique nécessaire pour la technique de mutagenèse dirigée sollicitée dans cette étude. En principe, les séquences annotées comme pseudogènes peuvent tout de même exprimer des protéines fonctionnelles amputées, tel que démontré chez la cytotoxine tronquée de la bactérie *Chlamydia trachomatis* [825,826]. Le criblage de la librairie de mutants chez *S. Typhimurium* dans les macrophages murins n'a sélectionné qu'un seul pseudogène, soit la séquence *STM3844* [454] encodant une intégrase putative sans homologue chez *S. Typhi* [36], alors que le criblage ici chez *S. Typhi* en a identifié davantage (Tableau VI). *S. Typhimurium* ne comporte qu'une quarantaine de pseudogènes alors que *S. Typhi* en possède environ 200 et les génomes de ces sérovars sont sensiblement de la même taille [36,37]. Les 130 gènes identifiés ici comprennent 10 pseudogènes, selon le génome séquencé et annoté de la souche CT18 de *S. Typhi* [37]. Ceux-ci comprennent *STY0329*, *ybbW*, *orf408*, *STY2432*, *STY2469*, *STY2501*, *STY2504*, *sinH*, *siiE*, *yjfJ* (Tableau VI). Parmi ceux-ci, les îlots de pathogénicité dont font partie *sinH* et *siiE* ont été délétés au complet chez la souche ISP1820 de *S. Typhi*, générant les mutants définis Δ CS54 et Δ SPI-4, respectivement (Tableau VII). L'îlot CS54 est dégradé par plusieurs pseudogènes chez *S. Typhi* [37], dont *sinH* qui encode une protéine de membrane externe putative qui contribue à la colonisation par *S. Typhimurium* des Plaques de Peyer dans l'iléon terminal et des tissus intestinaux chez la souris [488]. Le mutant CS54 a montré un défaut pendant l'internalisation au sein des macrophages (Tableau VII). Il est possible que cette région génomique promeuve l'accès aux macrophages pour ainsi atteindre les foyers d'infection systémiques, comme l'indique la détection de l'adhésine ShdA [487] dans le sang de patients infectés par *S. Typhi* lors de la fièvre typhoïde [543]. De manière similaire, la séquence de l'adhésine géante SiiE du SPI-4 contient un codon d'arrêt chez *S. Typhi* [37,127] qui la sépare en deux ORF et la catégorise donc comme pseudogène non fonctionnel chez ce sérovar. Des atténuations lors de l'entrée et même la survie ont été déterminées chez le mutant SPI-4 de *S. Typhi* lors des infections de macrophages (Tableau VII). En participant à l'adaptation au sein de la niche

intracellulaire des macrophages, cet îlot de pathogénicité encodant un SST1 associé à l'adhésine contribue potentiellement à l'infection des tissus systémiques. En support à cette notion, *STY4458* fut sélectionné négativement lors du criblage de mutants par Tn chez *S. Typhi* au sein de souris humanisées [461] et également dans les macrophages *THP-1* infectés avec la banque d'insertions ici (Tableau VI). L'ORF *STY4458* représente la séquence de *siiE* en amont du codon d'arrêt de ce pseudogène [37,127]. Cependant, il se pourrait également qu'une erreur d'annotation ait faussement classé *siiE* comme pseudogène chez *S. Typhi*, comme ce fut le cas auprès d'une deuxième grosse protéine nommée BapA provenant du SPI-9. La séquence de celle-ci fut initialement annotée comme pseudogène chez *S. Typhimurium* [36,275], mais on la rectifia pour une séquence fonctionnelle lors d'une future analyse [469].

Chez *S. Typhi*, les opérons fimbriaires comptent un taux important de pseudogènes (14% comparativement à la moyenne du génome entier de 4.4%) [131]. Effectivement, les fimbriae *bcf*, *fim*, *saf*, *sef*, *ste*, *stg*, *sth* et le pilus de type IVB *pil* possèdent du moins un pseudogène au niveau des séquences associées à leur structure et fonctionnement [37,453]. Des évidences obtenues au sein du laboratoire ont associé un rôle au fimbria Stg de *S. Typhi* (absent chez *S. Typhimurium*), dont *stgC* encodant la protéine chaperonne putative est interrompu par un codon d'arrêt interne et donc est annoté comme pseudogène [37,453]. En effet, *stgC* qui est exprimé intracellulairement par *S. Typhi* au sein des macrophages humains *THP-1* [628], démontre une implication au niveau de l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales humaines et lors de l'entrée dans les macrophages humains [544]. Similairement, des rôles fonctionnels ont été antérieurement associés à des opérons fimbriaires renfermant des codons d'arrêt prématuré [827-830]. Les expériences présentées ici ont identifié une contribution de la part du fimbria Bcf de *S. Typhi* dans l'entrée chez les macrophages humains (Tableau VII), dont *bcfC* est classifié comme pseudogène chez ce sérovar dû à deux codons d'arrêt [37,127,453] et dont la sous-unité structurale BcfD est détectée dans le sang de patients atteints de fièvre typhoïde [698].

La suite de cette étude visera une meilleure analyse de la contribution des pseudogènes lors de l'infection des macrophages humains, notamment l'identification des allèles fonctionnels et le mode de reprogrammation employé pour poursuivre le bon cadre de lecture. Au sein de notre laboratoire, des expériences suivant cette optique sont actuellement en cours de réalisation auprès de certains pseudogènes. Bien évidemment, cela demeure une tâche fastidieuse à entreprendre, puisqu'investiguer l'activité résiduelle ou altérée des pseudogènes demande d'abord une connaissance de la fonction de la protéine en question ou des domaines peptidiques requis pour assurer cette fonction, des informations qui ne sont pas toujours disponibles au chercheur [127].

4.6.2 – Souches vivantes atténuées en vaccinologie

La bactérie *S. Typhi* est responsable d'une pathogenèse énigmatique auprès de son hôte unique, l'être humain, chez qui la fièvre typhoïde développée demeure encore une maladie négligée à travers le globe. Des souches multirésistantes aux drogues et antibiotiques sont de plus en plus fréquentes dans les pays développés et en développement, dont certains cas sont même rapportés en Amérique du Nord [831-833], amenant la troublante possibilité de voir réémerger une typhoïde non traitable [190]. Une manière efficace de contrôler ce problème est d'immuniser les populations grâce à un vaccin contre la maladie. En ce moment, deux vaccins contre la fièvre typhoïde sont licenciés dans le monde : le vaccin à base d'antigène Vi purifié et le vaccin vivant atténué Ty21a, lesquels sont chacun d'efficacité modérée. Le vaccin vivant est fortement immunogénique, mais nécessite la prise de 3 à 4 doses pour exercer son plein effet [212]. En général, une souche vaccinale atténuée est une version viable du pathogène lui-même, ou d'une espèce étroitement apparentée, dont la virulence est atténuée. La plupart des souches vaccinales atténuées ayant vu le jour chez *Salmonella* ont été créées par délétion de gènes importants appartenant aux voies métaboliques, aux îlots de pathogénicité ou aux régulateurs globaux [165]. Le défi principal rencontré lors de la création

d'un vaccin demeure l'obtention d'une souche suffisamment immunogénique, mais également sécuritaire chez l'hôte [834,835].

La recherche visant à créer un nouveau vaccin d'efficacité optimale contre *S. Typhi* est entravée par la stricte spécificité d'hôte humain de ce pathogène. Cela nuit à l'obtention d'un modèle animal pratique (autre que les primates supérieurs) pour étudier la pathogenèse de *S. Typhi* et évaluer l'efficacité de souches vaccinales. Récemment, une série de modèles de souris humanisées ont été développés qui permettent d'infecter l'hôte avec *S. Typhi* [461,598-600]. Un des modèles créés par élimination du TLR-11 chez la souris (qui reconnaît la flagelline de *S. Typhi* et rend cet hôte murin résistant à l'infection) peut être vacciné par *S. Typhi* inactivé à la chaleur, médiant une protection contre une nouvelle infection par ce sérovar [600]. Ce modèle demeure attrayant pour vérifier l'impact immunologique de souches vivantes atténuées. Les gènes impliqués dans les macrophages humains identifiés dans cet ouvrage mettent en lumière de nouvelles composantes potentiellement utiles à cibler pour atténuer la virulence de *S. Typhi* dans son hôte. Ainsi, les résultats générés ici offrent la possibilité de créer des souches vaccinales améliorées contre la fièvre typhoïde, dont l'immunogénicité et la sécurité pourraient d'abord être optimisés auprès du modèle de souris humanisée *tlr11^{-/-}*, préalablement à l'évaluation auprès de volontaires humains. D'ailleurs, le groupe de recherche de Rubin ayant développé la stratégie de sélection négative TraSH [656] sollicitée ici (Figure 5) s'engagea justement avec l'idée de créer des souches vaccinales d'efficacité supérieure protégeant davantage contre l'agent pathogène *Mycobacterium tuberculosis* [836]. De plus, d'autres stratégies sélectives chez des banques de mutants ont mené avec succès vers des gènes candidats à inactiver pour la construction de souches vaccinales conférant une protection contre *Salmonella* et plusieurs autres bactéries virulentes [659,837]. La technique de sélection négative TMDH utilisée avec une librairie de mutants chez *S. Typhimurium* a identifié deux mutants efficaces pour protéger la souris contre l'infection par la souche sauvage [659]. Ces souches vaccinales comprenaient des mutants des gènes *trxA*, encodant la thioredoxin 1, et *atpA*, une

sous-unité d'enzyme de chaîne respiratoire translocative de protons [838,839]. D'ailleurs, la croissance intracellulaire du mutant *trxA* au sein des macrophages est déficiente [839] et donc les mutants atténués dans les macrophages représentent de bons candidats lorsqu'à la recherche de souches atténuées et immunogéniques chez l'hôte. Les techniques de criblage de mutants à haut débit, comme celle choisie dans ce projet, s'avèrent donc une approche tout à fait appropriée pour contribuer au développement de thérapies vaccinales contre des pathogènes comme *S. Typhi*.

Dans le but de mieux caractériser les 130 gènes identifiés dans cette étude, un mutant Δ *leuO* (STY0134; Tableau VI) chez *S. Typhi* a dernièrement été créé au laboratoire de cette étude. LeuO est décrit comme un membre de l'opéron leucine chez *S. Typhimurium* [840] et représente un régulateur transcriptionnel de la famille *LysR* [841]. À l'aide de molécules inductrices, les régulateurs de cette famille activent l'expression de divers gènes et régulons en reconnaissant des motifs consensus spécifiques d'ADN [842]. Jusqu'à présent, des effets activateurs et répresseurs ont été associés à la régulation par LeuO de plusieurs gènes impliqués dans des processus liés au transport, à la régulation, au métabolisme, à la détoxification, à la virulence et à la réponse au stress [455,843-849]. Ces exemples reflètent l'importance vitale de LeuO en conditions retrouvées chez l'hôte pendant l'infection par plusieurs bactéries pathogènes dont *Vibrio cholerae*, les *Yersinia* pathogènes, *S. Typhimurium*, *S. Typhi* et *E. coli* [850]. D'ailleurs, une des cibles activées par le régulateur LeuO est la protéine de membrane externe encodée par *ompN* (*ompS2*) [851], dont la mutation ici chez *S. Typhi* a mené à un défaut de compétitivité intracellulaire dans les macrophages (Figure 9). Lorsque testé dans le cadre d'expériences d'infection de macrophages humains *THP-1* comme celles décrites ici, le mutant *leuO* n'a montré aucun défaut d'infection par rapport à la souche sauvage (données non montrées). La mutation de *leuO* n'apporterait donc qu'un phénotype d'atténuation discret qui n'a pu être détecté que lors de la sélection compétitive de la librairie de mutants d'insertion au sein des macrophages. Cependant, *leuO* est sous le contrôle négatif du répresseur

global H-NS, mais la surproduction de LeuO *en trans* permet de contourner cette répression et d'observer des phénotypes de *leuO* qui sont autrement cryptiques [852-855]. Une récente analyse par ChIP chez *S. Typhimurium* a révélé de manière globale 178 séquences génomiques liées par LeuO lorsqu'en croissance en milieu minimal faible en phosphate (*Minimal Low-Phosphate Medium* ou LPM), ce qui reproduit les conditions retrouvées intracellulairement dans les macrophages infectés. De plus, les auteurs de l'étude ont identifié 331 séquences chromosomiques liées lors d'une surexpression de *leuO* inductible à l'arabinose par un système P_{BAD} [856]. Il a alors été envisagé de suractiver l'expression du gène au lieu de l'inactiver par délétion. Pour obtenir un système de surexpression du gène *leuO*, le plasmide pBAD18-Cm [857] pour l'induction/répression modulable de gènes a été utilisé dans la souche sauvage ISP1820 de *S. Typhi*. Dans ce plasmide, le gène sauvage *leuO* provenant de *S. Typhi* a été placé, sans son promoteur natif, sous le contrôle du promoteur P_{BAD} induit par l'arabinose et réprimé par le glucose. Au laboratoire de la présente étude, quelques expériences préliminaires d'infection de macrophages humains *THP-1* en culture ont été poursuivies avec cette souche transformée de *S. Typhi*. L'induction de *leuO* sur le plasmide fut réprimée pendant la croissance *in vitro* préalablement à l'inoculation et ensuite activée spécifiquement pendant l'inoculation grâce à l'ajout d'arabinose au milieu de culture cellulaire. Ce sucre régulateur fut maintenu tout au long des 24 h de passage intracellulaire de la bactérie. De manière intéressante, une perte accrue de survie de la bactérie au sein des cellules a été notée lors de l'induction spécifique de *leuO* au courant de l'infection (données non montrées). Cette mortalité de *S. Typhi* pendant le passage intracellulaire n'est pas observé lorsque les bactéries sont inoculées dans du milieu de culture cellulaire avec arabinose seul (sans macrophages) et ni lorsqu'on procède à l'infection sans ajout d'arabinose dans le milieu. De plus, l'atténuation s'est montrée spécifique à *leuO*, puisque l'induction d'un autre gène de régulation globale (tel que *mlc*) ou de structures de surface comme celles de fimbriae ne s'est pas montrée délétère pour la viabilité intracellulaire comme le fut *leuO* (données non montrées). De plus amples études

sur la régulation exercée par *leuO* pendant l'infection de macrophages par *S. Typhi* offriront la possibilité de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en branle lors de l'interaction avec ces cellules.

L'utilisation d'un système de surexpression de *leuO* chez l'hôte représente une approche vaccinale prometteuse. Par exemple, une surexpression stable de LeuO pourrait être réalisée en plaçant son gène sous le contrôle d'un promoteur normalement fortement activé dans les tissus de l'hôte. Une telle approche utilisant un promoteur inductible *in vivo* a été adoptée auparavant pour forcer l'expression de la sous-unité Vi dans des organes où la production de la capsule est habituellement réprimée. Cette stratégie a permis de stimuler adéquatement le système immunitaire de l'hôte en y développant une réponse humorale avec production d'anticorps reconnaissant Vi [858]. D'une part, il est possible que l'induction artificielle de *leuO* dans les macrophages amène la répression anormale et donc l'absence d'expression de gènes impliqués intracellulairement, créant ainsi une souche vivante atténuée d'utilité thérapeutique et clinique. À l'opposé, il est possible qu'une surexpression artificielle de *leuO* provoque l'assemblage inhabituel de composantes peptidiques normalement absentes à la surface de la bactérie qui la rendent plus vulnérable ou plus reconnaissable à l'intérieur du macrophage, et l'expression inusitée de ces antigènes offre l'opportunité de stimuler l'immunité anti-*Salmonella*. La possibilité de créer des souches vaccinales immunogéniques par surexpression d'appareillages de surface, tels que la flagelline chez *Salmonella* par exemple [859], a été réalisée récemment grâce à une technique nommée *Attenuating Gene Expression* (AGE) [860]. Cette méthode exploite l'effet atténuant robuste sur la virulence que peut avoir l'expression de structures de surface normalement régulées de manière très stringente, telles que les pili, flagelles, fimbriae, systèmes de sécrétion ou capsules. Cette approche offrira sans aucun doute plusieurs nouvelles opportunités pour le développement futur de thérapies préventives contre plusieurs maladies infectieuses [861].

4.6.3 – Les gènes d’antivirulence

Les pathogènes tels que *Salmonella* possèdent des gènes de virulence leur permettant de se répliquer au sein des environnements retrouvés chez l’hôte, comme à l’intérieur des macrophages tel qu’observé dans les expériences ici. Paradoxalement, les pathogènes peuvent également porter des gènes qui réduisent leur virulence. L’inactivation de ces gènes d’antivirulence peut par exemple abaisser la dose létale médiane (*Median Lethal Dose* ou LD₅₀) de la bactérie et/ou augmenter sa croissance durant l’infection de l’hôte, tel que noté lors d’analyses auprès de *Salmonella* [689,862,863]. Cependant, les fonctions et contributions pouvant être attribuées à ces gènes d’antivirulence chez le pathogène demeurent difficiles à bien saisir. De multiples hypothèses ont été formulées dans le but de mieux expliquer le phénomène d’antivirulence et comprendre pourquoi les pathogènes auraient conservé ces facteurs dans leurs génomes.

Pour certains pathogènes, le contrôle de la virulence *in vivo* permettrait une meilleure survie à long terme dans l’organisme, qui conséquemment augmenterait les chances de transmission de la bactérie d’un hôte à l’autre. Cette notion serait extrêmement importante pour des bactéries n’occupant qu’un seul réservoir ou qui demande une interaction constante avec leur hôte pour leur propagation continue [864], tel que le pathogène *S. Typhi* spécifique à l’organisme humain. D’autre part, les gènes d’antivirulence pourraient avoir été conservés grâce à la facilité de croissance qu’ils procurent au microorganisme dans l’environnement retrouvé hors de l’hôte. Cela dit, conserver ces gènes serait plus avantageux que la simple possibilité d’amplifier la virulence en les éliminant du génome [862]. Quelques gènes d’antivirulence ont été répertoriés précédemment chez *S. Typhimurium*. Par exemple, *gvrA* est inséré dans le phage *Gifsy-2* [399] et son inactivation rend la bactérie hypervirulente chez la souris infectée [865]. La dipeptidase D-Ala-D-Ala périplasmique PcgL permet à *S. enterica* de croître sur D-Ala-D-Ala comme unique source de carbone et sa mutation donne à la bactérie un phénotype d’hypervirulence chez la souris *slc11a1*^{+/+} [862]. De plus, la voie *zir*

chez laquelle ZirS, ZirT et ZirU interagissent ensemble compose un système de protéines de la superfamille des immunoglobulines aux propriétés adhérentes, qui modulerait l'antivirulence chez l'hôte en atténuant la colonisation et la migration bactérienne vers des sites d'infection systémique [866,867]. Lorsqu'exprimé chez *S. enterica*, *lacI* est un gène d'antivirulence qui interfère avec l'expression de gènes de virulence du SPI-2 et il fut éliminé chez cette espèce pendant l'évolution, malgré sa présence auprès des bactéries étroitement apparentées *S. bongori* (où il semble être un pseudogène par contre) et *E. coli* [868]. Par ailleurs, le régulateur global encodé par *lrp* coordonne l'antivirulence, puisque sa délétion amplifie l'invasion et la cytotoxicité cellulaire en plus de rendre *Salmonella* hypervirulent chez la souris [869]. Quant à lui, le gène *pnp* de l'exoribonucléase polynucléotide phosphorylase, qui joue un rôle central pendant la croissance bactérienne à faible température [870], atténue la virulence auprès des souris inoculées. Sa mutation chez *Salmonella* augmente l'expression des gènes *spv* du plasmide pSLT et donc avantage la souche pendant l'infection de l'hôte murin [871].

Pour explorer le concept d'antivirulence au sein de ce présent projet d'étude, l'analyse des données d'hybridation des biopuces a été poursuivie davantage afin de vérifier la présence de mutants d'insertion chez *S. Typhi* potentiellement hypervirulents dans les macrophages humains. Ainsi, à l'inverse du filtre utilisé pour l'identification des mutants d'insertion atténués dans les macrophages, un seuil respectant un ratio *input* : *output* de 1 : 4 représenté par une valeur de $\log_2 \left[\frac{\text{output}}{\text{input}} \right] \geq 2$ et une valeur $P < 0.0005$ a été appliqué aux intensités de signal recueillies. Un total de 163 gènes a été retenu grâce à ces critères de sélection (données non montrées), mais aucun d'entre eux n'a été reconnu antérieurement comme locus médiant l'antivirulence chez *Salmonella*. Quelques gènes se sont retrouvés sur-représentés lors d'expériences criblant des bibliothèques de mutants chez *S. Typhimurium* réalisées auprès de macrophages de souris [689] et au sein d'un modèle d'infection murin [662]. En corroboration à ces analyses, des phénotypes d'antivirulence ont pu être attribués à certains de ces gènes, tels

qu'observés auprès d'un mutant *sciS* (homologue au gène de virulence *icmF* chez *Legionella pneumophila* [872,873]) qui se réplique plus activement intracellulairement que la souche sauvage et qui est plus létal pour la souris infectée [689]. D'autre part, un mutant de la séquence *oxyS* encodant un sRNA membre du régulon OxyR impliqué dans la réponse au stress oxydatif [874,875] a été testé et un comportement d'hypervirulence chez la souris a été observé vis-à-vis cette souche [662]. L'identification de gènes d'antivirulence offre des applications avantageuses au niveau du développement de vaccins vivants atténués chez *Salmonella*. L'invasion hyperactive de cellules par un mutant de délétion *lrp* mentionnée plus haut en est un exemple. Les modifications génétiques atténuantes pour la création d'une souche vaccinale potentielle visent à rendre la bactérie sécuritaire pour l'Homme et l'animal. Cependant, ces atténuations peuvent en contrepartie réduire la capacité d'internalisation de la souche vaccinale au sein des cellules clés de l'organisme qui déclenchent une réponse immunitaire adéquate menant à une mémoire immunologique envers le pathogène. L'introduction d'une mutation auprès de *lrp* chez une souche vaccinale trop atténuée pour stimuler adéquatement l'immunité pourrait rendre cette dernière davantage immunogénique. En effet, l'invasion hyperactive générée par l'inactivation de *lrp* [869] pourrait augmenter l'accès de la souche vaccinale au sein des cellules présentatrices d'antigènes (par exemple, les cellules dendritiques et les macrophages) [695] dont le rôle est primordial pour le développement de l'immunité acquise.

CHAPITRE 5 – Conclusions

Les génomes de multiples sérovars de *Salmonella* ont déjà été séquencés et annotés, mais malgré ces avancées remarquables, environ la moitié des gènes de cette bactérie demeurent encore sans phénotype défini dans l'environnement qu'elle occupe [34]. Chez l'Homme, la pathologie la plus sévère générée par *Salmonella* demeure sans contredit la fièvre typhoïde, une maladie infectieuse provoquée par le sérovar Typhi qui afflige encore une portion significative de la population mondiale, malgré la présence de deux vaccins licenciés [185,193]. Dans l'hôte humain, *S. Typhi* doit survivre à l'intérieur des macrophages afin d'atteindre les organes du SRE et se répliquer au sein de ces foyers d'infection systémique [294,382]. La persistance au sein des macrophages est donc un processus inévitable pour la propagation de *Salmonella* au-delà de l'intestin [368], mais les mécanismes sollicités par ce pathogène pour interagir avec ces cellules du système immunitaire et y survivre intracellulairement tardent encore à être tout à fait bien définis.

Les expériences présentées dans cet ouvrage offrent justement une meilleure connaissance des facteurs génétiques bénéfiques pour la bactérie lors de son internalisation et sa croissance au sein des macrophages infectés. Alors que la plupart des études antérieures se sont penchées sur la virulence de *S. Typhimurium* dans des modèles cellulaires et murins, la présente analyse a fait intervenir ici *S. Typhi*, le sérovar spécifiquement adapté à l'organisme humain. Ainsi, les gènes non essentiels de *S. Typhi* ont été criblés parallèlement à haut débit, par le passage en série d'une librairie de mutants d'insertion au sein d'une lignée de macrophages humains en culture. Les mutants sélectionnés négativement à la suite des trois passages de 24 h ont révélé une série de 130 gènes potentiellement impliqués dans l'infection des cellules, comprenant plusieurs séquences uniques à *S. Typhi* (absente chez *S. Typhimurium*) et même certains annotés comme pseudogènes. Ces gènes ont ensuite été catégorisés en 13 groupes et les classes fonctionnelles

sur-représentées ont guidé la création de 28 mutants isogéniques de délétions définies chez *S. Typhi*. Ces derniers ont été caractérisés un à un pour évaluer leurs capacités de compétitivité (contre la souche sauvage) et d'infectiosité (parallèlement à la souche sauvage) chez les macrophages humains, puis également pour vérifier leurs habiletés à se mouvoir et à résister au H₂O₂. À quelques exceptions près, aucun défaut notable de motilité ni de résistance au stress oxydatif n'a été décelé, mais plusieurs défauts lors de l'interaction avec les macrophages ont été remarqués. Notamment, 35 nouveaux phénotypes d'atténuation lors de l'entrée et/ou de la réplication intracellulaire se sont avérés nouvellement observés auprès des mutants testés, jamais décrits précédemment chez *S. Typhi* ou même auprès des autres sérovars de *Salmonella*. Les gènes inactivés incluaient des composantes de l'enveloppe bactérienne, des régulateurs globaux, des protéines de fonction inconnue, ainsi que des loci appartenant à des opérons fimbriaires, à divers SPI et à d'autres îlots de pathogénicité.

Les gènes et phénotypes déterminés ici permettent de mieux saisir comment la bactérie module l'environnement hostile du macrophage pour en faire une voie d'accès vers les organes systémiques. Des souches mutantes atténuées dans les cellules du système immunitaire, telles que générées ici, sont utiles en vaccinologie lorsqu'elles présentent l'opportunité de rester avirulentes chez l'hôte, tout conservant leur caractère immunogénique dans l'individu inoculé. Dans le but d'offrir un nouveau moyen thérapeutique contre la typhoïde, il serait impératif de se pencher sur ces données pour la création d'une nouvelle souche vivante avirulente, sinon pour atténuer davantage certaines souches vaccinales encore trop à risque pour l'individu en bonne santé ou immunosupprimé.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Mathers C, Fat DM, Boerma JT, World Health Organization** (2008) The global burden of disease : 2004 update. Geneva, Switzerland: World Health Organization. vii, 146 p.
2. **Fauci AS** (2001) Infectious diseases: considerations for the 21st century. Clin Infect Dis 32: 675-685.
3. **Hilbert R** (2001) Mount Olive. Charleston, SC: Arcadia Publishing.
4. **Ellermeier C, Slauch J** (2006) The Genus *Salmonella*. In: Dworkin M, Falkow S, editors. The prokaryotes : a handbook on the biology of bacteria. 3rd ed. New York; London: Springer. pp. 123-158.
5. **Schultz M** (2008) Who is this man and what did he accomplish? Theobald Smith. Emerging Infectious Diseases 14: 1939-1942.
6. **Symonds J** (1984) Bergey manual of systematic bacteriology, Krieg,Nr, Holt,Jg. Lancet 2: 1075-1076.
7. **Murray PR, American Society for Microbiology.** (1999) Manual of clinical microbiology. Washington, D.C.: ASM Press. xxi, 1773 p.
8. **Coburn B, Grassl GA, Finlay BB** (2007) *Salmonella*, the host and disease: a brief review. Immunol Cell Biol 85: 112-118.
9. **Giannella RA** (1996) *Salmonella*. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston, TX: University of Texas Medical Branch at Galveston.
10. **Rozen Y, Belkin S** (2001) Survival of enteric bacteria in seawater. FEMS Microbiol Rev 25: 513-529.
11. **Winfield MD, Groisman EA** (2003) Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 69: 3687-3694.
12. **Davies RH, Wray C** (1996) Seasonal variations in the isolation of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* and

- Clostridium perfringens* from environmental samples. Zentralbl Veterinarmed B 43: 119-127.
13. **Mian LS, Maag H, Tacal JV** (2002) Isolation of *Salmonella* from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino County, California. J Vector Ecol 27: 82-85.
 14. **Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, Clifton-Hadley FA, Breslin M, Davies RH** (2003) Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella Enteritidis* infection in layer farms. J Appl Microbiol 94: 1024-1029.
 15. **Guo X, Chen J, Brackett RE, Beuchat LR** (2001) Survival of salmonellae on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. Appl Environ Microbiol 67: 4760-4764.
 16. **Brandl MT, Mandrell RE** (2002) Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. Appl Environ Microbiol 68: 3614-3621.
 17. **Heaton JC, Jones K** (2008) Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. J Appl Microbiol 104: 613-626.
 18. **Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, Frankel G** (2010) Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. Environ Microbiol 12: 2385-2397.
 19. **Schikora A, Garcia AV, Hirt H** (2012) Plants as alternative hosts for *Salmonella*. Trends Plant Sci 17: 245-249.
 20. **Thomason BM, Biddle JW, Cherry WB** (1975) Detection of salmonellae in the environment. Appl Microbiol 30: 764-767.
 21. **King CH, Shotts EB, Jr., Wooley RE, Porter KG** (1988) Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. Appl Environ Microbiol 54: 3023-3033.

22. **Gaze WH, Burroughs N, Gallagher MP, Wellington EM** (2003) Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microb Ecol* 46: 358-369.
23. **Douesnard-Malo F, Daigle F** (2011) Increased persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhi in the presence of *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 77: 7640-7646.
24. **Le Minor L, Popoff MY** (1987) Designation of *Salmonella-Enterica Sp*-Nov, Nom Rev, as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 465-468.
25. **Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ, 3rd** (1989) Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol* 27: 313-320.
26. **Reeves P** (1993) Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. *Trends Genet* 9: 17-22.
27. **Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL** (2004) Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 155: 568-570.
28. **Grimont P, Weill F** (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Paris, France: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur.
29. **Fàbrega A, Vila J** (2013) *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clin Microbiol Rev* 26: 308-341.
30. **Prevention CfDCa** (2008) *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2008. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.
31. **Versalovic J** (2011) Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM Press.

32. **Porwollik S, Wong R, McClelland M** (2002) Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8956-8961.
33. **Porwollik S, McClelland M** (2003) Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* 5: 977-989.
34. **Andrews-Polymenis H, Santiviago C, McClelland M** (2009) Novel genetic tools for studying food-borne *Salmonella*. *Curr Opin Biotechnol* 20: 149-157.
35. **Sabbagh S, Forest C, Lepage C, Leclerc J, Daigle F** (2010) So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* 305: 1-13.
36. **McClelland M, Sanderson K, Spieth J, Clifton S, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson R** (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413: 852-856.
37. **Parkhill J, Dougan G, James K, Thomson N, Pickard D, Wain J, Churcher C, Mungall K, Bentley S, Holden M, Sebahia M, Baker S, Basham D, Brooks K, Chillingworth T, Connerton P, Cronin A, Davis P, Davies R, Dowd L, White N, Farrar J, Feltwell T, Hamlin N, Haque A, Hien T, Holroyd S, Jagels K, Krogh A, Larsen T, Leather S, Moule S, O'Gaora P, Parry C, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell B** (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413: 848-852.
38. **Liu S, Sanderson K** (1995) Rearrangements in the genome of the bacterium *Salmonella typhi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1018-1022.

39. **Liu S, Sanderson K** (1996) Highly plastic chromosomal organization in *Salmonella typhi*. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 10303-10308.
40. **Alokam S, Liu S, Said K, Sanderson K** (2002) Inversions over the terminus region in *Salmonella* and *Escherichia coli*: IS200s as the sites of homologous recombination inverting the chromosome of *Salmonella enterica* serovar typhi. J Bacteriol 184: 6190-6197.
41. **Baker S, Dougan G** (2007) The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. Clin Infect Dis 45 Suppl 1: S29-33.
42. **Hacker J, Carniel E** (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. EMBO Rep 2: 376-381.
43. **Feil EJ** (2004) Small change: keeping pace with microevolution. Nat Rev Microbiol 2: 483-495.
44. **Tamas I, Klasson L, Canback B, Naslund AK, Eriksson AS, Wernegreen JJ, Sandstrom JP, Moran NA, Andersson SG** (2002) 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. Science 296: 2376-2379.
45. **Medini D, Donati C, Tettelin H, Masignani V, Rappuoli R** (2005) The microbial pan-genome. Curr Opin Genet Dev 15: 589-594.
46. **Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG** (1993) How clonal are bacteria? Proc Natl Acad Sci U S A 90: 4384-4388.
47. **Go MF, Kapur V, Graham DY, Musser JM** (1996) Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. J Bacteriol 178: 3934-3938.
48. **Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, Dyrek I, Achtman M** (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 12619-12624.
49. **Beltran P, Musser J, Helmuth R, Farmer Jr, Frerichs W, Wachsmuth I, Ferris K, McWhorter A, Wells J, Cravioto A** (1988) Toward a

- population genetic analysis of *Salmonella*: genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 7753-7757.
50. **Selander R, Beltran P, Smith N, Helmuth R, Rubin F, Kopecko D, Ferris K, Tall B, Cravioto A, Musser J** (1990) Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. Infect Immun 58: 2262-2275.
51. **Beltran P, Plock SA, Smith NH, Whittam TS, Old DC, Selander RK** (1991) Reference collection of strains of the *Salmonella typhimurium* complex from natural populations. J Gen Microbiol 137: 601-606.
52. **Selander RK, Beltran P, Smith NH** (1991) Evolutionary Genetics of *Salmonella*. In: Selander R, Clark A, Whittam T, editors. Evolution at the Molecular Level. Sunderland, MA: Sinauer Associates. pp. 25-57.
53. **Nelson K, Whittam TS, Selander RK** (1991) Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 6667-6671.
54. **Nelson K, Selander RK** (1992) Evolutionary genetics of the proline permease gene (*putP*) and the control region of the proline utilization operon in populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. J Bacteriol 174: 6886-6895.
55. **Nelson K, Selander RK** (1994) Intergeneric transfer and recombination of the 6-phosphogluconate dehydrogenase gene (*gnd*) in enteric bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 10227-10231.
56. **Boyd EF, Nelson K, Wang FS, Whittam TS, Selander RK** (1994) Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase (*mdh*) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 1280-1284.

57. **Boyd EF, Wang FS, Whittam TS, Selander RK** (1996) Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Appl Environ Microbiol* 62: 804-808.
58. **Nelson K, Wang FS, Boyd EF, Selander RK** (1997) Size and sequence polymorphism in the isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase gene (*aceK*) and flanking regions in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Genetics* 147: 1509-1520.
59. **Wang FS, Whittam TS, Selander RK** (1997) Evolutionary genetics of the isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 179: 6551-6559.
60. **Brown EW, Kotewicz ML, Cebula TA** (2002) Detection of recombination among *Salmonella enterica* strains using the incongruence length difference test. *Mol Phylogenet Evol* 24: 102-120.
61. **Brown EW, Mammel MK, LeClerc JE, Cebula TA** (2003) Limited boundaries for extensive horizontal gene transfer among *Salmonella* pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15676-15681.
62. **Bryant D, Moulton V** (2004) Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol* 21: 255-265.
63. **Octavia S, Lan R** (2006) Frequent recombination and low level of clonality within *Salmonella enterica* subspecies I. *Microbiology* 152: 1099-1108.
64. **Falush D, Torpdahl M, Didelot X, Conrad D, Wilson D, Achtman M** (2006) Mismatch induced speciation in *Salmonella*: model and data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 2045-2053.
65. **Didelot X, Achtman M, Parkhill J, Thomson N, Falush D** (2007) A bimodal pattern of relatedness between the *Salmonella Paratyphi* A and *Typhi* genomes: convergence or divergence by homologous recombination? *Genome Res* 17: 61-68.

66. **Li J, Nelson K, McWhorter AC, Whittam TS, Selander RK** (1994) Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 2552-2556.
67. **Sukhnanand S, Alcaine S, Warnick LD, Su WL, Hof J, Craver MP, McDonough P, Boor KJ, Wiedmann M** (2005) DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. J Clin Microbiol 43: 3688-3698.
68. **Torpdahl M, Skov MN, Sandvang D, Baggesen DL** (2005) Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. J Microbiol Methods 63: 173-184.
69. **Alcaine SD, Soyer Y, Warnick LD, Su WL, Sukhnanand S, Richards J, Fortes ED, McDonough P, Root TP, Dumas NB, Grohn Y, Wiedmann M** (2006) Multilocus sequence typing supports the hypothesis that cow- and human-associated *Salmonella* isolates represent distinct and overlapping populations. Appl Environ Microbiol 72: 7575-7585.
70. **Tankouo-Sandjong B, Sessitsch A, Liebana E, Kornschöber C, Allerberger F, Hächler H, Bodrossy L** (2007) MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. J Microbiol Methods 69: 23-36.
71. **Soyer Y, Orsi RH, Rodriguez-Rivera LD, Sun Q, Wiedmann M** (2009) Genome wide evolutionary analyses reveal serotype specific patterns of positive selection in selected *Salmonella* serotypes. BMC Evol Biol 9: 264.
72. **Didelot X, Bowden R, Street T, Golubchik T, Spencer C, McVean G, Sangal V, Anjum MF, Achtman M, Falush D, Donnelly P** (2011) Recombination and population structure in *Salmonella enterica*. PLoS Genet 7: e1002191.

73. **Taddei F, Matic I, Godelle B, Radman M** (1997) To be a mutator, or how pathogenic and commensal bacteria can evolve rapidly. *Trends Microbiol* 5: 427-428; discussion 428-429.
74. **Matic I, Taddei F, Radman M** (2000) No genetic barriers between *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* in SOS-induced mismatch repair-deficient cells. *J Bacteriol* 182: 5922-5924.
75. **Lan R, Reeves P, Octavia S** (2009) Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol*.
76. **Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G, Achtman M** (2002) *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect Genet Evol* 2: 39-45.
77. **Roumagnac P, Weill F, Dolecek C, Baker S, Brisse S, Chinh N, Le T, Acosta C, Farrar J, Dougan G, Achtman M** (2006) Evolutionary history of *Salmonella typhi*. *Science* 314: 1301-1304.
78. **Feng L, Reeves PR, Lan R, Ren Y, Gao C, Zhou Z, Ren Y, Cheng J, Wang W, Wang J, Qian W, Li D, Wang L** (2008) A recalibrated molecular clock and independent origins for the cholera pandemic clones. *PLoS One* 3: e4053.
79. **Holt KE, Parkhill J, Mazzoni CJ, Roumagnac P, Weill FX, Goodhead I, Rance R, Baker S, Maskell DJ, Wain J, Dolecek C, Achtman M, Dougan G** (2008) High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella Typhi*. *Nat Genet* 40: 987-993.
80. **Achtman M** (2008) Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 62: 53-70.
81. **Dagan T, Blekhman R, Graur D** (2006) The "domino theory" of gene death: gradual and mass gene extinction events in three lineages of obligate symbiotic bacterial pathogens. *Mol Biol Evol* 23: 310-316.

82. **Bäumler A, Tsolis R, Ficht T, Adams L** (1998) Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 66: 4579-4587.
83. **Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA** (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.
84. **Burrus V, Waldor MK** (2004) Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol* 155: 376-386.
85. **Kelly BG, Vespermann A, Bolton DJ** (2009) The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol* 47: 951-968.
86. **Vernikos GS, Thomson NR, Parkhill J** (2007) Genetic flux over time in the *Salmonella* lineage. *Genome Biol* 8: R100.
87. **Thomas CM, Nielsen KM** (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3: 711-721.
88. **Sorensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N, Wuertz S** (2005) Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nat Rev Microbiol* 3: 700-710.
89. **Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A** (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3: 722-732.
90. **Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J** (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2: 414-424.
91. **Groisman EA, Ochman H** (1997) How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5: 343-349.
92. **Rotger R, Casadesus J** (1999) The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol* 2: 177-184.
93. **Boyd E, Brüssow H** (2002) Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol* 10: 521-529.

94. **Hacker J, Hochhut B, Middendorf B, Schneider G, Buchrieser C, Gottschalk G, Dobrindt U** (2004) Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria. *Int J Med Microbiol* 293: 453-461.
95. **Conner CP, Heithoff DM, Julio SM, Sinsheimer RL, Mahan MJ** (1998) Differential patterns of acquired virulence genes distinguish *Salmonella* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4641-4645.
96. **Porwollik S, Boyd E, Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, McClelland M** (2004) Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J Bacteriol* 186: 5883-5898.
97. **Thomson N, Baker S, Pickard D, Fookes M, Anjum M, Hamlin N, Wain J, House D, Bhutta Z, Chan K, Falkow S, Parkhill J, Woodward M, Ivens A, Dougan G** (2004) The role of prophage-like elements in the diversity of *Salmonella enterica* serovars. *J Mol Biol* 339: 279-300.
98. **Hermans AP, Abee T, Zwietering MH, Aarts HJ** (2005) Identification of novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-specific prophage and nonprophage chromosomal sequences among serovar Typhimurium isolates by genomic subtractive hybridization. *Appl Environ Microbiol* 71: 4979-4985.
99. **Hermans AP, Beuling AM, van Hoek AH, Aarts HJ, Abee T, Zwietering MH** (2006) Distribution of prophages and SGI-1 antibiotic-resistance genes among different *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates. *Microbiology* 152: 2137-2147.
100. **Cooke FJ, Wain J, Fookes M, Ivens A, Thomson N, Brown DJ, Threlfall EJ, Gunn G, Foster G, Dougan G** (2007) Prophage sequences defining hot spots of genome variation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium can be used to discriminate between field isolates. *J Clin Microbiol* 45: 2590-2598.
101. **Doolittle R, Feng D, Tsang S, Cho G, Little E** (1996) Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science* 271: 470-477.

102. **Ochman H, Wilson AC** (1987) Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol* 26: 74-86.
103. **Liu SL, Hessel A, Sanderson KE** (1993) The *XbaI-BlnI-CeuI* genomic cleavage map of *Salmonella enteritidis* shows an inversion relative to *Salmonella typhimurium* LT2. *Mol Microbiol* 10: 655-664.
104. **Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Posfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR** (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409: 529-533.
105. **Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, Gottschalk G, Karch H, Hacker J** (2003) Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* 185: 1831-1840.
106. **Le Gall T, Darlu P, Escobar-Paramo P, Picard B, Denamur E** (2005) Selection-driven transcriptome polymorphism in *Escherichia coli/Shigella* species. *Genome Res* 15: 260-268.
107. **Callister SJ, McCue LA, Turse JE, Monroe ME, Auberry KJ, Smith RD, Adkins JN, Lipton MS** (2008) Comparative bacterial proteomics: analysis of the core genome concept. *PLoS One* 3: e1542.
108. **Dekel E, Alon U** (2005) Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein. *Nature* 436: 588-592.
109. **Mandel MJ, Silhavy TJ** (2005) Starvation for different nutrients in *Escherichia coli* results in differential modulation of RpoS levels and stability. *J Bacteriol* 187: 434-442.
110. **Lopez-Maury L, Marguerat S, Bahler J** (2008) Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat Rev Genet* 9: 583-593.

111. **Cooper MB, Loose M, Brookfield JF** (2009) The evolutionary influence of binding site organisation on gene regulatory networks. *Biosystems* 96: 185-193.
112. **Winfield MD, Groisman EA** (2004) Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17162-17167.
113. **Isalan M, Lemerle C, Michalodimitrakis K, Horn C, Beltrao P, Raineri E, Garriga-Canut M, Serrano L** (2008) Evolvability and hierarchy in rewired bacterial gene networks. *Nature* 452: 840-845.
114. **Meysman P, Sanchez-Rodriguez A, Fu Q, Marchal K, Engelen K** (2013) Expression Divergence between *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Reflects Their Lifestyles. *Mol Biol Evol* 30: 1302-1314.
115. **Lawrence JG, Ochman H** (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9413-9417.
116. **Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462.
117. **Holt K, Thomson N, Wain J, Langridge G, Hasan R, Bhutta Z, Quail M, Norbertczak H, Walker D, Simmonds M, White B, Bason N, Mungall K, Dougan G, Parkhill J** (2009) Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* 10: 36.
118. **Feng Y, Chien KY, Chen HL, Chiu CH** (2012) Pseudogene recoding revealed from proteomic analysis of *Salmonella* serovars. *J Proteome Res* 11: 1715-1719.
119. **Farabaugh PJ** (1996) Programmed translational frameshifting. *Microbiol Rev* 60: 103-134.

120. **Gesteland RF, Atkins JF** (1996) Recoding: dynamic reprogramming of translation. *Annu Rev Biochem* 65: 741-768.
121. **Silva RM, Miranda I, Moura G, Santos MA** (2004) Yeast as a model organism for studying the evolution of non-standard genetic codes. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3: 35-46.
122. **Baranov PV, Fayet O, Hendrix RW, Atkins JF** (2006) Recoding in bacteriophages and bacterial IS elements. *Trends Genet* 22: 174-181.
123. **Andersson JO, Andersson SG** (1999) Genome degradation is an ongoing process in *Rickettsia*. *Mol Biol Evol* 16: 1178-1191.
124. **Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG** (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409: 1007-1011.
125. **Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeno-Tarraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ** (2003) Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 35: 32-40.

126. **Thomson NR, Howard S, Wren BW, Holden MT, Crossman L, Challis GL, Churcher C, Mungall K, Brooks K, Chillingworth T, Feltwell T, Abdellah Z, Hauser H, Jagels K, Maddison M, Moule S, Sanders M, Whitehead S, Quail MA, Dougan G, Parkhill J, Prentice MB (2006)** The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet* 2: e206.
127. **Deng W, Liou S, Plunkett Gr, Mayhew G, Rose D, Burland V, Kodoyianni V, Schwartz D, Blattner F (2003)** Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol* 185: 2330-2337.
128. **McClelland M, Sanderson K, Clifton S, Latreille P, Porwollik S, Sabo A, Meyer R, Bieri T, Ozersky P, McLellan M, Harkins C, Wang C, Nguyen C, Berghoff A, Elliott G, Kohlberg S, Strong C, Du F, Carter J, Kremizki C, Layman D, Leonard S, Sun H, Fulton L, Nash W, Miner T, Minx P, Delehaunty K, Fronick C, Magrini V, Nhan M, Warren W, Florea L, Spieth J, Wilson R (2004)** Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat Genet* 36: 1268-1274.
129. **Chiu C, Tang P, Chu C, Hu S, Bao Q, Yu J, Chou Y, Wang H, Lee Y (2005)** The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res* 33: 1690-1698.
130. **Liu WQ, Feng Y, Wang Y, Zou QH, Chen F, Guo JT, Peng YH, Jin Y, Li YG, Hu SN, Johnston RN, Liu GR, Liu SL (2009)** *Salmonella paratyphi* C: genetic divergence from *Salmonella choleraesuis* and pathogenic convergence with *Salmonella typhi*. *PLoS One* 4: e4510.
131. **Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, Quail MA, Stevens M, Jones MA, Watson M, Barron A, Layton A, Pickard D, Kingsley RA, Bignell A, Clark L, Harris B,**

- Ormond D, Abdellah Z, Brooks K, Cherevach I, Chillingworth T, Woodward J, Norberczak H, Lord A, Arrowsmith C, Jagels K, Moule S, Mungall K, Sanders M, Whitehead S, Chabalgoity JA, Maskell D, Humphrey T, Roberts M, Barrow PA, Dougan G, Parkhill J** (2008) Comparative genome analysis of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella Gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res* 18: 1624-1637.
132. **Wain J, House D, Parkhill J, Parry C, Dougan G** (2002) Unlocking the genome of the human typhoid bacillus. *Lancet Infect Dis* 2: 163-170.
133. **Parry C, Hien T, Dougan G, White N, Farrar J** (2002) Typhoid fever. *N Engl J Med* 347: 1770-1782.
134. **Feng Y, Liu W, Sanderson K, Liu S** (2011) Comparison of *Salmonella* genomes. In: Porwollik S, editor. *Salmonella* : from genome to function. Norfolk, UK: Caister Academic Press. pp. 49-67.
135. **Kuo CH, Ochman H** (2010) The extinction dynamics of bacterial pseudogenes. *PLoS Genet* 6: e1001050.
136. **Perkins TT, Kingsley RA, Fookes MC, Gardner PP, James KD, Yu L, Assefa SA, He M, Croucher NJ, Pickard DJ, Maskell DJ, Parkhill J, Choudhary J, Thomson NR, Dougan G** (2009) A strand-specific RNA-Seq analysis of the transcriptome of the typhoid bacillus *Salmonella typhi*. *PLoS Genet* 5: e1000569.
137. **Kumar V, Robbins SL** (2007) Robbins basic pathology. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. xiv, 946 p.
138. **Hohmann EL** (2001) Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis* 32: 263-269.
139. **Jones BD, Falkow S** (1996) Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 14: 533-561.
140. **House D, Bishop A, Parry C, Dougan G, Wain J** (2001) Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr Opin Infect Dis* 14: 573-578.

141. **Parry CM, Threlfall EJ** (2008) Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis* 21: 531-538.
142. **Thiennimitr P, Winter SE, Baumler AJ** (2012) *Salmonella*, the host and its microbiota. *Curr Opin Microbiol* 15: 108-114.
143. **Chen HM, Wang Y, Su LH, Chiu CH** (2013) Nontyphoid *Salmonella* Infection: Microbiology, Clinical Features, and Antimicrobial Therapy. *Pediatr Neonatol* 54: 147-152.
144. **Olsen SJ, Bishop R, Brenner FW, Roels TH, Bean N, Tauxe RV, Slutsker L** (2001) The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. *J Infect Dis* 183: 753-761.
145. **Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM, International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness S** (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50: 882-889.
146. **Rabsch W, Tschape H, Baumler AJ** (2001) Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect* 3: 237-247.
147. **Bishop J, Arena E, Harder K, Finlay B** (2011) Anti-*Salmonella* Immunity: Highlighting New Research in Vaccines, Mucosal Immunology and Systemic Disease. In: Porwollik S, editor. *Salmonella: From Genome to Function*. Norfolk, UK. pp. 241-274.
148. **Reddy EA, Shaw AV, Crump JA** (2010) Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases* 10: 417-432.
149. **McGregor AC, Waddington CS, Pollard AJ** (2013) Prospects for prevention of *Salmonella* infection in children through vaccination. *Curr Opin Infect Dis* 26: 254-262.
150. **Jones TF, Ingram LA, Cieslak PR, Vugia DJ, Tobin-D'Angelo M, Hurd S, Medus C, Cronquist A, Angulo FJ** (2008) Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J Infect Dis* 198: 109-114.

151. **Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, Kiiru J, Mwituria J, Muyodi J, Githinji JW, Kagendo D, Munyalo A, Hart CA** (2006) Invasive multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonella* infections in Africa: zoonotic or anthroponotic transmission? *J Med Microbiol* 55: 585-591.
152. **DuPont HL** (2007) The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. *Clin Infect Dis* 45: 1353-1361.
153. **Gordon MA** (2008) *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *J Infect* 56: 413-422.
154. **Milledge J, Calis JC, Graham SM, Phiri A, Wilson LK, Soko D, Mbvwinji M, Walsh AL, Rogerson SR, Molyneux ME, Molyneux EM** (2005) Aetiology of neonatal sepsis in Blantyre, Malawi: 1996-2001. *Ann Trop Paediatr* 25: 101-110.
155. **Brent AJ, Oundo JO, Mwangi I, Ochola L, Lowe B, Berkley JA** (2006) *Salmonella* bacteremia in Kenyan children. *Pediatr Infect Dis J* 25: 230-236.
156. **Gordon MA, Graham SM, Walsh AL, Wilson L, Phiri A, Molyneux E, Zijlstra EE, Heyderman RS, Hart CA, Molyneux ME** (2008) Epidemics of invasive *Salmonella enterica* serovar enteritidis and *S. enterica* Serovar typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi. *Clin Infect Dis* 46: 963-969.
157. **Nkuo-Akenji TK, Ntemgwa ML, Ndip RN** (2001) Asymptomatic salmonellosis and drug susceptibility in the Buea District, Cameroon. *Cent Afr J Med* 47: 254-257.
158. **Poppe C, Smart N, Khakhria R, Johnson W, Spika J, Prescott J** (1998) *Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Can Vet J* 39: 559-565.
159. **Helms M, Ethelberg S, Molbak K, Group DTS** (2005) International *Salmonella Typhimurium* DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis* 11: 859-867.

160. **Meakins S, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschape H, Cormican M, Luzzi I, Schneider F, Wannett W, Coia J, Echeita A, Threlfall EJ, Enter-net p** (2008) Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microb Drug Resist* 14: 31-35.
161. **Simon R, Tennant SM, Wang JY, Schmidlein PJ, Lees A, Ernst RK, Pasetti MF, Galen JE, Levine MM** (2011) *Salmonella enterica* serovar enteritidis core O polysaccharide conjugated to H:g,m flagellin as a candidate vaccine for protection against invasive infection with *S. enteritidis*. *Infect Immun* 79: 4240-4249.
162. **Choi J, Shin D, Ryu S** (2010) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ruvB* mutant can confer protection against salmonellosis in mice. *Vaccine* 28: 6436-6444.
163. **Tennant SM, Wang JY, Galen JE, Simon R, Pasetti MF, Gat O, Levine MM** (2011) Engineering and preclinical evaluation of attenuated nontyphoidal *Salmonella* strains serving as live oral vaccines and as reagent strains. *Infect Immun* 79: 4175-4185.
164. **Pesciaroli M, Aloisio F, Ammendola S, Pistoia C, Petrucci P, Tarantino M, Francia M, Battistoni A, Pasquali P** (2011) An attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain lacking the ZnuABC transporter induces protection in a mouse intestinal model of *Salmonella* infection. *Vaccine* 29: 1783-1790.
165. **Allam US, Krishna MG, Lahiri A, Joy O, Chakravortty D** (2011) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking *hfq* gene confers protective immunity against murine typhoid. *PLoS One* 6: e16667.
166. **Gil-Cruz C, Bobat S, Marshall JL, Kingsley RA, Ross EA, Henderson IR, Leyton DL, Coughlan RE, Khan M, Jensen KT, Buckley CD, Dougan G, MacLennan IC, Lopez-Macias C, Cunningham AF** (2009) The porin OmpD from nontyphoidal *Salmonella* is a key target for a

- protective B1b cell antibody response. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 9803-9808.
167. **Oldach DW, Richard RE, Borza EN, Benitez RM** (1998) A mysterious death. N Engl J Med 338: 1764-1769.
168. **Papagrigrorakis MJ, Yapijakis C, Synodinos PN, Baziotopoulou-Valavani E** (2006) DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens. Int J Infect Dis 10: 206-214.
169. **Holt K, Perkins T, Dougan G, Kingsley R** (2011) Genomics and Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serovars Typhi and Paratyphi A. In: Porwollik S, editor. *Salmonella: From Genome to Function*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. pp. 107-121.
170. **Brooks J** (1996) The sad and tragic life of Typhoid Mary. CMAJ 154: 915-916.
171. **Levine M** (1999) Typhoid fever vaccines. In: Plotkin S, Oernstein W, editors. *Vaccine*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co. pp. 781-815.
172. **Marathe SA, Lahiri A, Negi VD, Chakravortty D** (2012) Typhoid fever & vaccine development: a partially answered question. Indian J Med Res 135: 161-169.
173. **Nagarajan AG, Karnam G, Lahiri A, Allam US, Chakravortty D** (2009) Reliable means of diagnosis and serovar determination of blood-borne *Salmonella* strains: quick PCR amplification of unique genomic loci by novel primer sets. J Clin Microbiol 47: 2435-2441.
174. **Sinha A, Sazawal S, Kumar R, Sood S, Reddaiah VP, Singh B, Rao M, Naficy A, Clemens JD, Bhan MK** (1999) Typhoid fever in children aged less than 5 years. Lancet 354: 734-737.
175. **Lin FY, Vo AH, Phan VB, Nguyen TT, Bryla D, Tran CT, Ha BK, Dang DT, Robbins JB** (2000) The epidemiology of typhoid fever in the Dong Thap Province, Mekong Delta region of Vietnam. Am J Trop Med Hyg 62: 644-648.

176. **Hermans PW, Saha SK, van Leeuwen WJ, Verbrugh HA, van Belkum A, Goessens WH** (1996) Molecular typing of *Salmonella typhi* strains from Dhaka (Bangladesh) and development of DNA probes identifying plasmid-encoded multidrug-resistant isolates. *J Clin Microbiol* 34: 1373-1379.
177. **Wain J, Hien TT, Connerton P, Ali T, Parry CM, Chinh NT, Vinh H, Phuong CX, Ho VA, Diep TS, Farrar JJ, White NJ, Dougan G** (1999) Molecular typing of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi from Vietnam: application to acute and relapse cases of typhoid fever. *J Clin Microbiol* 37: 2466-2472.
178. **Bhaskaram P, Sahay BK, Rao NS** (1990) Specific immune responses in typhoid fever & after TAB vaccination. *Indian J Med Res* 91: 115-119.
179. **Budd W** (1931) Typhoid fever, its nature, mode of spreading, and prevention. New York. xiv, 184 p.
180. **Cutler D, Miller G** (2005) The role of public health improvements in health advances: the twentieth-century United States. *Demography* 42: 1-22.
181. **Johnson GA** (1916) The typhoid toll. New York. 249-326, 791-868 p.
182. **Institute of Medicine (U.S.). Committee on Issues and Priorities for New Vaccine Development., National Institute of Allergy and Infectious Diseases (U.S.)** (1986) New vaccine development : establishing priorities. Washington, D.C.: National Academy Press.
183. **Edelman R, Levine MM** (1986) Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev Infect Dis* 8: 329-349.
184. **Ivanoff B, Levine M, Lambert P** (1994) Vaccination against typhoid fever: present status. *Bull World Health Organ* 72: 957-971.
185. **Crump JA, Luby SP, Mintz ED** (2004) The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* 82: 346-353.
186. **Ochiai RL, Acosta CJ, Danovaro-Holliday MC, Baiqing D, Bhattacharya SK, Agtini MD, Bhutta ZA, Canh do G, Ali M, Shin S,**

- Wain J, Page AL, Albert MJ, Farrar J, Abu-Elyazeed R, Pang T, Galindo CM, von Seidlein L, Clemens JD, Domi Typhoid Study G** (2008) A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for controls. *Bull World Health Organ* 86: 260-268.
187. **Martin LB** (2012) Vaccines for typhoid fever and other salmonellosis. *Curr Opin Infect Dis* 25: 489-499.
188. **Levine MM, Black RE, Lanata C** (1982) Precise estimation of the numbers of chronic carriers of *Salmonella typhi* in Santiago, Chile, an endemic area. *J Infect Dis* 146: 724-726.
189. **Khatri NS, Maskey P, Poudel S, Jaiswal VK, Karkey A, Koirala S, Shakya N, Agrawal K, Arjyal A, Basnyat B, Day J, Farrar J, Dolecek C, Baker S** (2009) Gallbladder carriage of *Salmonella paratyphi* A may be an important factor in the increasing incidence of this infection in South Asia. *Ann Intern Med* 150: 567-568.
190. **Mirza SH, Beeching NJ, Hart CA** (1996) Multi-drug resistant typhoid: a global problem. *J Med Microbiol* 44: 317-319.
191. **Sirinavin S, Garner P** (2000) Antibiotics for treating *Salmonella* gut infections. *Cochrane Database Syst Rev*: CD001167.
192. **Ackers ML, Puhf ND, Tauxe RV, Mintz ED** (2000) Laboratory-based surveillance of *Salmonella* serotype Typhi infections in the United States: antimicrobial resistance on the rise. *JAMA* 283: 2668-2673.
193. **Crump JA, Mintz ED** (2010) Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin Infect Dis* 50: 241-246.
194. **Shandera WX, Taylor JP, Betz TG, Blake PA** (1985) An analysis of economic costs associated with an outbreak of typhoid fever. *Am J Public Health* 75: 71-73.
195. **Prouty A, Schwesinger W, Gunn J** (2002) Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect Immun* 70: 2640-2649.

196. **Stuhl L, Benda R, Frey N** (1964) A Controlled Field Trial of the Effectiveness of Acetone-Dried and Inactivated and Heat-Phenol-Inactivated Typhoid Vaccines in Yugoslavia. *Bull World Health Organ* 30: 623-630.
197. **Ashcroft MT, Ritchie JM, Nicholson CC** (1964) Controlled Field Trial in British Guiana School Children of Heat-Killed-Phenolized and Acetone-Killed Lyophilized Typhoid Vaccines. *Am J Hyg* 79: 196-206.
198. **Germanier R** (1984) *Bacterial vaccines*. Orlando: Academic Press. xii, 441 p.
199. **Engels EA, Falagas ME, Lau J, Bennish ML** (1998) Typhoid fever vaccines: a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity. *BMJ* 316: 110-116.
200. **Levine MM, Ferreccio C, Black RE, Tacket CO, Germanier R** (1989) Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 3: S552-567.
201. **Germanier R, Fuer E** (1975) Isolation and characterization of *Gal E* mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis* 131: 553-558.
202. Levine M (2013) Live oral vaccine approaches to typhoid and paratyphoid vaccines. 8th International Conference on Typhoid and other Invasive Salmonellosis. Dhaka, Bangladesh.
203. **Germanier R, Furer E** (1983) Characteristics of the attenuated oral vaccine strain "*S. typhi*" Ty 21a. *Dev Biol Stand* 53: 3-7.
204. **Robbe-Saule V, Coynault C, Norel F** (1995) The live oral typhoid vaccine Ty21a is a *rpoS* mutant and is susceptible to various environmental stresses. *FEMS Microbiol Lett* 126: 171-176.
205. **Coynault C, Robbe-Saule V, Norel F** (1996) Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS (sigma S) regulon. *Mol Microbiol* 22: 149-160.

206. **Grabenstein JD, Pittman PR, Greenwood JT, Engler RJ** (2006) Immunization to protect the US Armed Forces: heritage, current practice, and prospects. *Epidemiol Rev* 28: 3-26.
207. **Felix A, Krikorian KS, Reitler R** (1935) The Occurrence of Typhoid Bacilli Containing Vi Antigen in Cases of Typhoid Fever and of Vi Antibody in their Sera. *J Hyg (Lond)* 35: 421-427.
208. **Klugman KP, Koornhof HJ, Robbins JB, Le Cam NN** (1996) Immunogenicity, efficacy and serological correlate of protection of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. *Vaccine* 14: 435-438.
209. **WHO** (2011) Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on Immunization, November 2010: summary, conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec* 86: 1-16.
210. **Johnson KJ** (2012) Crossing borders: one world, global health: CDC updates recommendations for typhoid vaccination. *Clin Infect Dis* 54: v-vi.
211. **Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Lang AB, Viret JF** (2003) Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine* 21: 678-683.
212. **Guzman CA, Borsutzky S, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Pearman J, Collioud A, Favre D, Dietrich G** (2006) Vaccines against typhoid fever. *Vaccine* 24: 3804-3811.
213. **Saha SK, Baqui AH, Hanif M, Darmstadt GL, Ruhulamin M, Nagatake T, Santosham M, Black RE** (2001) Typhoid fever in Bangladesh: implications for vaccination policy. *Pediatr Infect Dis J* 20: 521-524.
214. **Brooks WA, Hossain A, Goswami D, Nahar K, Alam K, Ahmed N, Naheed A, Nair GB, Luby S, Breiman RF** (2005) Bacteremic typhoid fever in children in an urban slum, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 11: 326-329.

215. **Hessel L, Debois H, Fletcher M, Dumas R** (1999) Experience with *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 609-620.
216. **Lin FY, Ho VA, Khiem HB, Trach DD, Bay PV, Thanh TC, Kossaczka Z, Bryla DA, Shiloach J, Robbins JB, Schneerson R, Szu SC** (2001) The efficacy of a *Salmonella typhi* Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. *N Engl J Med* 344: 1263-1269.
217. **Canh DG, Lin FY, Thiem VD, Trach DD, Trong ND, Mao ND, Hunt S, Schneerson R, Robbins JB, Chu C, Shiloach J, Bryla DA, Bonnet MC, Schulz D, Szu SC** (2004) Effect of dosage on immunogenicity of a Vi conjugate vaccine injected twice into 2- to 5-year-old Vietnamese children. *Infect Immun* 72: 6586-6588.
218. **Thiem VD, Lin FY, Canh do G, Son NH, Anh DD, Mao ND, Chu C, Hunt SW, Robbins JB, Schneerson R, Szu SC** (2011) The Vi conjugate typhoid vaccine is safe, elicits protective levels of IgG anti-Vi, and is compatible with routine infant vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 18: 730-735.
219. **Mathew JL** (2009) Conjugate typhoid vaccine(s) in the Indian context. *Indian Pediatr* 46: 182-184.
220. **Shah NK** (2009) Indian conjugate Vi typhoid vaccine: do we have enough evidence? *Indian Pediatr* 46: 181-182.
221. **Daniels EM, Schneerson R, Egan WM, Szu SC, Robbins JB** (1989) Characterization of the *Salmonella paratyphi* C Vi polysaccharide. *Infect Immun* 57: 3159-3164.
222. **Hale C, Bowe F, Pickard D, Clare S, Haeuw JF, Powers U, Menager N, Mastroeni P, Dougan G** (2006) Evaluation of a novel Vi conjugate vaccine in a murine model of salmonellosis. *Vaccine* 24: 4312-4320.
223. **Micoli F, Rondini S, Pisoni I, Proietti D, Berti F, Costantino P, Rappuoli R, Szu S, Saul A, Martin LB** (2011) Vi-CRM 197 as a new conjugate vaccine against *Salmonella Typhi*. *Vaccine* 29: 712-720.

224. **Rondini S, Micoli F, Lanzilao L, Hale C, Saul AJ, Martin LB** (2011) Evaluation of the immunogenicity and biological activity of the *Citrobacter freundii* Vi-CRM197 conjugate as a vaccine for *Salmonella enterica* serovar Typhi. Clin Vaccine Immunol 18: 460-468.
225. **van Damme P, Kafeja F, Anemona A, Basile V, Hilbert AK, De Coster I, Rondini S, Micoli F, Qasim Khan RM, Marchetti E, Di Cioccio V, Saul A, Martin LB, Podda A** (2011) Safety, immunogenicity and dose ranging of a new Vi-CRM(1)(9)(7) conjugate vaccine against typhoid fever: randomized clinical testing in healthy adults. PLoS One 6: e25398.
226. **Rennels MB, Edwards KM, Keyserling HL, Reisinger KS, Hogerman DA, Madore DV, Chang I, Paradiso PR, Malinoski FJ, Kimura A** (1998) Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to CRM197 in United States infants. Pediatrics 101: 604-611.
227. **Shinefield HR, Black S, Ray P, Chang I, Lewis N, Fireman B, Hackell J, Paradiso PR, Siber G, Kohberger R, Madore DV, Malinowski FJ, Kimura A, Le C, Landaw I, Aguilar J, Hansen J** (1999) Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine in infants and toddlers. Pediatr Infect Dis J 18: 757-763.
228. **Snape MD, Perrett KP, Ford KJ, John TM, Pace D, Yu LM, Langley JM, McNeil S, Dull PM, Ceddia F, Anemona A, Halperin SA, Dobson S, Pollard AJ** (2008) Immunogenicity of a tetravalent meningococcal glycoconjugate vaccine in infants: a randomized controlled trial. JAMA 299: 173-184.
229. **Cooper B, DeTora L, Stoddard J** (2011) Menveo(R): a novel quadrivalent meningococcal CRM197 conjugate vaccine against serogroups A, C, W-135 and Y. Expert Rev Vaccines 10: 21-33.
230. **Podda A, Saul AJ, Arora R, Bhutta Z, Sinha A, Gaiind R, Singhal T, Saha S, Brooks A, Martin LB, Amdekar Y, Chitkara AJ, Shieh M, Kapur AN, Chugh TD** (2010) Conjugate vaccines for enteric fever:

- proceedings of a meeting organized in New Delhi, India in 2009. *J Infect Dev Ctries* 4: 404-411.
231. **Harada H, Nishikawa F, Higashi N, Kita E** (2002) Development of a mucosal complex vaccine against oral *Salmonella* infection in mice. *Microbiol Immunol* 46: 891-905.
232. **Hoiseh SK, Stocker BA** (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239.
233. **Stocker BA, Hoiseh SK, Smith BP** (1983) Aromatic-dependent "*Salmonella* sp." as live vaccine in mice and calves. *Dev Biol Stand* 53: 47-54.
234. **Levine M, Herrington D, Murphy J, Morris J, Losonsky G, Tall B, Lindberg A, Svenson S, Baqar S, Edwards M** (1987) Safety, infectivity, immunogenicity, and *in vivo* stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541Ty and 543Ty, as live oral vaccines in humans. *J Clin Invest* 79: 888-902.
235. **Hone D, Harris A, Chatfield S, Dougan G, Levine M** (1991) Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9: 810-816.
236. **Tacket C, Hone D, Curtiss Rr, Kelly S, Losonsky G, Guers L, Harris A, Edelman R, Levine M** (1992) Comparison of the safety and immunogenicity of delta *aroC* delta *aroD* and delta *cya* delta *crp* *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infect Immun* 60: 536-541.
237. **Tacket C, Hone D, Losonsky G, Guers L, Edelman R, Levine M** (1992) Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine* 10: 443-446.
238. **Dilts DA, Riesenfeld-Orn I, Fulginiti JP, Ekwall E, Granert C, Nonenmacher J, Brey RN, Cryz SJ, Karlsson K, Bergman K, Thompson T, Hu B, Bruckner AH, Lindberg AA** (2000) Phase I clinical

- trials of *aroA aroD* and *aroA aroD htrA* attenuated *S. typhi* vaccines; effect of formulation on safety and immunogenicity. *Vaccine* 18: 1473-1484.
239. **Tacket CO, Levine MM** (2007) CVD 908, CVD 908-*htrA*, and CVD 909 live oral typhoid vaccines: a logical progression. *Clin Infect Dis* 45 Suppl 1: S20-23.
240. **Tacket C, Sztein M, Losonsky G, Wasserman S, Nataro J, Edelman R, Pickard D, Dougan G, Chatfield S, Levine M** (1997) Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune response in humans. *Infect Immun* 65: 452-456.
241. **Lowe DC, Savidge TC, Pickard D, Eckmann L, Kagnoff MF, Dougan G, Chatfield SN** (1999) Characterization of candidate live oral *Salmonella typhi* vaccine strains harboring defined mutations in *aroA*, *aroC*, and *htrA*. *Infect Immun* 67: 700-707.
242. **Tacket CO, Sztein MB, Wasserman SS, Losonsky G, Kotloff KL, Wyant TL, Nataro JP, Edelman R, Perry J, Bedford P, Brown D, Chatfield S, Dougan G, Levine MM** (2000) Phase 2 clinical trial of attenuated *Salmonella enterica* serovar typhi oral live vector vaccine CVD 908-*htrA* in U.S. volunteers. *Infect Immun* 68: 1196-1201.
243. **Wang JY, Noriega FR, Galen JE, Barry E, Levine MM** (2000) Constitutive expression of the Vi polysaccharide capsular antigen in attenuated *Salmonella enterica* serovar typhi oral vaccine strain CVD 909. *Infect Immun* 68: 4647-4652.
244. **Tacket CO, Pasetti MF, Sztein MB, Livio S, Levine MM** (2004) Immune responses to an oral typhoid vaccine strain that is modified to constitutively express Vi capsular polysaccharide. *J Infect Dis* 190: 565-570.
245. **Wahid R, Pasetti MF, Maciel M, Jr., Simon JK, Tacket CO, Levine MM, Sztein MB** (2011) Oral priming with *Salmonella Typhi* vaccine strain CVD 909 followed by parenteral boost with the *S. Typhi* Vi capsular

- polysaccharide vaccine induces CD27+IgD-*S. Typhi*-specific IgA and IgG B memory cells in humans. *Clin Immunol* 138: 187-200.
246. **Curtiss R, 3rd, Wanda SY, Gunn BM, Zhang X, Tinge SA, Ananthnarayan V, Mo H, Wang S, Kong W** (2009) *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains with regulated delayed attenuation *in vivo*. *Infect Immun* 77: 1071-1082.
247. **Curtiss III R, Kelly SM** (1987) *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect Immun* 55: 3035-3043.
248. **Tacket C, Kelly S, Schödel F, Losonsky G, Nataro J, Edelman R, Levine M, Curtiss Rr** (1997) Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system. *Infect Immun* 65: 3381-3385.
249. **Gunn BM, Wanda SY, Burshell D, Wang C, Curtiss R, 3rd** (2010) Construction of recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine vector strains for safety in newborn and infant mice. *Clin Vaccine Immunol* 17: 354-362.
250. **Lankowski AJ, Hohmann EL** (2007) Killed but metabolically active *Salmonella typhimurium*: application of a new technology to an old vector. *J Infect Dis* 195: 1203-1211.
251. **Hohmann EL, Oletta CA, Killeen KP, Miller SI** (1996) *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J Infect Dis* 173: 1408-1414.
252. **Hohmann EL, Oletta CA, Miller SI** (1996) Evaluation of a *phoP/phoQ*-deleted, *aroA*-deleted live oral *Salmonella typhi* vaccine strain in human volunteers. *Vaccine* 14: 19-24.
253. **Hindle Z, Chatfield S, Phillimore J, Bentley M, Johnson J, Cosgrove C, Ghaem-Maghani M, Sexton A, Khan M, Brennan F, Everest P, Wu T, Pickard D, Holden D, Dougan G, Griffin G, House D, Santangelo J,**

- Khan S, Shea J, Feldman R, Lewis D** (2002) Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. *Infect Immun* 70: 3457-3467.
254. **Kirkpatrick BD, Tenney KM, Larsson CJ, O'Neill JP, Ventrone C, Bentley M, Upton A, Hindle Z, Fidler C, Kutzko D, Holdridge R, Lapointe C, Hamlet S, Chatfield SN** (2005) The novel oral typhoid vaccine M01ZH09 is well tolerated and highly immunogenic in 2 vaccine presentations. *J Infect Dis* 192: 360-366.
255. **Kirkpatrick BD, McKenzie R, O'Neill JP, Larsson CJ, Bourgeois AL, Shimko J, Bentley M, Makin J, Chatfield S, Hindle Z, Fidler C, Robinson BE, Ventrone CH, Bansal N, Carpenter CM, Kutzko D, Hamlet S, LaPointe C, Taylor DN** (2006) Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhi (Ty2 *aroC-ssaV*-) M01ZH09, with a defined mutation in the *Salmonella* pathogenicity island 2, as a live, oral typhoid vaccine in human volunteers. *Vaccine* 24: 116-123.
256. **Negi VD, Singhamahapatra S, Chakravorty D** (2007) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain lacking *pmrG-HM-D* provides excellent protection against salmonellosis in murine typhoid model. *Vaccine* 25: 5315-5323.
257. **Rowe B, Hall M** (1989) Kauffmann-White Scheme 1989. In: Publication PHLS, editor. London, UK: London Public Health Laboratory.
258. **Vollaard AM, Ali S, Widjaja S, Asten HA, Visser LG, Surjadi C, van Dissel JT** (2005) Identification of typhoid fever and paratyphoid fever cases at presentation in outpatient clinics in Jakarta, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 440-450.
259. **Maskey AP, Day JN, Phung QT, Thwaites GE, Campbell JI, Zimmerman M, Farrar JJ, Basnyat B** (2006) *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A and *S. enterica* serovar Typhi cause indistinguishable clinical syndromes in Kathmandu, Nepal. *Clin Infect Dis* 42: 1247-1253.

260. **Arya SC, Sharma KB** (1995) Urgent need for effective vaccine against *Salmonella paratyphi* A, B and C. *Vaccine* 13: 1727-1728.
261. **Stephen J, Mara N, Nathwani D** (1996) Limitations of typhoid vaccination for travellers. *Br J Clin Pract* 50: 468-469.
262. **Levine MM, Black RE, Ferreccio C, Germanier R** (1987) Large-Scale Field Trial of Ty21a Live Oral Typhoid Vaccine in Enteric-Coated Capsule Formulation. *Lancet* 1: 1049-1052.
263. **Black RE, Levine MM, Ferreccio C, Clements ML, Lanata C, Rooney J, Germanier R** (1990) Efficacy of one or two doses of Ty21a *Salmonella typhi* vaccine in enteric-coated capsules in a controlled field trial. Chilean Typhoid Committee. *Vaccine* 8: 81-84.
264. **Simanjuntak CH, Paleologo FP, Punjabi NH, Darmowigoto R, Soeprawoto, Totosudirjo H, Haryanto P, Suprijanto E, Witham ND, Hoffman SL** (1991) Oral immunisation against typhoid fever in Indonesia with Ty21a vaccine. *Lancet* 338: 1055-1059.
265. **Nisini R, Biselli R, Matricardi PM, Fattorossi A, D'Amelio R** (1993) Clinical and immunological response to typhoid vaccination with parenteral or oral vaccines in two groups of 30 recruits. *Vaccine* 11: 582-586.
266. **Levine MM, Ferreccio C, Black RE, Lagos R, San Martin O, Blackwelder WC** (2007) Ty21a live oral typhoid vaccine and prevention of paratyphoid fever caused by *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi B. *Clin Infect Dis* 45 Suppl 1: S24-28.
267. **Wahid R, Simon R, Zafar SJ, Levine MM, Sztein MB** (2012) Live oral typhoid vaccine Ty21a induces cross-reactive humoral immune responses against *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A and *S. Paratyphi* B in humans. *Clin Vaccine Immunol* 19: 825-834.
268. **Pakkanen SH, Kantele JM, Kantele A** (2012) Cross-reactive gut-directed immune response against *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A and B in

- typhoid fever and after oral Ty21a typhoid vaccination. *Vaccine* 30: 6047-6053.
269. **Wang JY, Pasetti MF, Noriega FR, Anderson RJ, Wasserman SS, Galen JE, Sztein MB, Levine MM** (2001) Construction, genotypic and phenotypic characterization, and immunogenicity of attenuated *delta**guaBA* *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 915. *Infect Immun* 69: 4734-4741.
270. **Matsui H, Suzuki M, Isshiki Y, Kodama C, Eguchi M, Kikuchi Y, Motokawa K, Takaya A, Tomoyasu T, Yamamoto T** (2003) Oral immunization with ATP-dependent protease-deficient mutants protects mice against subsequent oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* 71: 30-39.
271. **Gat O, Galen JE, Tennant S, Simon R, Blackwelder WC, Silverman DJ, Pasetti MF, Levine MM** (2011) Cell-associated flagella enhance the protection conferred by mucosally-administered attenuated *Salmonella Paratyphi* A vaccines. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1373.
272. **Feng YL, S-L** (2012) Pathogenic *Salmonella*. In: Yan X, editor. *Omics, Microbial Modelling and Technologies for Foodborne Pathogens*. USA: DEStech Publications, Inc. pp. 43-67.
273. **Eisen JA, Heidelberg JF, White O, Salzberg SL** (2000) Evidence for symmetric chromosomal inversions around the replication origin in bacteria. *Genome Biol* 1: RESEARCH0011.
274. **Tillier ER, Collins RA** (2000) Genome rearrangement by replication-directed translocation. *Nat Genet* 26: 195-197.
275. **Morgan E, Campbell J, Rowe S, Bispham J, Stevens M, Bowen A, Barrow P, Maskell D, Wallis T** (2004) Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 54: 994-1010.
276. **Koser SA** (1968) *Vitamin requirements of bacteria and yeasts*. Springfield, Ill.,: Thomas. viii, 663 p.

277. **Virgilio R, Cordano AM** (1981) Naturally occurring prototrophic strains of *Salmonella typhi*. *Can J Microbiol* 27: 1272-1275.
278. **Fierer J, Fleming W** (1983) Distinctive biochemical features of *Salmonella dublin* isolated in California. *J Clin Microbiol* 17: 552-554.
279. **Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt DJ, Olsen JE** (2000) Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* 125: 229-255.
280. **Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P** (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell* 73: 469-485.
281. **Monack D, Bouley D, Falkow S** (2004) *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1*^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *J Exp Med* 199: 231-241.
282. **Tierrez A, Garcia-del Portillo F** (2005) New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. *Cell Microbiol* 7: 901-909.
283. **Davies RH, Dalziel R, Gibbens JC, Wilesmith JW, Ryan JM, Evans SJ, Byrne C, Paiba GA, Pascoe SJ, Teale CJ** (2004) National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). *J Appl Microbiol* 96: 750-760.
284. **Stevens MP, Humphrey TJ, Maskell DJ** (2009) Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 2709-2723.
285. **De Buck J, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R** (2004) Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J Appl Microbiol* 97: 233-245.
286. **Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F** (2009) Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *FEMS Microbiol Rev* 33: 718-738.

287. **Blaser MJ, Feldman RA** (1981) From the centers for disease control. *Salmonella* bacteremia: reports to the Centers for Disease Control, 1968-1979. *J Infect Dis* 143: 743-746.
288. **Counter DE, Gibson EA** (1980) *Salmonella dublin* infection in self contained dairy herds in East Anglia: excretion at calving. *Vet Rec* 107: 191-193.
289. **Gray JT, Fedorka-Cray PJ, Stabel TJ, Ackermann MR** (1995) Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Vet Microbiol* 47: 43-59.
290. **Xercavins M, Llovet T, Navarro F, Morera MA, More J, Bella F, Freixas N, Simo M, Echeita A, Coll P, Garau J, Prats G** (1997) Epidemiology of an unusually prolonged outbreak of typhoid fever in Terrassa, Spain. *Clin Infect Dis* 24: 506-510.
291. **Buxton A, Fraser G** (1977) *Animal microbiology*. Oxford Eng; Philidelphia: Blackwell Scientific Publications; distributed by Lippincott.
292. **Miller S, Hohmann E, Pegues D** (1995) *Salmonella*. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone. pp. 2013-2033.
293. **Young D, Hussell T, Dougan G** (2002) Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. *Nat Immunol* 3: 1026-1032.
294. **Haraga A, Ohlson M, Miller S** (2008) Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6: 53-66.
295. **Smith JL** (2003) The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J Food Prot* 66: 1292-1303.
296. **Mikkelsen LL, Naughton PJ, Hedemann MS, Jensen BB** (2004) Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70: 3485-3492.

297. **Foster J, Hall H** (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 172: 771-778.
298. **Foster J** (1991) *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J Bacteriol* 173: 6896-6902.
299. **Foster J, Hall H** (1991) Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 173: 5129-5135.
300. **Garcia-del Portillo F, J. W. Foster, and B. B. Finlay** (1993) Role of the acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* 61: 4489-4492.
301. **Foster J** (2000) Microbial Responses to Acid Stress. In: Storz G, Hengge-Aronis R, editors. *Bacterial Stress Responses*. Washington, D.C.: ASM Press. pp. 99-115.
302. **Audia JP, Webb CC, Foster JW** (2001) Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int J Med Microbiol* 291: 97-106.
303. **Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR** (1992) Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 60: 1786-1792.
304. **Selsted M, Miller S, Henschen A, Ouellette A** (1992) Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J Cell Biol* 118: 929-936.
305. **Prouty AM, Brodsky IE, Falkow S, Gunn JS** (2004) Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 150: 775-783.
306. **Bäumler A, Tsolis R, Heffron F** (1996) Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64: 1862-1865.

307. **Takeuchi A** (1967) Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am J Pathol* 50: 109-136.
308. **Francis CL, Starnbach MN, Falkow S** (1992) Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol Microbiol* 6: 3077-3087.
309. **Jepson MA, Clark MA** (2001) The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes Infect* 3: 1183-1190.
310. **Martinez-Argudo I, Jepson MA** (2008) *Salmonella* translocates across an *in vitro* M cell model independently of SPI-1 and SPI-2. *Microbiology* 154: 3887-3894.
311. **Kohbata S, H. Yokoyama, and E. Yabuuchi** (1986) Cytopathogenic effects of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cells off murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol Immunol* 30: 1225-1237.
312. **Jones B, N. Ghorri, and S. Falkow** (1994) *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by destroying and penetrating the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180: 15-23.
313. **Monack D, Mueller A, Falkow S** (2004) Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* 2: 747-765.
314. **de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ** (2012) Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog* 8: e1002933.
315. **Paesold G, Guiney D, Eckmann L, Kagnoff M** (2002) Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 4: 771-781.
316. **Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Bäumler A, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks W, Fang F** (1999) Extraintestinal

- dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 401: 804-808.
317. **Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P** (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2: 361-367.
318. **Ibarra J, Steele-Mortimer O** (2009) *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol* 11: 1579-1586.
319. **Jepson MA, Collares-Buzato CB, Clark MA, Hirst BH, Simmons NL** (1995) Rapid disruption of epithelial barrier function by *Salmonella typhimurium* is associated with structural modification of intercellular junctions. *Infect Immun* 63: 356-359.
320. **McCormick B, Miller S, Carnes D, Madara J** (1995) Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect Immun* 63: 2302-2309.
321. **Pegues D, Ohl M, Miller S** (2005) *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. New York: Churchill Livingstone. pp. 2636-2654.
322. **McCormick BA, Hofman PM, Kim J, Carnes DK, Miller SI, Madara JL** (1995) Surface attachment of *Salmonella typhimurium* to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils. *J Cell Biol* 131: 1599-1608.
323. **Galán J, Curtiss Rr** (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6383-6387.
324. **Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE** (1997) Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and

- cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 159: 5550-5559.
325. **Zhang S, Santos R, Tsolis R, Stender S, Hardt W, Bäuml A, Adams L** (2002) The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun* 70: 3843-3855.
326. **Raffatellu M, Wilson R, Chessa D, Andrews-Polymeris H, Tran Q, Lawhon S, Khare S, Adams L, Bäuml A** (2005) SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype typhimurium invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 73: 146-154.
327. **Stecher B, Macpherson AJ, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD** (2005) Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. *Infect Immun* 73: 3228-3241.
328. **Knodler LA, Vallance BA, Celli J, Winfree S, Hansen B, Montero M, Steele-Mortimer O** (2010) Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17733-17738.
329. **Voedisch S, Koenecke C, David S, Herbrand H, Forster R, Rhen M, Pabst O** (2009) Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infect Immun* 77: 3170-3180.
330. **Mastroeni P, Grant AJ** (2011) Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. *Expert Rev Mol Med* 13: e12.
331. **Tsolis R, Young G, Solnick J, Bäuml A** (2008) From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nat Rev Microbiol* 6: 883-892.
332. **Alpuche-Aranda C, Racoosin E, Swanson J, Miller S** (1994) *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 179: 601-608.

333. **Miller S, Kukral A, Mekalanos J** (1989) A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 5054-5058.
334. **Alpuche-Aranda C, Swanson J, Loomis W, Miller S** (1992) *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 10079-10083.
335. **Ochman H, Soncini F, Solomon F, Groisman E** (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 7800-7804.
336. **Shea J, Hensel M, Gleeson C, Holden D** (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 2593-2597.
337. **Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, Mastroeni P, Fang FC** (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. Science 287: 1655-1658.
338. **Miao EA, Freeman JA, Miller SI** (2002) Transcription of the SsrAB regulon is repressed by alkaline pH and is independent of PhoPQ and magnesium concentration. J Bacteriol 184: 1493-1497.
339. **Bader MW, Navarre WW, Shiau W, Nikaido H, Frye JG, McClelland M, Fang FC, Miller SI** (2003) Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. Mol Microbiol 50: 219-230.
340. **Kumar Y, Valdivia RH** (2009) Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. Cell Host Microbe 5: 593-601.
341. **Garai P, Gnanadhas DP, Chakravorty D** (2012) *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of host-pathogen interactions. Virulence 3: 377-388.

342. **Deiwick J, Salcedo SP, Boucrot E, Gilliland SM, Henry T, Petermann N, Waterman SR, Gorvel JP, Holden DW, Meresse S** (2006) The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect Immun* 74: 6965-6972.
343. **Abrahams GL, Muller P, Hensel M** (2006) Functional dissection of SseF, a type III effector protein involved in positioning the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* 7: 950-965.
344. **Ramsden AE, Mota LJ, Munter S, Shorte SL, Holden DW** (2007) The SPI-2 type III secretion system restricts motility of *Salmonella*-containing vacuoles. *Cell Microbiol* 9: 2517-2529.
345. **Garcia-del Portillo F, Zwick MB, Leung KY, Finlay BB** (1993) *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10544-10548.
346. **Beuzón C, Salcedo S, Holden D** (2002) Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *sifA* mutant strain in the cytosol of different host cell lines. *Microbiology* 148: 2705-2715.
347. **Salcedo SP, Holden DW** (2003) SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *EMBO J* 22: 5003-5014.
348. **Beuzon CR, Meresse S, Unsworth KE, Ruiz-Albert J, Garvis S, Waterman SR, Ryder TA, Boucrot E, Holden DW** (2000) *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *Embo J* 19: 3235-3249.
349. **Stein MA, Leung KY, Zwick M, Garcia-del Portillo F, Finlay BB** (1996) Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol* 20: 151-164.

350. **Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH** (2006) Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *J Biol Chem* 281: 11374-11383.
351. **Perrin AJ, Jiang X, Birmingham CL, So NS, Brumell JH** (2004) Recognition of bacteria in the cytosol of mammalian cells by the ubiquitin system. *Curr Biol* 14: 806-811.
352. **Carrol ME, Jackett PS, Aber VR, Lowrie DB** (1979) Phagolysosome formation, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and the fate of *Salmonella typhimurium* within mouse peritoneal macrophages. *J Gen Microbiol* 110: 421-429.
353. **Buchmeier NA, Heffron F** (1991) Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 59: 2232-2238.
354. **Oh YK, Alpuche-Aranda C, Berthiaume E, Jinks T, Miller SI, Swanson JA** (1996) Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64: 3877-3883.
355. **Drecktrah D, Knodler LA, Howe D, Steele-Mortimer O** (2007) *Salmonella* trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic* 8: 212-225.
356. **Rathman M, M. D. Sjaastad, and S. Falkow** (1996) Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect Immun* 64: 2765-2773.
357. **Martin-Orozco N, Touret N, Zaharik ML, Park E, Kopelman R, Miller S, Finlay BB, Gros P, Grinstein S** (2006) Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Mol Biol Cell* 17: 498-510.
358. **Fields P, Groisman E, Heffron F** (1989) A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 243: 1059-1062.

359. **Miller SI, Mekalanos JJ** (1990) Constitutive expression of the *phoP* regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J Bacteriol* 172: 2485-2490.
360. **Nickerson C, Curtiss Rr** (1997) Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun* 65: 1814-1823.
361. **Bearson BL, Wilson L, Foster JW** (1998) A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol* 180: 2409-2417.
362. **Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, Marino M, Fang F, Dinauer M, Nathan C** (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 10: 29-38.
363. **Gunn J, Ryan S, Van Velkinburgh J, Ernst R, Miller S** (2000) Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* 68: 6139-6146.
364. **Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC** (2000) Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages *in vitro*. *J Exp Med* 192: 227-236.
365. **Chakravortty D, Hansen-Wester I, Hensel M** (2002) *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med* 195: 1155-1166.
366. **Janssen R, van der Straaten T, van Diepen A, van Dissel JT** (2003) Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Microbes Infect* 5: 527-534.
367. **Hisert KB, MacCoss M, Shiloh MU, Darwin KH, Singh S, Jones RA, Ehrt S, Zhang Z, Gaffney BL, Gandotra S, Holden DW, Murray D,**

- Nathan C** (2005) A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol* 56: 1234-1245.
368. **Fields P, Swanson R, Haidaris C, Heffron F** (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 5189-5193.
369. **Humphreys S, Stevenson A, Bacon A, Weinhardt AB, Roberts M** (1999) The alternative sigma factor, sigmaE, is critically important for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 67: 1560-1568.
370. **Rosenberger C, Gallo R, Finlay B** (2004) Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2422-2427.
371. **Sinnott CR, Teall AJ** (1987) Persistent gallbladder carriage of *Salmonella typhi*. *Lancet* 1: 976.
372. **Wain J, Pham VB, Ha V, Nguyen NM, To SD, Walsh AL, Parry CM, Hasserjian RP, HoHo VA, Tran TH, Farrar J, White NJ, Day NP** (2001) Quantitation of bacteria in bone marrow from patients with typhoid fever: relationship between counts and clinical features. *J Clin Microbiol* 39: 1571-1576.
373. **Crawford RW, Rosales-Reyes R, Ramirez-Aguilar Mde L, Chapa-Azuela O, Alpuche-Aranda C, Gunn JS** (2010) Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4353-4358.
374. **Srifuengfung S, Chokephaibulkit K, Yungyuen T, Tribuddharat C** (2005) *Salmonella* meningitis and antimicrobial susceptibilities. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 312-316.
375. **Guiney D** (2005) The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 289: 131-150.

376. **Brown SP, Cornell SJ, Sheppard M, Grant AJ, Maskell DJ, Grenfell BT, Mastroeni P** (2006) Intracellular demography and the dynamics of *Salmonella enterica* infections. *PLoS Biol* 4: e349.
377. **Grant AJ, Sheppard M, Deardon R, Brown SP, Foster G, Bryant CE, Maskell DJ, Mastroeni P** (2008) Caspase-3-dependent phagocyte death during systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of mice. *Immunology* 125: 28-37.
378. **Menendez A, Arena ET, Guttman JA, Thorson L, Vallance BA, Vogl W, Finlay BB** (2009) *Salmonella* infection of gallbladder epithelial cells drives local inflammation and injury in a model of acute typhoid fever. *J Infect Dis* 200: 1703-1713.
379. **Sheppard M, Webb C, Heath F, Mallovs V, Emilianus R, Maskell D, Mastroeni P** (2003) Dynamics of bacterial growth and distribution within the liver during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol* 5: 593-600.
380. **Richter-Dahlfors A, Buchan AM, Finlay BB** (1997) Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes *in vivo*. *J Exp Med* 186: 569-580.
381. **Yrlid U, Svensson M, Hakansson A, Chambers BJ, Ljunggren HG, Wick MJ** (2001) *In vivo* activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 69: 5726-5735.
382. **Dragunsky EM, Rivera E, Hochstein HD, Levenbook IS** (1990) *In vitro* characterization of *Salmonella typhi* mutant strains for live oral vaccines. *Vaccine* 8: 263-268.
383. **Mills D, Bajaj V, Lee C** (1995) A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* 15: 749-759.

384. **Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M, Parkhill J** (2009) DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* 25: 119-120.
385. **Forsdyke DR** (1996) Different biological species "broadcast" their DNAs at different (G+C)% "wavelengths". *J Theor Biol* 178: 405-417.
386. **Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF** (2003) Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J Bacteriol* 185: 3624-3635.
387. **Cheetham BF, Katz ME** (1995) A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol Microbiol* 18: 201-208.
388. **Hensel M, Shea J, Bäumlner A, Gleeson C, Blattner F, Holden D** (1997) Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 179: 1105-1111.
389. **Eswarappa S, Janice J, Nagarajan A, Balasundaram S, Karnam G, Dixit N, Chakravorty D** (2008) Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*. *PLoS ONE* 3: e3829.
390. **Shah D, Lee M, Park J, Lee J, Eo S, Kwon J, Chae J** (2005) Identification of *Salmonella gallinarum* virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* 151: 3957-3968.
391. **Vernikos G, Parkhill J** (2006) Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics* 22: 2196-2203.
392. **Fuentes J, Villagra N, Castillo-Ruiz M, Mora G** (2008) The *Salmonella Typhi hlyE* gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to *S. Typhimurium* promotes deep organ infection in mice. *Res Microbiol* 159: 279-287.

393. **Blondel C, Jimenez J, Contreras I, Santiviago C** (2009) Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics* 10: 354.
394. **Hensel M, Nikolaus T, Egelseer C** (1999) Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 31: 489-498.
395. **Selander R, Li J, Nelson K** (1996) Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*. In: Neidhardt F, editor. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press. pp. 2691-2707.
396. **Edwards R, Olsen G, Maloy S** (2002) Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends Microbiol* 10: 94-99.
397. **Chan K, Baker S, Kim CC, Detweiler CS, Dougan G, Falkow S** (2003) Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 185: 553-563.
398. **Fang FC, DeGroot MA, Foster JW, Baumler AJ, Ochsner U, Testerman T, Bearson S, Giard JC, Xu Y, Campbell G, Laessig T** (1999) Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7502-7507.
399. **Figuroa-Bossi N, Bossi L** (1999) Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Mol Microbiol* 33: 167-176.
400. **Ehrbar K, Hardt W** (2005) Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect Genet Evol* 5: 1-9.
401. **Chaudhuri R, Pallen M** (2006) xBASE, a collection of online databases for bacterial comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 34: D335-337.
402. **McGhie E, Brawn L, Hume P, Humphreys D, Koronakis V** (2009) *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* 12: 117-124.

403. **Janakiraman A, Slauch JM** (2000) The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 35: 1146-1155.
404. **Galán J, Collmer A** (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.
405. **Galán J** (1999) Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol* 2: 46-50.
406. **Chen L, Kaniga K, Galán J** (1996) *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* 21: 1101-1115.
407. **Knodler LA, Finlay BB, Steele-Mortimer O** (2005) The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J Biol Chem* 280: 9058-9064.
408. **Jones RM, Wu H, Wentworth C, Luo L, Collier-Hyams L, Neish AS** (2008) *Salmonella* AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade. *Cell Host Microbe* 3: 233-244.
409. **Galán J** (2001) *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 53-86.
410. **Fu Y, Galan JE** (1999) A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401: 293-297.
411. **Brawn LC, Hayward RD, Koronakis V** (2007) *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe* 1: 63-75.
412. **Humphreys D, Hume PJ, Koronakis V** (2009) The *Salmonella* effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche. *Cell Host Microbe* 5: 225-233.

413. **Hardt W, Galán J** (1997) A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 9887-9892.
414. **Hensel M, Shea J, Waterman S, Mundy R, Nikolaus T, Banks G, Vazquez-Torres A, Gleeson C, Fang F, Holden D** (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. Mol Microbiol 30: 163-174.
415. **Bijlsma JJ, Groisman EA** (2005) The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. Mol Microbiol 57: 85-96.
416. **Gunn J, Alpuche-Aranda C, Loomis W, Belden W, Miller S** (1995) Characterization of the *Salmonella typhimurium pagC/pagD* chromosomal region. J Bacteriol 177: 5040-5047.
417. **Lucas RL, Lostroh CP, DiRusso CC, Spector MP, Wanner BL, Lee CA** (2000) Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. J Bacteriol 182: 1872-1882.
418. **Marcus S, Brumell J, Pfeifer C, Finlay B** (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes Infect 2: 145-156.
419. **Kuhle V, Hensel M** (2004) Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. Cell Mol Life Sci 61: 2812-2826.
420. **Brumell JH, Kujat-Choy S, Brown NF, Vallance BA, Knodler LA, Finlay BB** (2003) SopD2 is a novel type III secreted effector of *Salmonella typhimurium* that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. Traffic 4: 36-48.

421. **Geddes K, Worley M, Niemann G, Heffron F** (2005) Identification of new secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 73: 6260-6271.
422. **Figueira R, Holden DW** (2012) Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology* 158: 1147-1161.
423. **Cordero-Alba M, Bernal-Bayard J, Ramos-Morales F** (2012) SrfJ, a *Salmonella* type III secretion system effector regulated by PhoP, RcsB, and IolR. *J Bacteriol* 194: 4226-4236.
424. **Figueira R, Watson KG, Holden DW, Helaine S** (2013) Identification of *Salmonella* Pathogenicity Island-2 Type III Secretion System Effectors Involved in Intramacrophage Replication of *S. enterica* Serovar Typhimurium: Implications for Rational Vaccine Design. *MBio* 4: e00065.
425. **Kuhle V, Hensel M** (2002) SseF and SseG are translocated effectors of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 that modulate aggregation of endosomal compartments. *Cell Microbiol* 4: 813-824.
426. **Kuhle V, Jackel D, Hensel M** (2004) Effector proteins encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2 interfere with the microtubule cytoskeleton after translocation into host cells. *Traffic* 5: 356-370.
427. **Boucrot E, Henry T, Borg JP, Gorvel JP, Meresse S** (2005) The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science* 308: 1174-1178.
428. **Brumell JH, Scidmore MA** (2007) Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 636-652.
429. **Jackson LK, Nawabi P, Hentea C, Roark EA, Haldar K** (2008) The *Salmonella* virulence protein SifA is a G protein antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14141-14146.
430. **Gallois A, Klein JR, Allen LA, Jones BD, Nauseef WM** (2001) *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system

- mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane. *J Immunol* 166: 5741-5748.
431. **Forest CG, Ferraro E, Sabbagh SC, Daigle F** (2010) Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2. *Microbiology* 156: 3689-3698.
432. **Hensel M, Hinsley A, Nikolaus T, Sawers G, Berks B** (1999) The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 32: 275-287.
433. **Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, Crawford RW, Russell JM, Bevins CL, Adams LG, Tsolis RM, Roth JR, Baumler AJ** (2010) Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 467: 426-429.
434. **Hansen-Wester I, Chakravorty D, Hensel M** (2004) Functional transfer of *Salmonella* pathogenicity island 2 to *Salmonella bongori* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 72: 2879-2888.
435. **Soncini FC, Garcia Vescovi E, Solomon F, Groisman EA** (1996) Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J Bacteriol* 178: 5092-5099.
436. **Moncrief MB, Maguire ME** (1998) Magnesium and the role of MgtC in growth of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 66: 3802-3809.
437. **Groisman EA** (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 183: 1835-1842.
438. **Blanc-Potard AB, Groisman EA** (1997) The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* 16: 5376-5385.
439. **Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA** (1999) The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 181: 998-1004.

440. **Dorsey C, Laarakker M, Humphries A, Weening E, Bäumler A** (2005) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* 57: 196-211.
441. **Tükel C, Akçelik M, de Jong M, Simsek O, Tsolis R, Bäumler A** (2007) MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Bacteriol* 189: 3922-3926.
442. **Wong K, McClelland M, Stillwell L, Sisk E, Thurston S, Saffer J** (1998) Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Infect Immun* 66: 3365-3371.
443. **Gerlach R, Jäckel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, Hardt W, Hensel M** (2007) *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* 9: 1834-1850.
444. **Morgan E, Bowen A, Carnell S, Wallis T, Stevens M** (2007) SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infect Immun* 75: 1524-1533.
445. **Gerlach R, Cláudio N, Rohde M, Jäckel D, Wagner C, Hensel M** (2008) Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol* 10: 2364-2376.
446. **Wood M, Jones M, Watson P, Hedges S, Wallis T, Galyov E** (1998) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 29: 883-891.
447. **Hong KH, Miller VL** (1998) Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella ipgDE*. *J Bacteriol* 180: 1793-1802.
448. **Knodler LA, Celli J, Hardt WD, Vallance BA, Yip C, Finlay BB** (2002) *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially

- expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol Microbiol* 43: 1089-1103.
449. **Miki T, Shibagaki Y, Danbara H, Okada N** (2009) Functional characterization of SsaE, a novel chaperone protein of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 191: 6843-6854.
450. **Folkesson A, Advani A, Sukupolvi S, Pfeifer J, Normark S, Löfdahl S** (1999) Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. *Mol Microbiol* 33: 612-622.
451. **Folkesson A, Löfdahl S, Normark S** (2002) The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol* 153: 537-545.
452. **Lambert M, Smith S** (2008) The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol* 8: 142.
453. **Townsend S, Kramer N, Edwards R, Baker S, Hamlin N, Simmonds M, Stevens K, Maloy S, Parkhill J, Dougan G, Bäumlér A** (2001) *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* 69: 2894-2901.
454. **Chan K, Kim CC, Falkow S** (2005) Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect Immun* 73: 5438-5449.
455. **Lawley T, Chan K, Thompson L, Kim C, Govoni G, Monack D** (2006) Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2: e11.
456. **Klumpp J, Fuchs T** (2007) Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. *Microbiology* 153: 1207-1220.

457. **Haneda T, Ishii Y, Danbara H, Okada N** (2009) Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol Lett* 297: 241-249.
458. **Mulder DT, Cooper CA, Coombes BK** (2012) Type VI secretion system-associated gene clusters contribute to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 80: 1996-2007.
459. **Pezoa D, Yang HJ, Blondel CJ, Santiviago CA, Andrews-Polymenis HL, Contreras I** (2013) The Type VI Secretion System Encoded in SPI-6 Plays a Role in Gastrointestinal Colonization and Systemic Spread of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the Chicken. *PLoS One* 8: e63917.
460. **Wang M, Luo Z, Du H, Xu S, Ni B, Zhang H, Sheng X, Xu H, Huang X** (2011) Molecular characterization of a functional type VI secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Curr Microbiol* 63: 22-31.
461. **Libby SJ, Brehm MA, Greiner DL, Shultz LD, McClelland M, Smith KD, Cookson BT, Karlinsey JE, Kinkel TL, Porwollik S, Canals R, Cummings LA, Fang FC** (2010) Humanized nonobese diabetic-*scid* *IL2rgamma*^{null} mice are susceptible to lethal *Salmonella Typhi* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15589-15594.
462. **Hansen-Wester I, Hensel M** (2002) Genome-based identification of chromosomal regions specific for *Salmonella* spp. *Infect Immun* 70: 2351-2360.
463. **Pickard D, Wain J, Baker S, Line A, Chohan S, Fookes M, Barron A, Gaora P, Chabalgoity J, Thanky N, Scholes C, Thomson N, Quail M, Parkhill J, Dougan G** (2003) Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol* 185: 5055-5065.
464. **Bueno SM, Santiviago CA, Murillo AA, Fuentes JA, Trombert AN, Rodas PI, Youderian P, Mora GC** (2004) Precise excision of the large

- pathogenicity island, SPI7, in *Salmonella enterica* serovar Typhi. J Bacteriol 186: 3202-3213.
465. **Hashimoto Y, Li N, Yokoyama H, Ezaki T** (1993) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of ViaB region encoding Vi antigen in *Salmonella typhi*. J Bacteriol 175: 4456-4465.
466. **Zhang X, Tsui I, Yip C, Fung A, Wong D, Dai X, Yang Y, Hackett J, Morris C** (2000) *Salmonella enterica* serovar typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. Infect Immun 68: 3067-3073.
467. **Miold S, Rabsch W, Rohde M, Stender S, Tschäpe H, Rüssmann H, Igwe E, Hardt W** (1999) Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 9845-9850.
468. **Hardt W, Urlaub H, Galán J** (1998) A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 2574-2579.
469. **Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo J, Gamazo C, Penadés J, Lasa I** (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Mol Microbiol 58: 1322-1339.
470. **Edwards R, Matlock B, Heffernan B, Maloy S** (2001) Genomic analysis and growth-phase-dependent regulation of the SEF14 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Microbiology 147: 2705-2715.
471. **Bishop A, Baker S, Jenks S, Fookes M, Gaora P, Pickard D, Anjum M, Farrar J, Hien T, Ivens A, Dougan G** (2005) Analysis of the hypervariable region of the *Salmonella enterica* genome associated with tRNA(*leuX*). J Bacteriol 187: 2469-2482.
472. **Faucher S, Viau C, Gros P, Daigle F, Le Moual H** (2008) The *prpZ* gene cluster encoding eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases is repressed by oxidative stress and involved in *Salmonella enterica* serovar

- Typhi survival in human macrophages. *FEMS Microbiol Lett* 281: 160-166.
473. **Spanò S, Ugalde J, Galán J** (2008) Delivery of a *Salmonella Typhi* exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* 3: 30-38.
474. **Miao E, Scherer C, Tsolis R, Kingsley R, Adams L, Bäuml A, Miller S** (1999) *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* 34: 850-864.
475. **Slauch J, Lee A, Mahan M, Mekalanos J** (1996) Molecular characterization of the *oafA* locus responsible for acetylation of *Salmonella typhimurium* O-antigen: *oafA* is a member of a family of integral membrane trans-acylases. *J Bacteriol* 178: 5904-5909.
476. **Tomljenovic-Berube AM, Henriksbo B, Porwollik S, Cooper CA, Tuinema BR, McClelland M, Coombes BK** (2013) Mapping and regulation of genes within SPI-12 that contribute to *in vivo* fitness of *Salmonella Typhimurium*. *Infect Immun* 81: 2394-2404.
477. **Shi L, Adkins JN, Coleman JR, Schepmoes AA, Dohnkova A, Mottaz HM, Norbeck AD, Purvine SO, Manes NP, Smallwood HS, Wang H, Forbes J, Gros P, Uzzau S, Rodland KD, Heffron F, Smith RD, Squier TC** (2006) Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar typhimurium inside macrophages. *J Biol Chem* 281: 29131-29140.
478. **Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton J** (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47: 103-118.
479. **Bogomolnaya L, Santiviago C, Yang H, Baumler A, Andrews-Polymenis H** (2008) 'Form variation' of the O12 antigen is critical for

- persistence of *Salmonella Typhimurium* in the murine intestine. Mol Microbiol 70: 1105-1119.
480. **Faucher S, Forest C, Béland M, Daigle F** (2009) A novel PhoP-regulated locus encoding the cytolysin ClyA and the secreted invasin TaiA of *Salmonella enterica* serovar Typhi is involved in virulence. Microbiology 155: 477-488.
481. **del Castillo F, Leal S, Moreno F, del Castillo I** (1997) The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. Mol Microbiol 25: 107-115.
482. **Green J, Baldwin M** (1997) The molecular basis for the differential regulation of the *hlyE*-encoded haemolysin of *Escherichia coli* by FNR and HlyX lies in the improved activating region 1 contact of HlyX. Microbiology 143 (Pt 12): 3785-3793.
483. **Oscarsson J, Mizunoe Y, Li L, Lai XH, Wieslander A, Uhlin BE** (1999) Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. Mol Microbiol 32: 1226-1238.
484. **Oscarsson J, Westermarck M, Löfdahl S, Olsen B, Palmgren H, Mizunoe Y, Wai S, Uhlin B** (2002) Characterization of a pore-forming cytotoxin expressed by *Salmonella enterica* serovars typhi and paratyphi A. Infect Immun 70: 5759-5769.
485. **von Rhein C, Bauer S, Lopez Sanjurjo EJ, Benz R, Goebel W, Ludwig A** (2009) ClyA cytolysin from *Salmonella*: distribution within the genus, regulation of expression by SlyA, and pore-forming characteristics. Int J Med Microbiol 299: 21-35.
486. **Kingsley R, Abi Ghanem D, Puebla-Osorio N, Keestra A, Berghman L, Bäumlér A** (2004) Fibronectin binding to the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA autotransporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. J Bacteriol 186: 4931-4939.
487. **Kingsley R, Keestra A, de Zoete M, Bäumlér A** (2004) The ShdA adhesin binds to the cationic cradle of the fibronectin 13FnIII repeat

- module: evidence for molecular mimicry of heparin binding. *Mol Microbiol* 52: 345-355.
488. **Kingsley R, Humphries A, Weening E, De Zoete M, Winter S, Papaconstantinou A, Dougan G, Bäuml A** (2003) Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun* 71: 629-640.
489. **Kolyva S, Waxin H, Popoff M** (1992) The Vi antigen of *Salmonella typhi*: molecular analysis of the *viaB* locus. *J Gen Microbiol* 138: 297-304.
490. **Houng HS, Noon KF, Ou JT, Baron LS** (1992) Expression of Vi antigen in *Escherichia coli* K-12: characterization of ViaB from *Citrobacter freundii* and identity of ViaA with RcsB. *J Bacteriol* 174: 5910-5915.
491. **Pickard D, Li J, Roberts M, Maskell D, Hone D, Levine M, Dougan G, Chatfield S** (1994) Characterization of defined *ompR* mutants of *Salmonella typhi*: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infect Immun* 62: 3984-3993.
492. **Virlogeux I, Waxin H, Ecobichon C, Popoff M** (1995) Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology* 141 (Pt 12): 3039-3047.
493. **Wain J, House D, Zafar A, Baker S, Nair S, Kidgell C, Bhutta Z, Dougan G, Hasan R** (2005) Vi antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi clinical isolates from Pakistan. *J Clin Microbiol* 43: 1158-1165.
494. **Nair S, Alokam S, Kothapalli S, Porwollik S, Proctor E, Choy C, McClelland M, Liu S, Sanderson K** (2004) *Salmonella enterica* serovar Typhi strains from which SPI7, a 134-kilobase island with genes for Vi exopolysaccharide and other functions, has been deleted. *J Bacteriol* 186: 3214-3223.
495. **Sharma A, Qadri A** (2004) Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and

- suppresses early inflammatory responses. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 17492-17497.
496. **Wilson RP, Raffatellu M, Chessa D, Winter SE, Tukel C, Baumler AJ** (2008) The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. Cell Microbiol 10: 876-890.
497. **Mastroeni P** (2002) Immunity to systemic *Salmonella* infections. Curr Mol Med 2: 393-406.
498. **Looney R, Steigbigel R** (1986) Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense *in vitro*. J Lab Clin Med 108: 506-516.
499. **Hirose K, Ezaki T, Miyake M, Li T, Khan A, Kawamura Y, Yokoyama H, Takami T** (1997) Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted *Salmonella typhi* strains in cultured macrophage expressing different levels of CD14 antigen. FEMS Microbiol Lett 147: 259-265.
500. **Miyake M, Zhao L, Ezaki T, Hirose K, Khan A, Kawamura Y, Shima R, Kamijo M, Masuzawa T, Yanagihara Y** (1998) Vi-deficient and nonfimbriated mutants of *Salmonella typhi* agglutinate human blood type antigens and are hyperinvasive. FEMS Microbiol Lett 161: 75-82.
501. **Arricau N, Hermant D, Waxin H, Ecobichon C, Duffey P, Popoff M** (1998) The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. Mol Microbiol 29: 835-850.
502. **Zhao L, Ezak T, Li ZY, Kawamura Y, Hirose K, Watanabe H** (2001) Vi-Suppressed wild strain *Salmonella typhi* cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches. Microbiol Immunol 45: 149-158.
503. **Raffatellu M, Chessa D, Wilson R, Dusold R, Rubino S, Bäumlner A** (2005) The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. Infect Immun 73: 3367-3374.

504. **Winter SE, Raffatellu M, Wilson RP, Russmann H, Baumler AJ** (2008) The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. *Cell Microbiol* 10: 247-261.
505. **Raffatellu M, Chessa D, Wilson R, Tükel C, Akçelik M, Bäuml A** (2006) Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun* 74: 19-27.
506. **Silverman M, Simon M** (1980) Phase variation: genetic analysis of switching mutants. *Cell* 19: 845-854.
507. **Lederberg J, Iino T** (1956) Phase Variation in *Salmonella*. *Genetics* 41: 743-757.
508. **Simon M, Zieg J, Silverman M, Mandel G, Doolittle R** (1980) Phase variation: evolution of a controlling element. *Science* 209: 1370-1374.
509. **Frankel G, Newton S, Schoolnik G, Stocker B** (1989) Unique sequences in region VI of the flagellin gene of *Salmonella typhi*. *Mol Microbiol* 3: 1379-1383.
510. **Baker S, Hardy J, Sanderson K, Quail M, Goodhead I, Kingsley R, Parkhill J, Stocker B, Dougan G** (2007) A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella Typhi*. *PLoS Pathog* 3: e59.
511. **Baker S, Holt K, Whitehead S, Goodhead I, Perkins T, Stocker B, Hardy J, Dougan G** (2007) A linear plasmid truncation induces unidirectional flagellar phase change in H:z66 positive *Salmonella Typhi*. *Mol Microbiol* 66: 1207-1218.
512. **Jones G, Richardson L, Uhlman D** (1981) The invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. *J Gen Microbiol* 127: 351-360.
513. **Jones BD, Lee CA, Falkow S** (1992) Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun* 60: 2475-2480.

514. **Stecher B, Hapfelmeier S, Muller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD** (2004) Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun* 72: 4138-4150.
515. **Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A** (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099-1103.
516. **Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL** (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167: 1882-1885.
517. **Zeng H, Carlson AQ, Guo Y, Yu Y, Collier-Hyams LS, Madara JL, Gewirtz AT, Neish AS** (2003) Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J Immunol* 171: 3668-3674.
518. **Vijay-Kumar M, Wu H, Jones R, Grant G, Babbitt B, King TP, Kelly D, Gewirtz AT, Neish AS** (2006) Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *Am J Pathol* 169: 1686-1700.
519. **Miao EA, Alpujch-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A** (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* 7: 569-575.
520. **Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Nunez G** (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in *Salmonella*-infected macrophages. *Nat Immunol* 7: 576-582.
521. **Ren T, Zamboni DS, Roy CR, Dietrich WF, Vance RE** (2006) Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and *Naip5*-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog* 2: e18.

522. **Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A** (2007) TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol* 29: 275-288.
523. **Sun YH, Rolan HG, Tsolis RM** (2007) Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Biol Chem* 282: 33897-33901.
524. **Lockman H, Curtiss Rr** (1990) *Salmonella typhimurium* mutants lacking flagella or motility remain virulent in BALB/c mice. *Infect Immun* 58: 137-143.
525. **Schmitt C, Ikeda J, Darnell S, Watson P, Bispham J, Wallis T, Weinstein D, Metcalf E, O'Brien A** (2001) Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun* 69: 5619-5625.
526. **Winter SE, Thiennimitr P, Nuccio SP, Haneda T, Winter MG, Wilson RP, Russell JM, Henry T, Tran QT, Lawhon SD, Gomez G, Bevins CL, Russmann H, Monack DM, Adams LG, Baumler AJ** (2009) Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype typhimurium infection. *Infect Immun* 77: 1904-1916.
527. **Weening E, Barker J, Laarakker M, Humphries A, Tsolis R, Bäumlér A** (2005) The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect Immun* 73: 3358-3366.
528. **Collinson SK, Doig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW** (1993) Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J Bacteriol* 175: 12-18.
529. **Kukkonen M, Raunio T, Virkola R, Lahteenmaki K, Makela PH, Klemm P, Clegg S, Korhonen TK** (1993) Basement membrane

- carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Mol Microbiol* 7: 229-237.
530. **Bäumler A, Tsois R, Heffron F** (1997) Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Adv Exp Med Biol* 412: 149-158.
531. **Dibb-Fuller MP, Allen-Vercoe E, Thorns CJ, Woodward MJ** (1999) Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology* 145 (Pt 5): 1023-1031.
532. **Chessa D, Dorsey CW, Winter M, Baumler AJ** (2008) Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *J Biol Chem* 283: 8118-8124.
533. **Chessa D, Winter MG, Nuccio SP, Tükel C, Baumler AJ** (2008) RosE represses Std fimbrial expression in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Mol Microbiol* 68: 573-587.
534. **Chessa D, Winter MG, Jakomin M, Baumler AJ** (2009) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha(1,2)fucose residues in the cecal mucosa. *Mol Microbiol* 71: 864-875.
535. **Bäumler A, Tsois R, Bowe F, Kusters J, Hoffmann S, Heffron F** (1996) The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun* 64: 61-68.
536. **Tükel C, Raffatellu M, Humphries A, Wilson R, Andrews-Polymenis H, Gull T, Figueiredo J, Wong M, Michelsen K, Akçelik M, Adams L, Bäumler A** (2005) CsgA is a pathogen-associated molecular pattern of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium that is recognized by Toll-like receptor 2. *Mol Microbiol* 58: 289-304.
537. **Romling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta WD, Normark S** (1998) Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and

- Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. J Bacteriol 180: 722-731.
538. **Boddicker JD, Ledebor NA, Jagnow J, Jones BD, Clegg S** (2002) Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the *fimH* gene of the *fim* gene cluster. Mol Microbiol 45: 1255-1265.
539. **Ledebor NA, Frye JG, McClelland M, Jones BD** (2006) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. Infect Immun 74: 3156-3169.
540. **Pier G, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn S, Banting G, Ratcliff R, Evans M, Colledge W** (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. Nature 393: 79-82.
541. **Tsui IS, Yip CM, Hackett J, Morris C** (2003) The type IVB pili of *Salmonella enterica* serovar Typhi bind to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Infect Immun 71: 6049-6050.
542. **Pan Q, Zhang X, Wu H, He P, Wang F, Zhang M, Hu J, Xia B, Wu J** (2005) Aptamers that preferentially bind type IVB pili and inhibit human monocytic-cell invasion by *Salmonella enterica* serovar typhi. Antimicrob Agents Chemother 49: 4052-4060.
543. **Harris J, Baresch-Bernal A, Rollins S, Alam A, LaRocque R, Bikowski M, Peppercorn A, Handfield M, Hillman J, Qadri F, Calderwood S, Hohmann E, Breiman R, Brooks W, Ryan E** (2006) Identification of *in vivo*-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. Infect Immun 74: 5161-5168.
544. **Forest C, Faucher S, Poirier K, Houle S, Dozois C, Daigle F** (2007) Contribution of the *stg* fimbrial operon of *Salmonella enterica* serovar Typhi during interaction with human cells. Infect Immun 75: 5264-5271.

545. **Gulig P, Doyle T** (1993) The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun* 61: 504-511.
546. **Ahmer B, Tran M, Heffron F** (1999) The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol* 181: 1364-1368.
547. **Jones G, Rabert D, Svinarich D, Whitfield H** (1982) Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella typhimurium* with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect Immun* 38: 476-486.
548. **Gulig P, Caldwell A, Chiodo V** (1992) Identification, genetic analysis and DNA sequence of a 7.8-kb virulence region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *Mol Microbiol* 6: 1395-1411.
549. **Lesnick M, Reiner N, Fierer J, Guiney D** (2001) The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 39: 1464-1470.
550. **Tezcan-Merdol D, Nyman T, Lindberg U, Haag F, Koch-Nolte F, Rhen M** (2001) Actin is ADP-ribosylated by the *Salmonella enterica* virulence-associated protein SpvB. *Mol Microbiol* 39: 606-619.
551. **Kurita A, Gotoh H, Eguchi M, Okada N, Matsuura S, Matsui H, Danbara H, Kikuchi Y** (2003) Intracellular expression of the *Salmonella* plasmid virulence protein, SpvB, causes apoptotic cell death in eukaryotic cells. *Microb Pathog* 35: 43-48.
552. **Browne SH, Hasegawa P, Okamoto S, Fierer J, Guiney DG** (2008) Identification of *Salmonella* SPI-2 secretion system components required for SpvB-mediated cytotoxicity in macrophages and virulence in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 194-201.
553. **Li H, Xu H, Zhou Y, Zhang J, Long C, Li S, Chen S, Zhou JM, Shao F** (2007) The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* 315: 1000-1003.

554. **Mazurkiewicz P, Thomas J, Thompson JA, Liu M, Arbibe L, Sansonetti P, Holden DW** (2008) SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol* 67: 1371-1383.
555. **Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H** (2006) Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* 112: 1-10.
556. **Maher D, Taylor D** (1993) Host range and transfer efficiency of incompatibility group HI plasmids. *Can J Microbiol* 39: 581-587.
557. **Fica A, Fernandez-Beros M, Aron-Hott L, Rivas A, D'Ottone K, Chumpitaz J, Guevara J, Rodriguez M, Cabello F** (1997) Antibiotic-resistant *Salmonella typhi* from two outbreaks: few ribotypes and IS200 types harbor Inc HI1 plasmids. *Microb Drug Resist* 3: 339-343.
558. **Wain J, Diem Nga LT, Kidgell C, James K, Fortune S, Song Diep T, Ali T, P OG, Parry C, Parkhill J, Farrar J, White NJ, Dougan G** (2003) Molecular analysis of incHI1 antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2732-2739.
559. **Kidgell C, Pickard D, Wain J, James K, Diem Nga L, Diep T, Levine M, O'Gaora P, Prentice M, Parkhill J, Day N, Farrar J, Dougan G** (2002) Characterisation and distribution of a cryptic *Salmonella typhi* plasmid pHCM2. *Plasmid* 47: 159-171.
560. **Gullberg E, Leonard M, Karlsson J, Hopkins AM, Brayden D, Baird AW, Artursson P** (2000) Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 808-813.
561. **Lim JS, Na HS, Lee HC, Choy HE, Park SC, Han JM, Cho KA** (2009) Caveolae-mediated entry of *Salmonella typhimurium* in a human M-cell model. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 1322-1327.

562. **Holzer SU, Hensel M** (2012) Divergent roles of *Salmonella* pathogenicity island 2 and metabolic traits during interaction of *S. enterica* serovar typhimurium with host cells. PLoS One 7: e33220.
563. **Blackwell JM, Goswami T, Evans CA, Sibthorpe D, Papo N, White JK, Searle S, Miller EN, Peacock CS, Mohammed H, Ibrahim M** (2001) SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. Cell Microbiol 3: 773-784.
564. **Bellamy R** (1999) The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. Microbes Infect 1: 23-27.
565. **Goswami T, Bhattacharjee A, Babal P, Searle S, Moore E, Li M, Blackwell JM** (2001) Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H⁺/bivalent cation antiporter. Biochem J 354: 511-519.
566. **Evans CA, Harbuz MS, Ostenfeld T, Norrish A, Blackwell JM** (2001) Nramp1 is expressed in neurons and is associated with behavioural and immune responses to stress. Neurogenetics 3: 69-78.
567. **Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P** (1997) Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. J Exp Med 185: 717-730.
568. **Searle S, Bright NA, Roach TI, Atkinson PG, Barton CH, Meloen RH, Blackwell JM** (1998) Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. J Cell Sci 111 (Pt 19): 2855-2866.
569. **Zwilling BS, Kuhn DE, Wikoff L, Brown D, Lafuse W** (1999) Role of iron in *Nramp1*-mediated inhibition of mycobacterial growth. Infect Immun 67: 1386-1392.
570. **Kuhn DE, Baker BD, Lafuse WP, Zwilling BS** (1999) Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1^{Gly169} or Nramp1^{Asp169}. J Leukoc Biol 66: 113-119.

571. **Kuhn DE, Lafuse WP, Zwilling BS** (2001) Iron transport into *Mycobacterium avium*-containing phagosomes from an *Nramp1*^{Gly169}-transfected RAW264.7 macrophage cell line. *J Leukoc Biol* 69: 43-49.
572. **Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang W, Gruenheid S, Gros P, Grinstein S** (1998) Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* 188: 351-364.
573. **Jabado N, Jankowski A, Dougaparsad S, Picard V, Grinstein S, Gros P** (2000) Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med* 192: 1237-1248.
574. **Andrews NC** (2000) Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet* 1: 208-217.
575. **Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P, Cellier MF** (2002) Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 70: 6032-6042.
576. **Zaharik ML, Vallance BA, Puente JL, Gros P, Finlay BB** (2002) Host-pathogen interactions: Host resistance factor Nramp1 up-regulates the expression of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15705-15710.
577. **Forbes JR, Gros P** (2003) Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood* 102: 1884-1892.
578. **Govoni G, Canonne-Hergaux F, Pfeifer C, Marcus S, Mills S, Hackam D, Grinstein S, Malo D, Finlay B, Gros P** (1999) Functional expression of Nramp1 *in vitro* in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect Immun* 67: 2225-2232.
579. **Vidal S, Tremblay M, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, Skamene E, Olivier M, Jothy S, Gros P** (1995) The *Ity/Lsh/Bcg* locus:

- natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J Exp Med* 182: 655-666.
580. **Dunstan S, Ho V, Duc C, Lanh M, Phuong C, Luxemburger C, Wain J, Dudbridge F, Peacock C, House D, Parry C, Hien T, Dougan G, Farrar J, Blackwell J** (2001) Typhoid fever and genetic polymorphisms at the natural resistance-associated macrophage protein 1. *J Infect Dis* 183: 1156-1160.
581. **Heffron F, Niemann G, Yoon H, Kidwai A, Brown R, McDermott J, Smith R, Adkins J** (2011) *Salmonella*-Secreted Virulence Factors. In: Porwollik S, editor. *Salmonella: From Genome to Function*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. pp. 187-223.
582. **Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ** (2001) Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* 3: 1335-1344.
583. **Hapfelmeier S, Hardt WD** (2005) A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol* 13: 497-503.
584. **Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Rüssmann H, Hardt W** (2003) Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 71: 2839-2858.
585. **Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I, Sankaran S, Paixao TA, Gordon MA, Kolls JK, Dandekar S, Baumler AJ** (2008) Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat Med* 14: 421-428.
586. **Santos RL, Almeida AP, Xavier MN, Paixao TA, Wilson RP, Dandekar S, Raffatellu M, Baumler AJ** (2011) Enteric pathology and *Salmonella*-induced cell death in healthy and SIV-infected rhesus macaques. *Vet Pathol* 48: 933-941.

587. **Aballay A, Yorgey P, Ausubel FM** (2000) *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 10: 1539-1542.
588. **O'Brien AD** (1982) Innate resistance of mice to *Salmonella typhi* infection. *Infect Immun* 38: 948-952.
589. **Pascopella L, Raupach B, Ghori N, Monack D, Falkow S, Small PL** (1995) Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. *Infect Immun* 63: 4329-4335.
590. **Carter PB, Collins FM** (1974) Growth of typhoid and paratyphoid bacilli in intravenously infected mice. *Infect Immun* 10: 816-822.
591. **Flajnik MF, Kasahara M** (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* 11: 47-59.
592. **Mian MF, Pek EA, Chenoweth MJ, Coombes BK, Ashkar AA** (2011) Humanized mice for *Salmonella typhi* infection: new tools for an old problem. *Virulence* 2: 248-252.
593. **Galen JE, Pasetti MF, Tennant S, Ruiz-Olvera P, Sztein MB, Levine MM** (2009) *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines finally come of age. *Immunol Cell Biol* 87: 400-412.
594. **Kwant-Mitchell A, Ashkar AA, Rosenthal KL** (2009) Mucosal innate and adaptive immune responses against herpes simplex virus type 2 in a humanized mouse model. *J Virol* 83: 10664-10676.
595. **Baenziger S, Tussiwand R, Schlaepfer E, Mazzucchelli L, Heikenwalder M, Kurrer MO, Behnke S, Frey J, Oxenius A, Joller H, Aguzzi A, Manz MG, Speck RF** (2006) Disseminated and sustained HIV infection in CD34+ cord blood cell-transplanted Rag2^{-/-}gamma c^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15951-15956.
596. **Turrini P, Sasso R, Germoni S, Marcucci I, Celluci A, Di Marco A, Marra E, Paonessa G, Eutropi A, Laufer R, Migliaccio G, Padron J**

- (2006) Development of humanized mice for the study of hepatitis C virus infection. *Transplant Proc* 38: 1181-1184.
597. **Bente DA, Melkus MW, Garcia JV, Rico-Hesse R** (2005) Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol* 79: 13797-13799.
598. **Song J, Willinger T, Rongvaux A, Eynon EE, Stevens S, Manz MG, Flavell RA, Galan JE** (2010) A mouse model for the human pathogen *Salmonella typhi*. *Cell Host Microbe* 8: 369-376.
599. **Firoz Mian M, Pek EA, Chenoweth MJ, Ashkar AA** (2011) Humanized mice are susceptible to *Salmonella typhi* infection. *Cell Mol Immunol* 8: 83-87.
600. **Mathur R, Oh H, Zhang D, Park SG, Seo J, Koblansky A, Hayden MS, Ghosh S** (2012) A mouse model of *Salmonella typhi* infection. *Cell* 151: 590-602.
601. **Reynolds M, Canals R, McClelland M, Andrews-Polymenis H** (2011) High-Throughput Screening to Determine the Genetic Requirements for *Salmonella* Survival Under Different Growth Conditions. In: Porwollik S, editor. *Salmonella: From Genome to Function*. Norfolk, UK. pp. 69-89.
602. **Alix E, Blanc-Potard AB** (2009) Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membrane. *Mol Microbiol* 72: 5-11.
603. **Sittka A, Sharma CM, Rolle K, Vogel J** (2009) Deep sequencing of *Salmonella* RNA associated with heterologous Hfq proteins *in vivo* reveals small RNAs as a major target class and identifies RNA processing phenotypes. *RNA Biol* 6: 266-275.
604. **Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC** (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* 313: 236-238.
605. **Boyd E, Porwollik S, Blackmer F, McClelland M** (2003) Differences in gene content among *Salmonella enterica* serovar typhi isolates. *J Clin Microbiol* 41: 3823-3828.

606. **Porwollik S, Santiviago CA, Cheng P, Florea L, Jackson S, McClelland M** (2005) Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. *J Bacteriol* 187: 6545-6555.
607. **Reen FJ, Boyd EF, Porwollik S, Murphy BP, Gilroy D, Fanning S, McClelland M** (2005) Genomic comparisons of *Salmonella enterica* serovar Dublin, Agona, and Typhimurium strains recently isolated from milk filters and bovine samples from Ireland, using a *Salmonella* microarray. *Appl Environ Microbiol* 71: 1616-1625.
608. **Porwollik S, McClelland M** (2007) Determination of the gene content of *Salmonella* genomes by microarray analysis. *Methods Mol Biol* 394: 89-103.
609. **Andreoli P** (2004) Fast method for detecting microorganisms in food samples.
610. **Scaria J, Palaniappan RU, Chiu D, Phan JA, Ponnala L, McDonough P, Grohn YT, Porwollik S, McClelland M, Chiou CS, Chu C, Chang YF** (2008) Microarray for molecular typing of *Salmonella enterica* serovars. *Mol Cell Probes* 22: 238-243.
611. **Wattiau P, Weijers T, Andreoli P, Schliker C, Veken HV, Maas HM, Verbruggen AJ, Heck ME, Wannet WJ, Imberechts H, Vos P** (2008) Evaluation of the Premi Test *Salmonella*, a commercial low-density DNA microarray system intended for routine identification and typing of *Salmonella enterica*. *Int J Food Microbiol* 123: 293-298.
612. **Wattiau P, Van Hesse M, Schlicker C, Vander Veken H, Imberechts H** (2008) Comparison of classical serotyping and PremiTest assay for routine identification of common *Salmonella enterica* serovars. *J Clin Microbiol* 46: 4037-4040.
613. **Andrews-Polymenis H, Rabsch W, Porwollik S, McClelland M, Rosetti C, Adams L, Bäuml A** (2004) Host restriction of *Salmonella enterica*

- serotype Typhimurium pigeon isolates does not correlate with loss of discrete genes. *J Bacteriol* 186: 2619-2628.
614. **Kang MS, Besser TE, Hancock DD, Porwollik S, McClelland M, Call DR** (2006) Identification of specific gene sequences conserved in contemporary epidemic strains of *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol* 72: 6938-6947.
615. **Osbourn AE, Barber CE, Daniels MJ** (1987) Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid. *EMBO J* 6: 23-28.
616. **Mahan M, Slauch J, Mekalanos J** (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* 259: 686-688.
617. **Mahan MJ, Tobias JW, Slauch JM, Hanna PC, Collier RJ, Mekalanos JJ** (1995) Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 669-673.
618. **Camilli A, Beattie DT, Mekalanos JJ** (1994) Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2634-2638.
619. **Valdivia RH, Falkow S** (1996) Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol* 22: 367-378.
620. **Valdivia R, Falkow S** (1997) Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277: 2007-2011.
621. **Bumann D** (2002) Examination of *Salmonella* gene expression in an infected mammalian host using the green fluorescent protein and two-colour flow cytometry. *Mol Microbiol* 43: 1269-1283.
622. **Thompson A, Rowley G, Alston M, Danino V, Hinton JC** (2006) *Salmonella* transcriptomics: relating regulons, stimulons and regulatory networks to the process of infection. *Curr Opin Microbiol* 9: 109-116.

623. **Hautefort I, Thompson A, Eriksson-Ygberg S, Parker ML, Lucchini S, Danino V, Bongaerts RJ, Ahmad N, Rhen M, Hinton JC** (2008) During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell Microbiol* 10: 958-984.
624. **Graham J, Clark-Curtiss J** (1999) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11554-11559.
625. **Daigle F, Graham J, Curtiss Rr** (2001) Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol Microbiol* 41: 1211-1222.
626. **Faucher S, Porwollik S, Dozois C, McClelland M, Daigle F** (2006) Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1906-1911.
627. **Morrow B, Graham J, Curtiss Rr** (1999) Genomic subtractive hybridization and selective capture of transcribed sequences identify a novel *Salmonella typhimurium* fimbrial operon and putative transcriptional regulator that are absent from the *Salmonella typhi* genome. *Infect Immun* 67: 5106-5116.
628. **Faucher S, Curtiss Rr, Daigle F** (2005) Selective capture of *Salmonella enterica* serovar typhi genes expressed in macrophages that are absent from the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genome. *Infect Immun* 73: 5217-5221.
629. **Croucher NJ, Fookes MC, Perkins TT, Turner DJ, Marguerat SB, Keane T, Quail MA, He M, Assefa S, Bahler J, Kingsley RA, Parkhill J, Bentley SD, Dougan G, Thomson NR** (2009) A simple method for

- directional transcriptome sequencing using Illumina technology. *Nucleic Acids Res* 37: e148.
630. **Hayakawa J, Mittal S, Wang Y, Korkmaz KS, Adamson E, English C, Ohmichi M, McClelland M, Mercola D** (2004) Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Mol Cell* 16: 521-535.
631. **Adkins JN, Mottaz HM, Norbeck AD, Gustin JK, Rue J, Clauss TR, Purvine SO, Rodland KD, Heffron F, Smith RD** (2006) Analysis of the *Salmonella typhimurium* proteome through environmental response toward infectious conditions. *Mol Cell Proteomics* 5: 1450-1461.
632. **Encheva V, Wait R, Begum S, Gharbia SE, Shah HN** (2007) Protein expression diversity amongst serovars of *Salmonella enterica*. *Microbiology* 153: 4183-4193.
633. **Mangalappalli-Illathu AK, Lawrence JR, Swerhone GD, Korber DR** (2008) Architectural adaptation and protein expression patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms under laminar flow conditions. *Int J Food Microbiol* 123: 109-120.
634. **Ansong C, Yoon H, Norbeck AD, Gustin JK, McDermott JE, Mottaz HM, Rue J, Adkins JN, Heffron F, Smith RD** (2008) Proteomics analysis of the causative agent of typhoid fever. *J Proteome Res* 7: 546-557.
635. **Shi L, Ansong C, Smallwood H, Rommereim L, McDermott JE, Brewer HM, Norbeck AD, Taylor RC, Gustin JK, Heffron F, Smith RD, Adkins JN** (2009) Proteome of *Salmonella Enterica* Serotype Typhimurium Grown in a Low Mg/pH Medium. *J Proteomics Bioinform* 2: 388-397.
636. **Osman KM, Ali MM, Radwan MI, Kim HK, Han J** (2009) Comparative proteomic analysis on *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Enteritidis* exploring proteins that may incorporate host adaptation in poultry. *J Proteomics* 72: 815-821.

637. **Kukral AM, Strauch KL, Maurer RA, Miller CG** (1987) Genetic analysis in *Salmonella typhimurium* with a small collection of randomly spaced insertions of transposon Tn10 delta 16 delta 17. J Bacteriol 169: 1787-1793.
638. **Gulig P, Curtiss Rr** (1987) Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 55: 2891-2901.
639. **Gulig P, Curtiss Rr** (1988) Cloning and transposon insertion mutagenesis of virulence genes of the 100-kilobase plasmid of *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 56: 3262-3271.
640. **Finlay B, Starnbach M, Francis C, Stocker B, Chatfield S, Dougan G, Falkow S** (1988) Identification and characterization of Tn ϕ oA mutants of *Salmonella* that are unable to pass through a polarized MDCK epithelial cell monolayer. Mol Microbiol 2: 757-766.
641. **Rhen M, Virtanen M, Makela PH** (1989) Localization by insertion mutagenesis of a virulence-associated region on the *Salmonella typhimurium* 96 kilobase pair plasmid. Microb Pathog 6: 153-158.
642. **Miller I, Maskell D, Hormaeche C, Johnson K, Pickard D, Dougan G** (1989) Isolation of orally attenuated *Salmonella typhimurium* following Tn ϕ oA mutagenesis. Infect Immun 57: 2758-2763.
643. **Sizemore DR, Fink PS, Ou JT, Baron L, Kopecko DJ, Warren RL** (1991) Tn5 mutagenesis of the *Salmonella typhimurium* 100 kb plasmid: definition of new virulence regions. Microb Pathog 10: 493-499.
644. **Rubino S, Leori G, Rizzu P, Erre G, Colombo MM, Uzzau S, Masala G, Cappuccinelli P** (1993) Tn ϕ oA *Salmonella abortusovis* mutants unable to adhere to epithelial cells and with reduced virulence in mice. Infect Immun 61: 1786-1792.
645. **Bäumler A, Kusters J, Stojiljkovic I, Heffron F** (1994) *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. Infect Immun 62: 1623-1630.

646. **Lodge J, Douce GR, Amin, II, Bolton AJ, Martin GD, Chatfield S, Dougan G, Brown NL, Stephen J** (1995) Biological and genetic characterization of *TnphoA* mutants of *Salmonella typhimurium* TML in the context of gastroenteritis. *Infect Immun* 63: 762-769.
647. **Bowe F, Lipps CJ, Tsolis RM, Groisman E, Heffron F, Kusters JG** (1998) At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Infect Immun* 66: 3372-3377.
648. **Turner AK, Lovell MA, Hulme SD, Zhang-Barber L, Barrow PA** (1998) Identification of *Salmonella typhimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks. *Infect Immun* 66: 2099-2106.
649. **Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, Holden DW** (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269: 400-403.
650. **Tsolis R, Townsend S, Miao E, Miller S, Ficht T, Adams L, Bäumlner A** (1999) Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* 67: 6385-6393.
651. **Bispham J, Tripathi BN, Watson PR, Wallis TS** (2001) *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infect Immun* 69: 367-377.
652. **Lichtensteiger CA, Vimr ER** (2003) Systemic and enteric colonization of pigs by a *hilA* signature-tagged mutant of *Salmonella choleraesuis*. *Microb Pathog* 34: 149-154.
653. **Bearson SM, Bearson BL, Rasmussen MA** (2006) Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes important for survival in the swine gastric environment. *Appl Environ Microbiol* 72: 2829-2836.
654. **Carnell S, Bowen A, Morgan E, Maskell D, Wallis T, Stevens M** (2007) Role in virulence and protective efficacy in pigs of *Salmonella enterica*

- serovar Typhimurium secreted components identified by signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* 153: 1940-1952.
655. **Lehoux DE, Sanschagrín F, Levesque RC** (1999) Defined oligonucleotide tag pools and PCR screening in signature-tagged mutagenesis of essential genes from bacteria. *Biotechniques* 26: 473-478, 480.
656. **Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ** (2001) Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12712-12717.
657. **Badarinarayana V, Estep PW, Shendure J, Edwards J, Tavazoie S, Lam F, Church GM** (2001) Selection analyses of insertional mutants using subgenic-resolution arrays. *Nat Biotechnol* 19: 1060-1065.
658. **Rengarajan J, Bloom B, Rubin E** (2005) Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8327-8332.
659. **Chaudhuri RR, Peters SE, Pleasance SJ, Northen H, Willers C, Paterson GK, Cone DB, Allen AG, Owen PJ, Shalom G, Stekel DJ, Charles IG, Maskell DJ** (2009) Comprehensive identification of *Salmonella enterica* serovar typhimurium genes required for infection of BALB/c mice. *PLoS Pathog* 5: e1000529.
660. **Langridge GC, Phan MD, Turner DJ, Perkins TT, Parts L, Haase J, Charles I, Maskell DJ, Peters SE, Dougan G, Wain J, Parkhill J, Turner AK** (2009) Simultaneous assay of every *Salmonella Typhi* gene using one million transposon mutants. *Genome Res* 19: 2308-2316.
661. **Unsworth KE, Holden DW** (2000) Identification and analysis of bacterial virulence genes *in vivo*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 613-622.
662. **Santiviago CA, Reynolds MM, Porwollik S, Choi SH, Long F, Andrews-Polymenis HL, McClelland M** (2009) Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLoS Pathog* 5: e1000477.

663. **Kelly DE, Lamb DC, Kelly SL** (2001) Genome-wide generation of yeast gene deletion strains. *Comp Funct Genomics* 2: 236-242.
664. **Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H** (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2: 2006 0008.
665. **Datsenko K, Wanner B** (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-6645.
666. **Schwan W, Huang X, Hu L, Kopecko D** (2000) Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun* 68: 1005-1013.
667. **Kaniga K, Compton M, Curtiss Rr, Sundaram P** (1998) Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* 66: 5599-5606.
668. **Herrero M, de Lorenzo V, Timmis K** (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172: 6557-6567.
669. **Wang R, Kushner S** (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100: 195-199.
670. **Sabbagh SC, Lepage C, McClelland M, Daigle F** (2012) Selection of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes involved during interaction with human macrophages by screening of a transposon mutant library. *PLoS One* 7: e36643.
671. **O'Callaghan D, Charbit A** (1990) High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. *Mol Gen Genet* 223: 156-158.

672. **Hanahan D, Jessee J, Bloom F** (1995) Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover D, Hames B, editors. DNA Cloning 1: A practical approach Core techniques. 2nd ed. Oxford, UK: IRL Press. pp. 1-36.
673. **Tang P, Foubister V, Pucciarelli MG, Finlay BB** (1993) Methods to study bacterial invasion. *Journal of Microbiological Methods* 18: 227-240.
674. **Vaudaux P, Waldvogel FA** (1979) Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 16: 743-749.
675. **Elsinghorst EA** (1994) Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol* 236: 405-420.
676. **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
677. **Porwollik S, Frye J, Florea L, Blackmer F, McClelland M** (2003) A non-redundant microarray of genes for two related bacteria. *Nucleic Acids Res* 31: 1869-1876.
678. **Xia XQ, McClelland M, Porwollik S, Song W, Cong X, Wang Y** (2009) WebArrayDB: cross-platform microarray data analysis and public data repository. *Bioinformatics* 25: 2425-2429.
679. **Basso H, Rharbaoui F, Staendner LH, Medina E, Garcia-Del Portillo F, Guzman CA** (2002) Characterization of a novel intracellularly activated gene from *Salmonella enterica* serovar typhi. *Infect Immun* 70: 5404-5411.
680. **Abromaitis S, Faucher S, Béland M, Curtiss R, Daigle F** (2005) The presence of the *tet* gene from cloning vectors impairs *Salmonella* survival in macrophages. *FEMS Microbiol Lett* 242: 305-312.
681. **Segura I, Casadesús J, Ramos-Morales F** (2004) Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *J Microbiol Methods* 56: 83-91.

682. **Toguchi A, Siano M, Burkart M, Harshey RM** (2000) Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 182: 6308-6321.
683. **Pfennig PL, Flower AM** (2001) BipA is required for growth of *Escherichia coli* K12 at low temperature. *Mol Genet Genomics* 266: 313-317.
684. **Grant AJ, Haigh R, Williams P, O'Connor CD** (2001) An *in vitro* transposon system for highly regulated gene expression: construction of *Escherichia coli* strains with arabinose-dependent growth at low temperatures. *Gene* 280: 145-151.
685. **Beckering CL, Steil L, Weber MH, Völker U, Marahiel MA** (2002) Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184: 6395-6402.
686. **Reva ON, Weinel C, Weinel M, Böhm K, Stjepandic D, Hoheisel JD, Tümmler B** (2006) Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* 188: 4079-4092.
687. **Kolter R, Inuzuka M, Helinski DR** (1978) Trans-complementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. *Cell* 15: 1199-1208.
688. **Lissner CR, Swanson RN, O'Brien AD** (1983) Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated *in vitro*. *J Immunol* 131: 3006-3013.
689. **Parsons DA, Heffron F** (2005) *sciS*, an *icmF* homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun* 73: 4338-4345.
690. **Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ** (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 48: 77-84.

691. **Murry JP, Sassetti CM, Lane JM, Xie Z, Rubin EJ** (2008) Transposon site hybridization in *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol Biol* 416: 45-59.
692. **Blair JM, La Ragione RM, Woodward MJ, Piddock LJ** (2009) Periplasmic adaptor protein AcrA has a distinct role in the antibiotic resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* 64: 965-972.
693. **Stepanova H, Volf J, Malcova M, Matiasovic J, Faldyna M, Rychlik I** (2011) Association of attenuated mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with porcine peripheral blood leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 321: 37-42.
694. **Lähteenmäki K, Kyllönen P, Partanen L, Korhonen TK** (2005) Antiprotease inactivation by *Salmonella enterica* released from infected macrophages. *Cell Microbiol* 7: 529-538.
695. **Nagy G, Danino V, Dobrindt U, Pallen M, Chaudhuri R, Emody L, Hinton JC, Hacker J** (2006) Down-regulation of key virulence factors makes the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *rfaH* mutant a promising live-attenuated vaccine candidate. *Infect Immun* 74: 5914-5925.
696. **Zenk SF, Jantsch J, Hensel M** (2009) Role of *Salmonella enterica* lipopolysaccharide in activation of dendritic cell functions and bacterial containment. *J Immunol* 183: 2697-2707.
697. **Charles RC, Sheikh A, Krastins B, Harris JB, Bhuiyan MS, LaRocque RC, Logvinenko T, Sarracino DA, Kudva IT, Eisenstein J, Podolsky MJ, Kalsy A, Brooks WA, Ludwig A, John M, Calderwood SB, Qadri F, Ryan ET** (2010) Characterization of anti-*Salmonella enterica* serotype Typhi antibody responses in bacteremic Bangladeshi patients by an immunoaffinity proteomics-based technology. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1188-1195.

698. **Hu Y, Cong Y, Li S, Rao X, Wang G, Hu F** (2009) Identification of *in vivo* induced protein antigens of *Salmonella enterica* serovar Typhi during human infection. *Sci China C Life Sci* 52: 942-948.
699. **Kimata K, Inada T, Tagami H, Aiba H** (1998) A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the *ptsG* gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 29: 1509-1519.
700. **Kong Q, Yang J, Liu Q, Alamuri P, Roland KL, Curtiss R, 3rd** (2011) Effect of deletion of genes involved in lipopolysaccharide core and O-antigen synthesis on virulence and immunogenicity of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* 79: 4227-4239.
701. **Liu SL, Ezaki T, Miura H, Matsui K, Yabuuchi E** (1988) Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infect Immun* 56: 1967-1973.
702. **Macnab RM** (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57: 77-100.
703. **Hoare A, Bittner M, Carter J, Alvarez S, Zaldívar M, Bravo D, Valvano M, Contreras I** (2006) The outer core lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for bacterial entry into epithelial cells. *Infect Immun* 74: 1555-1564.
704. **Girgis HS, Liu Y, Ryu WS, Tavazoie S** (2007) A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet* 3: 1644-1660.
705. **Beaman L, Beaman BL** (1984) The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annu Rev Microbiol* 38: 27-48.
706. **de Vries SP, Eleveld MJ, Hermans PW, Bootsma HJ** (2013) Characterization of the molecular interplay between *Moraxella catarrhalis* and human respiratory tract epithelial cells. *PLoS One* 8: e72193.
707. **Molzen TE, Burghout P, Bootsma HJ, Brandt CT, van der Gaast-de Jongh CE, Eleveld MJ, Verbeek MM, Frimodt-Moller N, Ostergaard C, Hermans PW** (2011) Genome-wide identification of *Streptococcus pneumoniae* genes essential for bacterial replication during experimental meningitis. *Infect Immun* 79: 288-297.

708. **Wickham ME, Brown NF, Provias J, Finlay BB, Coombes BK** (2007) Oral infection of mice with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium causes meningitis and infection of the brain. *BMC Infect Dis* 7: 65.
709. **Cellier M, Shustik C, Dalton W, Rich E, Hu J, Malo D, Schurr E, Gros P** (1997) Expression of the human *NRAMP1* gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia. *J Leukoc Biol* 61: 96-105.
710. **Wilson RP, Winter SE, Spees AM, Winter MG, Nishimori JH, Sanchez JF, Nuccio SP, Crawford RW, Tukel C, Baumler AJ** (2011) The Vi capsular polysaccharide prevents complement receptor 3-mediated clearance of *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infect Immun* 79: 830-837.
711. **DiPetrillo M, Tibbetts T, Kleanthous H, Killeen K, Hohmann E** (1999) Safety and immunogenicity of *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Vaccine* 18: 449-459.
712. **Angelakopoulos H, Hohmann E** (2000) Pilot study of *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Infect Immun* 68: 2135-2141.
713. **Hone D, Attridge S, Forrest B, Morona R, Daniels D, LaBrooy J, Bartholomeusz R, Shearman D, Hackett J** (1988) A *galE via* (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. *Infect Immun* 56: 1326-1333.
714. **Groisman E, Chiao E, Lipps C, Heffron F** (1989) *Salmonella typhimurium phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7077-7081.
715. **Goryshin IY, Reznikoff WS** (1998) Tn5 *in vitro* transposition. *J Biol Chem* 273: 7367-7374.

716. **Goryshin IY, Jendrisak J, Hoffman LM, Meis R, Reznikoff WS** (2000) Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat Biotechnol* 18: 97-100.
717. **Canals R, Xia XQ, Fronick C, Clifton SW, Ahmer BM, Andrews-Polymeris HL, Porwollik S, McClelland M** (2012) High-throughput comparison of gene fitness among related bacteria. *BMC Genomics* 13: 212.
718. **Khawiwara A, Jiang T, Sung SS, Dawoud T, Kim JN, Bhattacharya D, Kim HB, Ricke SC, Kwon YM** (2012) Genome scanning for conditionally essential genes in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 78: 3098-3107.
719. **Barquist L, Langridge GC, Turner DJ, Phan MD, Turner AK, Bateman A, Parkhill J, Wain J, Gardner PP** (2013) A comparison of dense transposon insertion libraries in the *Salmonella* serovars Typhi and Typhimurium. *Nucleic Acids Res* 41: 4549-4564.
720. **Pickard D, Kingsley RA, Hale C, Turner K, Sivaraman K, Wetter M, Langridge G, Dougan G** (2013) A genomewide mutagenesis screen identifies multiple genes contributing to Vi capsular expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* 195: 1320-1326.
721. **Hoffman LM, Jendrisak JJ, Meis RJ, Goryshin IY, Reznikoff SW** (2000) Transposome insertional mutagenesis and direct sequencing of microbial genomes. *Genetica* 108: 19-24.
722. **Bullas LR, Colson C, Neufeld B** (1980) Deoxyribonucleic acid restriction and modification systems in *Salmonella*: chromosomally located systems of different serotypes. *J Bacteriol* 141: 275-292.
723. **Wilson GG, Murray NE** (1991) Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet* 25: 585-627.
724. **Murray NE** (2000) Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 412-434.

725. **Walkinshaw MD, Taylor P, Sturrock SS, Atanasiu C, Berge T, Henderson RM, Edwardson JM, Dryden DT** (2002) Structure of Ocr from bacteriophage T7, a protein that mimics B-form DNA. *Mol Cell* 9: 187-194.
726. **de Lorenzo V, M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis** (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 172: 6568-6572.
727. **Winson MK, Swift S, Hill PJ, Sims CM, Griesmayr G, Bycroft BW, Williams P, Stewart GS** (1998) Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiol Lett* 163: 193-202.
728. **Sydenham M, Douce G, Bowe F, Ahmed S, Chatfield S, Dougan G** (2000) *Salmonella enterica* serovar typhimurium *surA* mutants are attenuated and effective live oral vaccines. *Infect Immun* 68: 1109-1115.
729. **Wright AC, Powell JL, Kaper JB, Morris JG, Jr.** (2001) Identification of a group 1-like capsular polysaccharide operon for *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 69: 6893-6901.
730. **Espinosa-Urgel M, Ramos JL** (2001) Expression of a *Pseudomonas putida* aminotransferase involved in lysine catabolism is induced in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 67: 5219-5224.
731. **Godoy P, Ramos-Gonzalez MI, Ramos JL** (2001) Involvement of the TonB system in tolerance to solvents and drugs in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* 183: 5285-5292.
732. **Lambert A, Osteras M, Mandon K, Poggi MC, Le Rudulier D** (2001) Fructose uptake in *Sinorhizobium meliloti* is mediated by a high-affinity ATP-binding cassette transport system. *J Bacteriol* 183: 4709-4717.
733. **Stewart BJ, McCarter LL** (2003) Lateral flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 185: 4508-4518.

734. **Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW, Balazsi G, Ravasz E, Daugherty MD, Somera AL, Kyrpides NC, Anderson I, Gelfand MS, Bhattacharya A, Kapatral V, D'Souza M, Baev MV, Grechkin Y, Mseeh F, Fonstein MY, Overbeek R, Barabasi AL, Oltvai ZN, Osterman AL** (2003) Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol* 185: 5673-5684.
735. **Lewenza S, Falsafi RK, Winsor G, Gooderham WJ, McPhee JB, Brinkman FS, Hancock RE** (2005) Construction of a mini-Tn5-*luxCDABE* mutant library in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a tool for identifying differentially regulated genes. *Genome Res* 15: 583-589.
736. **Winterberg KM, Luecke J, Bruegl AS, Reznikoff WS** (2005) Phenotypic screening of *Escherichia coli* K-12 Tn5 insertion libraries, using whole-genome oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol* 71: 451-459.
737. **Karcher S** (1995) *Molecular biology: A project approach*. San Diego, USA: Academic Press, Inc.
738. **Berg DE, Davies J, Allet B, Rochaix JD** (1975) Transposition of R factor genes to bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3628-3632.
739. **Johnson RC, Yin JC, Reznikoff WS** (1982) Control of Tn5 transposition in *Escherichia coli* is mediated by protein from the right repeat. *Cell* 30: 873-882.
740. **Isberg RR, Lazaar AL, Syvanen M** (1982) Regulation of Tn5 by the right-repeat proteins: control at the level of the transposition reaction? *Cell* 30: 883-892.
741. **Beck CF, Moyed H, Ingraham JL** (1980) The tetracycline-resistance transposon Tn10 inhibits translocation of Tn10. *Mol Gen Genet* 179: 453-455.

742. **Way JC, Davis MA, Morisato D, Roberts DE, Kleckner N** (1984) New *Tn10* derivatives for transposon mutagenesis and for construction of *lacZ* operon fusions by transposition. *Gene* 32: 369-379.
743. **Tsolis R, Heffron F** (1994) Mutagenesis and Variant Selection in *Salmonella*. In: Russell D, editor. *Microbes as Tools for Cell Biology*: Academic Press, Inc. pp. 79-106.
744. **Tascon RI, Rodriguez-Ferri EF, Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Barbosa I, Berche P, Vazquez-Boland JA** (1993) Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a *Tn10* derivative. *J Bacteriol* 175: 5717-5722.
745. **Alexeyev MF, Shokolenko IN** (1995) Mini-*Tn10* transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of gram-negative bacteria. *Gene* 160: 59-62.
746. **Hare RS, Walker SS, Dorman TE, Greene JR, Guzman LM, Kenney TJ, Sulavik MC, Baradaran K, Houseweart C, Yu H, Foldes Z, Motzer A, Walbridge M, Shimer GH, Jr., Shaw KJ** (2001) Genetic footprinting in bacteria. *J Bacteriol* 183: 1694-1706.
747. **Rossignol M, Basset A, Espeli O, Bocard F** (2001) NKBOR, a mini-*Tn10*-based transposon for random insertion in the chromosome of Gram-negative bacteria and the rapid recovery of sequences flanking the insertion sites in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 152: 481-485.
748. **Kleckner N, Bender J, Gottesman S** (1991) Uses of transposons with emphasis on *Tn10*. *Methods Enzymol* 204: 139-180.
749. **Maloy SR** (2007) Isolation of transposon insertions. *Methods Enzymol* 421: 35-42.
750. **Fitzgerald JR, Musser JM** (2001) Evolutionary genomics of pathogenic bacteria. *Trends Microbiol* 9: 547-553.
751. **Joyce EA, Chan K, Salama NR, Falkow S** (2002) Redefining bacterial populations: a post-genomic reformation. *Nat Rev Genet* 3: 462-473.

752. **Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM** (1999) Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284: 1520-1523.
753. **Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S** (2000) A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14668-14673.
754. **Dorrell N, Mangan JA, Laing KG, Hinds J, Linton D, Al-Ghusein H, Barrell BG, Parkhill J, Stoker NG, Karlyshev AV, Butcher PD, Wren BW** (2001) Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Res* 11: 1706-1715.
755. **Dziejman M, Balon E, Boyd D, Fraser CM, Heidelberg JF, Mekalanos JJ** (2002) Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1556-1561.
756. **Smoot JC, Barbian KD, Van Gompel JJ, Smoot LM, Chaussee MS, Sylva GL, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Porcella SF, Parkins LD, Beres SB, Campbell DS, Smith TM, Zhang Q, Kapur V, Daly JA, Veasy LG, Musser JM** (2002) Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4668-4673.
757. **Suez J, Porwollik S, Dagan A, Marzel A, Schorr YI, Desai PT, Agmon V, McClelland M, Rahav G, Gal-Mor O** (2013) Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PLoS One* 8: e58449.
758. **Prager R, Rabsch W, Streckel W, Voigt W, Tietze E, Tschape H** (2003) Molecular properties of *Salmonella enterica* serotype paratyphi B

- distinguish between its systemic and its enteric pathovars. *J Clin Microbiol* 41: 4270-4278.
759. **Anjum MF, Marooney C, Fookes M, Baker S, Dougan G, Ivens A, Woodward MJ** (2005) Identification of core and variable components of the *Salmonella enterica* subspecies I genome by microarray. *Infect Immun* 73: 7894-7905.
760. **Guiney DG** (1997) Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. *J Clin Invest* 99: 565-569.
761. **Haghjoo E, Galán J** (2004) *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4614-4619.
762. **Rodas PI, Contreras I, Mora GC** (2010) *Salmonella enterica* serovar Typhi has a 4.1 kb genetic island inserted within the *sapABCDF* operon that causes loss of resistance to the antimicrobial peptide protamine. *J Antimicrob Chemother* 65: 1624-1630.
763. **Rodas PI, Trombert AN, Mora GC** (2011) A holin remnant protein encoded by *STY1365* is involved in envelope stability of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *FEMS Microbiol Lett* 321: 58-66.
764. **Becker D, Selbach M, Rollenhagen C, Ballmaier M, Meyer T, Mann M, Bumann D** (2006) Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature* 440: 303-307.
765. **Rollenhagen C, Bumann D** (2006) *Salmonella enterica* highly expressed genes are disease specific. *Infect Immun* 74: 1649-1660.
766. **Rollenhagen C, Sorensen M, Rizos K, Hurvitz R, Bumann D** (2004) Antigen selection based on expression levels during infection facilitates vaccine development for an intracellular pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8739-8744.
767. **Hammarlof DL, Canals R, Hinton JC** (2013) The FUN of identifying gene function in bacterial pathogens; insights from *Salmonella* functional genomics. *Curr Opin Microbiol*.

768. **Kendall SL, Rison SC, Movahedzadeh F, Frita R, Stoker NG** (2004) What do microarrays really tell us about *M. tuberculosis*? Trends Microbiol 12: 537-544.
769. **Giaever G, Chu A, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, André B, Arkin A, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian K, Flaherty P, Foury F, Garfinkel D, Gerstein M, Gotte D, Güldener U, Hegemann J, Hempel S, Herman Z, Jaramillo D, Kelly D, Kelly S, Kötter P, LaBonte D, Lamb D, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi S, Revuelta J, Roberts C, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker D, Sookhai-Mahadeo S, Storms R, Strathern J, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang C, Ward T, Wilhelmy J, Winzeler E, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke J, Snyder M, Philippsen P, Davis R, Johnston M** (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. Nature 418: 387-391.
770. **Chaudhuri RR, Morgan E, Peters SE, Pleasance SJ, Hudson DL, Davies HM, Wang J, van Diemen PM, Buckley AM, Bowen AJ, Pullinger GD, Turner DJ, Langridge GC, Turner AK, Parkhill J, Charles IG, Maskell DJ, Stevens MP** (2013) Comprehensive assignment of roles for *Salmonella typhimurium* genes in intestinal colonization of food-producing animals. PLoS Genet 9: e1003456.
771. **Talaat A, Lyons R, Howard S, Johnston S** (2004) The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 4602-4607.
772. **Sasseti CM, Rubin EJ** (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 12989-12994.
773. **Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, Monahan IM, Dolganov G, Efron B, Butcher PD, Nathan C, Schoolnik GK**

- (2003) Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med* 198: 693-704.
774. **Alam MM, Tsai LL, Rollins SM, Sheikh A, Khanam F, Bufano MK, Yu Y, Wu-Freeman Y, Kalsy A, Sultana T, Sayeed MA, Jahan N, LaRocque RC, Harris JB, Leung DT, Brooks WA, Calderwood SB, Charles RC, Qadri F, Ryan ET** (2013) Identification of *in vivo*-induced bacterial proteins during human infection with *Salmonella enterica* serotype Paratyphi A. *Clin Vaccine Immunol* 20: 712-719.
775. **van der Velden A, Bäuml A, Tsolis R, Heffron F** (1998) Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* 66: 2803-2808.
776. **Edwards R, Schifferli D, Maloy S** (2000) A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1258-1262.
777. **Kitagawa R, Takaya A, Ohya M, Mizunoe Y, Takade A, Yoshida S, Isogai E, Yamamoto T** (2010) Biogenesis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium membrane vesicles provoked by induction of PagC. *J Bacteriol* 192: 5645-5656.
778. **Creeger ES, Rothfield LI** (1979) Cloning of genes for bacterial glycosyltransferases. I. Selection of hybrid plasmids carrying genes for two glucosyltransferases. *J Biol Chem* 254: 804-810.
779. **Schnaitman CA, Klena JD** (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev* 57: 655-682.
780. **Holzer SU, Schlumberger MC, Jackel D, Hensel M** (2009) Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 77: 5458-5470.
781. **West NP, Sansonetti P, Mounier J, Exley RM, Parsot C, Guadagnini S, Prevost MC, Prochnicka-Chalufour A, Delepierre M, Tanguy M, Tang CM** (2005) Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science* 307: 1313-1317.

782. **Reeves PR, Hobbs M, Valvano MA, Skurnik M, Whitfield C, Coplin D, Kido N, Klena J, Maskell D, Raetz CR, Rick PD** (1996) Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol* 4: 495-503.
783. **Tarr PI, Schoening LM, Yea YL, Ward TR, Jelacic S, Whittam TS** (2000) Acquisition of the *rfb-gnd* cluster in evolution of *Escherichia coli* O55 and O157. *J Bacteriol* 182: 6183-6191.
784. **Zhao Y, Jansen R, Gaastra W, Arkesteijn G, van der Zeijst BA, van Putten JP** (2002) Identification of genes affecting *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection of chicken macrophages. *Infect Immun* 70: 5319-5321.
785. **Evans TJ, Ind A, Komitopoulou E, Salmond GP** (2010) Phage-selected lipopolysaccharide mutants of *Pectobacterium atrosepticum* exhibit different impacts on virulence. *J Appl Microbiol* 109: 505-514.
786. **Choi Y, Choi J, Groisman EA, Kang DH, Shin D, Ryu S** (2012) Expression of *STM4467*-encoded arginine deiminase controlled by the *STM4463* regulator contributes to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. *Infect Immun* 80: 4291-4297.
787. **Ahmer BM, Thomas MG, Larsen RA, Postle K** (1995) Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *J Bacteriol* 177: 4742-4747.
788. **Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, Buchanan SK** (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* 64: 43-60.
789. **Yu EW, Aires JR, Nikaido H** (2003) AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J Bacteriol* 185: 5657-5664.
790. **Eaves DJ, Ricci V, Piddock LJ** (2004) Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: role in

- multiple antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1145-1150.
791. **Webber MA, Bailey AM, Blair JM, Morgan E, Stevens MP, Hinton JC, Ivens A, Wain J, Piddock LJ** (2009) The global consequence of disruption of the AcrAB-TolC efflux pump in *Salmonella enterica* includes reduced expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host. *J Bacteriol* 191: 4276-4285.
792. **Minagawa S, Ogasawara H, Kato A, Yamamoto K, Eguchi Y, Oshima T, Mori H, Ishihama A, Utsumi R** (2003) Identification and molecular characterization of the Mg²⁺ stimulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 3696-3702.
793. **Monsieurs P, De Keersmaecker S, Navarre WW, Bader MW, De Smet F, McClelland M, Fang FC, De Moor B, Vanderleyden J, Marchal K** (2005) Comparison of the PhoPQ regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Mol Evol* 60: 462-474.
794. **Baker SJ, Daniels C, Morona R** (1997) PhoP/Q regulated genes in *Salmonella typhi* identification of melittin sensitive mutants. *Microb Pathog* 22: 165-179.
795. **Lacroix FJ, Cloeckert A, Grepinet O, Pinault C, Popoff MY, Waxin H, Pardon P** (1996) *Salmonella typhimurium* *acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS Microbiol Lett* 135: 161-167.
796. **van Velkinburgh JC, Gunn JS** (1999) PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infect Immun* 67: 1614-1622.
797. **Gunn JS** (2000) Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes Infect* 2: 907-913.
798. **Prouty AM, Van Velkinburgh JC, Gunn JS** (2002) *Salmonella enterica* serovar typhimurium resistance to bile: identification and characterization of the *tolQRA* cluster. *J Bacteriol* 184: 1270-1276.

799. **García-del Portillo F, Núñez-Hernández C, Eisman B, Ramos-Vivas J** (2008) Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Curr Opin Microbiol* 11: 46-52.
800. **Gunn JS, Miller SI** (1996) PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol* 178: 6857-6864.
801. **Tamayo R, Prouty AM, Gunn JS** (2005) Identification and functional analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PmrA-regulated genes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43: 249-258.
802. **Merighi M, Carroll-Portillo A, Septer AN, Bhatiya A, Gunn JS** (2006) Role of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium two-component system PreA/PreB in modulating PmrA-regulated gene transcription. *J Bacteriol* 188: 141-149.
803. **Merighi M, Septer AN, Carroll-Portillo A, Bhatiya A, Porwollik S, McClelland M, Gunn JS** (2009) Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol* 9: 42.
804. **Parker CT, Guard-Petter J** (2001) Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in chicks. *FEMS Microbiol Lett* 204: 287-291.
805. **Kim JS, Eom JS, Jang JI, Kim HG, Seo DW, Bang IS, Bang SH, Lee IS, Park YK** (2011) Role of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Protein IacP in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathogenesis. *Infect Immun* 79: 1440-1450.
806. **Wisner AL, Potter AA, Koster W** (2011) Effect of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system on *Salmonella* survival in activated chicken macrophage-like HD11 cells. *PLoS One* 6: e29787.
807. **Grant AJ, Morgan FJ, McKinley TJ, Foster GL, Maskell DJ, Mastroeni P** (2012) Attenuated *Salmonella Typhimurium* lacking the

- pathogenicity island-2 type 3 secretion system grow to high bacterial numbers inside phagocytes in mice. PLoS Pathog 8: e1003070.
808. **Lim S, Yun J, Yoon H, Park C, Kim B, Jeon B, Kim D, Ryu S** (2007) Mlc regulation of *Salmonella* pathogenicity island I gene expression via *hilE* repression. Nucleic Acids Res 35: 1822-1832.
809. **Lee SJ, Boos W, Bouche JP, Plumbridge J** (2000) Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. EMBO J 19: 5353-5361.
810. **Tanaka Y, Kimata K, Aiba H** (2000) A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. EMBO J 19: 5344-5352.
811. **Nam TW, Cho SH, Shin D, Kim JH, Jeong JY, Lee JH, Roe JH, Peterkofsky A, Kang SO, Ryu S, Seok YJ** (2001) The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. EMBO J 20: 491-498.
812. **Eichelberg K, Galán J** (2000) The flagellar sigma factor FliA (sigma(28)) regulates the expression of *Salmonella* genes associated with the centisome 63 type III secretion system. Infect Immun 68: 2735-2743.
813. **Margus T, Remm M, Tenson T** (2007) Phylogenetic distribution of translational GTPases in bacteria. BMC Genomics 8: 15.
814. **Farris M, Grant A, Richardson TB, O'Connor CD** (1998) BipA: a tyrosine-phosphorylated GTPase that mediates interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells. Mol Microbiol 28: 265-279.
815. **Barker HC, Kinsella N, Jaspe A, Friedrich T, O'Connor CD** (2000) Formate protects stationary-phase *Escherichia coli* and *Salmonella* cells from killing by a cationic antimicrobial peptide. Mol Microbiol 35: 1518-1529.
816. **Grant AJ, Farris M, Alefounder P, Williams PH, Woodward MJ, O'Connor CD** (2003) Co-ordination of pathogenicity island expression by

- the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol* 48: 507-521.
817. **Hara A, Sy J** (1983) Guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate 5'-phosphohydrolase. Purification and substrate specificity. *J Biol Chem* 258: 1678-1683.
818. **Keasling JD, Bertsch L, Kornberg A** (1993) Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7029-7033.
819. **Potrykus K, Cashel M** (2008) (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* 62: 35-51.
820. **Thompson A, Rolfe MD, Lucchini S, Schwerk P, Hinton JC, Tedin K** (2006) The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of *Salmonella*. *J Biol Chem* 281: 30112-30121.
821. **Jeong JH, Song M, Park SI, Cho KO, Rhee JH, Choy HE** (2008) *Salmonella enterica* serovar gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells. *J Bacteriol* 190: 6340-6350.
822. **Haneda T, Sugimoto M, Yoshida-Ohta Y, Kodera Y, Oh-Ishi M, Maeda T, Shimizu-Izumi S, Miki T, Kumagai Y, Danbara H, Okada N** (2010) Comparative proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ppGpp-deficient mutant to identify a novel virulence protein required for intracellular survival in macrophages. *BMC Microbiol* 10: 324.
823. **Li WH, Gojobori T, Nei M** (1981) Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* 292: 237-239.
824. **Nilsson AI, Koskiniemi S, Eriksson S, Kugelberg E, Hinton JC, Andersson DI** (2005) Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12112-12116.
825. **Carlson JH, Hughes S, Hogan D, Cieplak G, Sturdevant DE, McClarty G, Caldwell HD, Belland RJ** (2004) Polymorphisms in the *Chlamydia*

- trachomatis* cytotoxin locus associated with ocular and genital isolates. Infect Immun 72: 7063-7072.
826. **Carlson JH, Porcella SF, McClarty G, Caldwell HD** (2005) Comparative genomic analysis of *Chlamydia trachomatis* oculotropic and genitotropic strains. Infect Immun 73: 6407-6418.
827. **Torres A, Giron J, Perna N, Burland V, Blattner F, Avelino-Flores F, Kaper J** (2002) Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 70: 5416-5427.
828. **Newton H, Sloan J, Bennett-Wood V, Adams L, Robins-Browne R, Hartland E** (2004) Contribution of long polar fimbriae to the virulence of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 72: 1230-1239.
829. **Jordan D, Cornick N, Torres A, Dean-Nystrom E, Kaper J, Moon H** (2004) Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 *in vivo*. Infect Immun 72: 6168-6171.
830. **Fitzhenry R, Dahan S, Torres A, Chong Y, Heuschkel R, Murch S, Thomson M, Kaper J, Frankel G, Phillips A** (2006) Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. Microbes Infect 8: 1741-1749.
831. **Murdoch DA, Banatvaia N, Bone A, Shoismatulloev BI, Ward LR, Threlfall EJ** (1998) Epidemic ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhi* in Tajikistan. Lancet 351: 339.
832. **Threlfall EJ, Ward LR, Skinner JA, Smith HR, Lacey S** (1999) Ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhi* and treatment failure. Lancet 353: 1590-1591.
833. **Threlfall EJ, Ward LR** (2001) Decreased susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serotype typhi, United Kingdom. Emerg Infect Dis 7: 448-450.

834. **Spreng S, Dietrich G, Weidinger G** (2006) Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. *Methods* 38: 133-143.
835. **Cheminay C, Hensel M** (2008) Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *Int J Med Microbiol* 298: 87-98.
836. **Winstead E** (2001) A technology called TraSH asks, What do all these genes do? *Genome news network*. www.genomenewsnetwork.org. J. Craig Venter Institute.
837. **Saenz HL, Dehio C** (2005) Signature-tagged mutagenesis: technical advances in a negative selection method for virulence gene identification. *Curr Opin Microbiol* 8: 612-619.
838. **Turner AK, Barber LZ, Wigley P, Muhammad S, Jones MA, Lovell MA, Hulme S, Barrow PA** (2003) Contribution of proton-translocating proteins to the virulence of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Gallinarum, and Dublin in chickens and mice. *Infect Immun* 71: 3392-3401.
839. **Bjur E, Eriksson-Ygberg S, Aslund F, Rhen M** (2006) Thioredoxin 1 promotes intracellular replication and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 74: 5140-5151.
840. **Hertzberg KM, Gemmill R, Jones J, Calvo JM** (1980) Cloning of an *EcoRI*-generated fragment of the leucine operon of *Salmonella typhimurium*. *Gene* 8: 135-152.
841. **Henikoff S, Haughn GW, Calvo JM, Wallace JC** (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 6602-6606.
842. **Schell MA** (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 47: 597-626.
843. **Fang M, Majumder A, Tsai KJ, Wu HY** (2000) ppGpp-dependent *leuO* expression in bacteria under stress. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 64-70.
844. **Tenor JL, McCormick BA, Ausubel FM, Aballay A** (2004) *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence

- factors required for conserved host-pathogen interactions. *Curr Biol* 14: 1018-1024.
845. **Moorthy S, Watnick PI** (2005) Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Mol Microbiol* 57: 1623-1635.
846. **Rodriguez-Morales O, Fernandez-Mora M, Hernandez-Lucas I, Vazquez A, Puente JL, Calva E** (2006) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. *Infect Immun* 74: 1398-1402.
847. **Lawrenz MB, Miller VL** (2007) Comparative analysis of the regulation of *rovA* from the pathogenic yersiniae. *J Bacteriol* 189: 5963-5975.
848. **Hernandez-Lucas I, Gallego-Hernandez AL, Encarnacion S, Fernandez-Mora M, Martinez-Batallar AG, Salgado H, Oropeza R, Calva E** (2008) The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* 190: 1658-1670.
849. **Shimada T, Yamamoto K, Ishihama A** (2009) Involvement of the leucine response transcription factor LeuO in regulation of the genes for sulfa drug efflux. *J Bacteriol* 191: 4562-4571.
850. **Hernandez-Lucas I, Calva E** (2012) The coming of age of the LeuO regulator. *Mol Microbiol* 85: 1026-1028.
851. **Fernandez-Mora M, Puente JL, Calva E** (2004) OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. *J Bacteriol* 186: 2909-2920.
852. **Klauck E, Bohringer J, Hengge-Aronis R** (1997) The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Mol Microbiol* 25: 559-569.

853. **Ueguchi C, Ohta T, Seto C, Suzuki T, Mizuno T** (1998) The *leuO* gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. J Bacteriol 180: 190-193.
854. **Chen CC, Fang M, Majumder A, Wu HY** (2001) A 72-base pair AT-rich DNA sequence element functions as a bacterial gene silencer. J Biol Chem 276: 9478-9485.
855. **Stratmann T, Pul U, Wurm R, Wagner R, Schnetz K** (2012) RcsB-BglJ activates the *Escherichia coli leuO* gene, encoding an H-NS antagonist and pleiotropic regulator of virulence determinants. Mol Microbiol 83: 1109-1123.
856. **Dillon SC, Espinosa E, Hokamp K, Ussery DW, Casadesus J, Dorman CJ** (2012) LeuO is a global regulator of gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol 85: 1072-1089.
857. **Guzman L, Belin D, Carson M, Beckwith J** (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J Bacteriol 177: 4121-4130.
858. **Janis C, Grant AJ, McKinley TJ, Morgan FJ, John VF, Houghton J, Kingsley RA, Dougan G, Mastroeni P** (2011) *In vivo* regulation of the Vi antigen in *Salmonella* and induction of immune responses with an *in vivo*-inducible promoter. Infect Immun 79: 2481-2488.
859. **Yang X, Thornburg T, Suo Z, Jun S, Robison A, Li J, Lim T, Cao L, Hoyt T, Avci R, Pascual DW** (2012) Flagella overexpression attenuates *Salmonella* pathogenesis. PLoS One 7: e46828.
860. **Yang X, Suo Z, Thornburg T, Holderness K, Cao L, Lim T, Walters N, Kellerman L, Loetterle L, Avci R, Pascual DW** (2012) Expression of *Escherichia coli* virulence usher protein attenuates wild-type *Salmonella*. Virulence 3: 29-42.
861. **Pascual DW, Suo Z, Cao L, Avci R, Yang X** (2013) Attenuating gene expression (AGE) for vaccine development. Virulence 4: 384-390.

862. **Mousslim C, Hilbert F, Huang H, Groisman E** (2002) Conflicting needs for a *Salmonella* hypervirulence gene in host and non-host environments. *Mol Microbiol* 45: 1019-1027.
863. **Choi J, Groisman EA** (2013) The lipopolysaccharide modification regulator PmrA limits *Salmonella* virulence by repressing the type three-secretion system Spi/Ssa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 9499-9504.
864. **Foreman-Wykert AK, Miller JF** (2003) Hypervirulence and pathogen fitness. *Trends Microbiol* 11: 105-108.
865. **Ho TD, Slauch JM** (2001) Characterization of *grvA*, an antivirulence gene on the gifsy-2 phage in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* 183: 611-620.
866. **Gal-Mor O, Gibson DL, Baluta D, Vallance BA, Finlay BB** (2008) A novel secretion pathway of *Salmonella enterica* acts as an antivirulence modulator during salmonellosis. *PLoS Pathog* 4: e1000036.
867. **Prehna G, Li Y, Stoynov N, Okon M, Vuckovic M, McIntosh LP, Foster LJ, Finlay BB, Strynadka NC** (2012) The zinc regulated antivirulence pathway of *Salmonella* is a multiprotein immunoglobulin adhesion system. *J Biol Chem* 287: 32324-32337.
868. **Eswarappa SM, Karnam G, Nagarajan AG, Chakraborty S, Chakravorty D** (2009) *lac* repressor is an antivirulence factor of *Salmonella enterica*: its role in the evolution of virulence in *Salmonella*. *PLoS One* 4: e5789.
869. **Baek CH, Wang S, Roland KL, Curtiss R, 3rd** (2009) Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) acts as a virulence repressor in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 191: 1278-1292.
870. **Yamanaka K, Inouye M** (2001) Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 2808-2816.
871. **Ygberg SE, Clements MO, Rytkonen A, Thompson A, Holden DW, Hinton JC, Rhen M** (2006) Polynucleotide phosphorylase negatively

- controls *spv* virulence gene expression in *Salmonella enterica*. Infect Immun 74: 1243-1254.
872. **Purcell M, Shuman HA** (1998) The *Legionella pneumophila* *icmGCDJBF* genes are required for killing of human macrophages. Infect Immun 66: 2245-2255.
873. **Segal G, Purcell M, Shuman HA** (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 1669-1674.
874. **Altuvia S, Weinstein-Fischer D, Zhang A, Postow L, Storz G** (1997) A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. Cell 90: 43-53.
875. **Repoila F, Majdalani N, Gottesman S** (2003) Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. Mol Microbiol 48: 855-861.

ANNEXE 1 – Articles publiés comme 1^{er} auteur

Présentés aux pages suivantes sont deux articles rédigés en tant que 1^{er} auteur au cours de mon doctorat. Tous ces articles ont été révisés par les pairs avant leur publication.

1. **Sabbagh S**, Forest C, Lepage C, Leclerc J, Daigle F (2010) So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. FEMS Microbiol Lett 305: 1-13.

Dans cette revue de synthèse, les différences entre les sérovars Typhimurium et Typhi de *Salmonella enterica* sont soulevées, en terme de contenu génétique et de facteurs de virulence. Cette analyse comparative amène une meilleure compréhension à propos de la spécificité d'hôte et des pathologies distinctes provoquées par chaque sérovar.

2. **Sabbagh SC**, Lepage C, McClelland M, Daigle F (2012) Selection of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes involved during interaction with human macrophages by screening of a transposon mutant library. PLoS One 7: e36643.

Cet article de recherche comprend les résultats discutés dans cette thèse. On y décrit la sélection de gènes chez *Salmonella enterica* sérovar Typhi impliqués dans l'infection de macrophages humains. De plus, les phénotypes d'atténuation de plusieurs mutants de ces gènes sont répertoriés en détail.

So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi

Sébastien C. Sabbagh, Chantal G. Forest, Christine Lepage, Jean-Mathieu Leclerc & France Daigle

Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montréal, QC, Canada



Received 26 August 2009; revised 20 November 2009; accepted 2 January 2010.
Final version published online 8 February 2010.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x

Editor: Ian Henderson

Keywords

Salmonella; virulence factors; pathogenicity islands; *Salmonella* Typhimurium; *Salmonella* Typhi; comparative genomics.

Introduction

Salmonella evolved as an intracellular pathogen after diverging from a common ancestor with *Escherichia* 100–150 million years ago (Doolittle *et al.*, 1996). The nomenclature and taxonomy of *Salmonella* are complex, controversial, have changed over the years and are still evolving. The genus *Salmonella* is composed of two distinct species: *Salmonella bongori*, a commensal of cold-blooded animals, and *Salmonella enterica* (divided into six subspecies) (Le Minor *et al.*, 1987; Reeves *et al.*, 1989). The subspecies are classified into over 50 serogroups based on the O (somatic) antigen, and divided into > 2400 serovars based on the H (flagellar) antigen. Some serovars are ubiquitous and generalists, while others are specifically adapted to a particular host. Only a small fraction of serovars are associated with human infections and the majority belong to *S. enterica* ssp. I. *Salmonella enterica* ssp. I is responsible for two types of disease in humans due to ingestion of contaminated food or water: gastroenteritis, a localized infection or enteric fever (typhoid), a severe systemic infection.

Abstract

Salmonella enterica represents a major human and animal pathogen. Many *S. enterica* genomes have been completed and many more genome sequencing projects are underway, constituting an excellent resource for comparative genome analysis studies leading to a better understanding of bacterial evolution and pathogenesis. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Typhi are the best-characterized serovars, with the first being involved in localized gastroenteritis in many hosts and the latter causing a systemic human-specific disease. Here, we summarize the major genetic differences between the two different serovars. We detail the divergent repertoires of the virulence factors responsible for the pathogenesis of the organisms and that ultimately result in the distinct clinical outcomes of infection. This comparative genomic overview highlights hypotheses for future investigations on *S. enterica* pathogenesis and the basis of host specificity.

Gastroenteritis is caused mainly by *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) and *S. Enteritidis*. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium can colonize and infect a broad spectrum of warm- and cold-blooded hosts, belongs to serogroup B and is a prototroph (Fig. 1). Typhoid fever, a life-threatening illness that remains a global health problem, is caused mainly by *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), and a clinically indistinguishable condition is caused by *S. Paratyphi A*. *Salmonella enterica* serovar Typhi is a host-restricted serovar that specifically infects humans, belongs to serogroup D and is an auxotroph (Fig. 1). As *S. Typhi* is restricted to humans, there are no suitable animal models. In order to study typhoid fever pathogenesis, *S. Typhimurium* has been used for many years in a systemic infection model using susceptible mouse strains harbouring a mutation in the *Nramp1* (*Slc11a1*) protein (Vidal *et al.*, 1995). Moreover, the use of *S. Typhimurium* with strains of mice that possess the *Nramp*^{+/+} allele, which are consequently resistant to the infection, represents a model mimicking the long-term persistence observed in *S. Typhi* carriers (Monack *et al.*, 2004). These models have been crucial in

understanding systemic infections by *S. enterica*. However, as each serovar causes a distinct type of disease in humans, conclusions regarding *S. Typhi* pathogenesis in humans must be interpreted carefully.

Many recent reviews have extensively covered the literature on the pathogenesis of *S. enterica* (Grassl & Finlay, 2008; Haraga *et al.*, 2008; Tsolis *et al.*, 2008; McGhie *et al.*, 2009). This review presents a comparative analysis of the major genetic differences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi* and how this may contribute to our understanding of typhoid pathogenesis.

Genetic diversity

Organization of genomes allows us to gain a better understanding of the mechanisms by which species or serovars have evolved. Analysis of the chromosomal gene arrangement revealed that the genomic backbone of *S. Typhimurium* is very similar to the *Escherichia coli* genome. However, major differences in gene order have been observed in the *S. Typhi* chromosome. Differences in the *S. Typhi* genome occur mainly because of genomic rearrangements involving recombination between different rRNA operons (Liu & Sanderson, 1995; Liu & Sanderson, 1996) or IS200 elements (Alokam *et al.*, 2002). Each serovar evolves through the acquisition of genetic elements by horizontal gene transfer or by gene degradation. The genomes of *S. Typhimurium* strain LT2 and *S. Typhi* strain CT18 are composed of 4 857 432 and 4 809 037 bp, respectively (Fig. 2) (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001). Both serovars share about 89% of genes (McClelland *et al.*, 2001). Differences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi* include \approx 480 genes unique

to *S. Typhimurium* and \approx 600 genes unique to *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001). *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs), plasmids, functional prophages and phage remnants contribute significantly to the genetic diversity among *S. enterica* strains (Rotger & Casadesús, 1999; Boyd & Brüssow, 2002) and will be discussed below.

The low level of genetic variation observed in *S. Typhi* genomes of distinct isolates from around the world revealed a highly conserved and clonal relation, suggesting that they emerged from a single progenitor, making *S. Typhi* a monomorphic organism (Baker & Dougan, 2007; Holt *et al.*, 2008). Clonality is often encountered in human-restricted pathogens (Achtman, 2008). There is very little evidence of adaptive selection in *S. Typhi* genes, with the exception of a recent evolution in phenotypic traits that includes the acquisition of resistance to fluoroquinolones (Chau *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2007). Examination of DNA sequences and the rate of change of single-nucleotide polymorphisms suggest that *S. Typhi* may be only 50 000 years old, a short time frame for bacteria to accumulate diversity (Selander *et al.*, 1990; Kidgell *et al.*, 2002a,b; Roumagnac *et al.*, 2006). This situation strongly suggests that evolution in the *S. Typhi* strain population is mainly characterized by loss of gene function. *Salmonella enterica* serovar Typhi is an example of reductive evolution, where the adaptation to its human niche has led to the functional inactivation of genes, due to certain needs that have been satisfied by the host (Dagan *et al.*, 2006). Annotation of the first completed *S. Typhi* genome sequence revealed that > 200 genes have been disrupted or inactivated, representing approximately 5% of its genome (Parkhill *et al.*, 2001), a characteristic that was confirmed by the sequencing of other

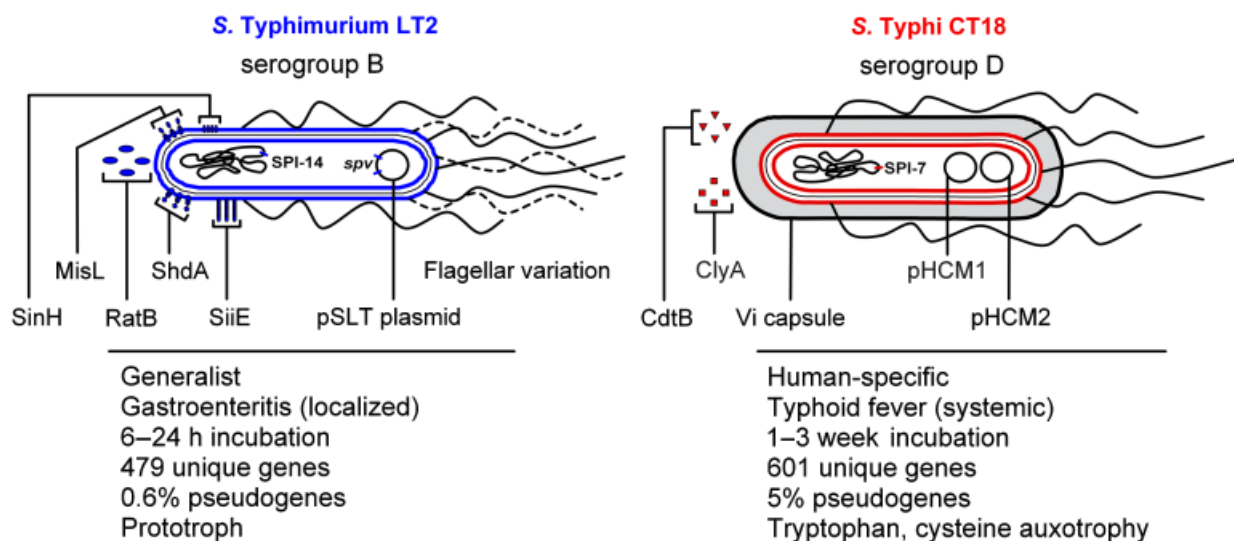


Fig. 1. Major features distinguishing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 from *S. Typhi* CT18.

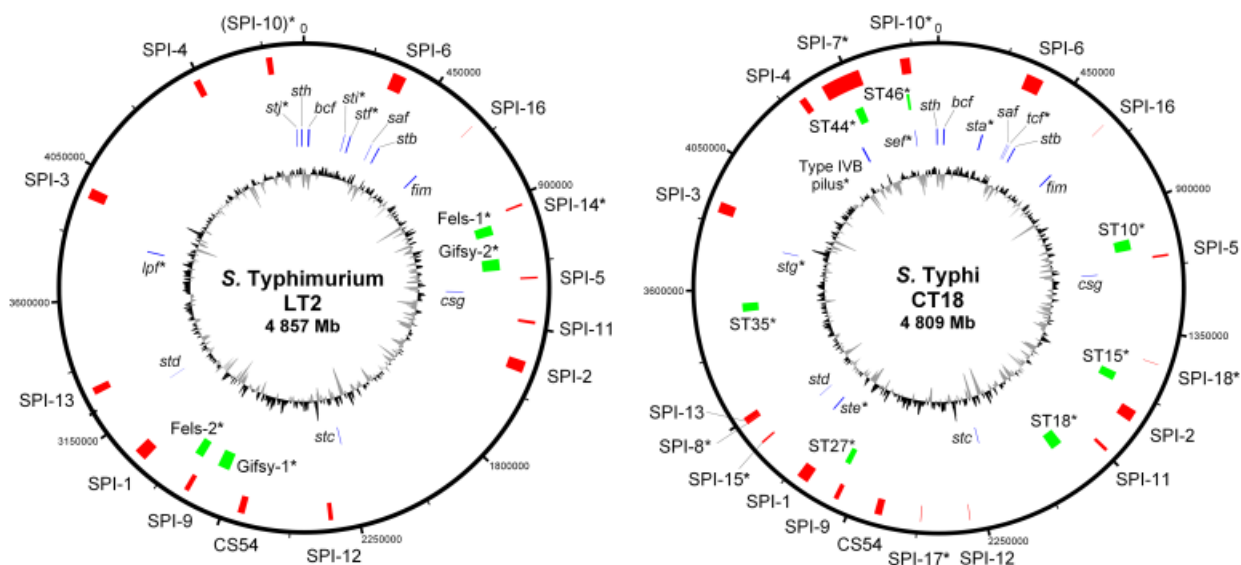


Fig. 2. Circular representation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 and *S. Typhi* CT18 chromosomes. The circles indicate the localization of the pathogenicity islands (red), the prophages and prophage remnants (green) and fimbrial operons (blue). The inner circle indicates the G+C content (values above the average content are in black, and those below are in grey). Asterisks indicate elements specific to each serovar. The outer scale is marked in bases. The chromosomes were generated using DNAPLOTTER software (Carver *et al.*, 2009).

S. Typhi strains (Deng *et al.*, 2003; Holt *et al.*, 2009). We will point out the different pseudogenes in each of the following sections. Surprisingly, most of the pseudogenes in *S. Typhi* are intact and fully functional in *S. Typhimurium* (McClelland *et al.*, 2001) and could explain in part the loss of host range for serovar *S. Typhi*. Interestingly, many pseudogenes from *S. Typhi* are also conserved in Paratyphi A, a serovar that has the ability to cause enteric fever that afflicts only humans (McClelland *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2009).

Plasmids

Most *S. Typhimurium* strains contain a self-transmissible virulence plasmid (pSLT) of about 90 kb harbouring virulence genes such as the *spv* operon, involved in intramacrophage survival, and the plasmid-encoded fimbriae (*pef*) fimbrial operon (Gulig & Doyle, 1993; Ahmer *et al.*, 1999; Rotger & Casadesús, 1999). When *S. Typhimurium* is cured of the plasmid, virulence in the mouse is decreased (Jones *et al.*, 1982) and can be complemented by the sole addition of the *spv* operon (Gulig *et al.*, 1992) encoding the SpvB toxin (Lesnick *et al.*, 2001). Additionally, *S. Typhimurium* can also carry multidrug-resistance plasmids of high molecular weight (up to 200 kb) and much smaller plasmids (< 20 kb) with unknown functions (Rychlik *et al.*, 2006). The pSLT virulence plasmid is absent in *S. Typhi* strains. In *S. Typhi*, *incHI* plasmids involved in multiple-drug resistance are commonly found (Maher & Taylor, 1993; Fica *et al.*, 1997; Wain *et al.*, 2003). *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CT18 harbours plasmid pHCM1, an *incHI1*

plasmid of about 218 kb with genes for resistance to antibiotics and heavy metals (Parkhill *et al.*, 2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi can also carry cryptic plasmids. *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CT18 harbours the cryptic plasmid pHCM2 of about 106 kb whose function is unknown, but it is rarely present in other strains (Parkhill *et al.*, 2001; Kidgell *et al.*, 2002a, b). Additionally, a 27-kb linear plasmid was recently isolated in *S. Typhi* strains originating from Indonesia. This plasmid carries the *fljB*^{z66} gene, encoding a flagellin antigen known as H:z66 (Baker *et al.*, 2007b). However, no plasmid has been identified yet in *S. Typhi* that has been associated with virulence.

Phages

Integrated bacteriophages represent major loci of genetic diversity in bacterial genomes (Brüssow *et al.*, 2004). *Salmonella* genomes contain several prophages or prophage remnants with similarity to the lambda, Mu, P2 and P4 families (Thomson *et al.*, 2004; Bossi & Figueroa-Bossi, 2005). The contribution of prophages to *S. enterica* virulence has been recognized only recently. Some prophages carry nonessential 'cargo' genes involved in fitness and/or virulence, including several type three secreted effectors (Ehrbar & Hardt, 2005). Each strain of *S. Typhimurium* seems to have a distinct set of prophage elements within its genome. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain LT2 harbours four prophages, including Gifsy-1, Gifsy-2, Fels-1 and Fels-2 (McClelland *et al.*, 2001; Brüssow *et al.*, 2004). Both the Gifsy-3 and the SopE prophages, found in *S. Typhimurium* strains 14028 and

SL1344, respectively, are absent in *S. Typhimurium* strain LT2 (Figuroa-Bossi *et al.*, 2001; Brüßow *et al.*, 2004; Thomson *et al.*, 2004). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains SL1344 and 14028 both contain Gifsy-1 and Gifsy-2, but not Fels-1 and Fels-2 (Figuroa-Bossi *et al.*, 2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi harbours seven distinct prophage-like elements, spanning > 180 kb, that are generally conserved between strains (Fig. 2) (Thomson *et al.*, 2004). The modular nature of prophage genomes makes a significant contribution to serovar variation and comprises most of the variation in gene content among strains of the same serovar (Boyd *et al.*, 2003; Vernikos *et al.*, 2007).

SPIs

Salmonella has many virulence-associated genes found within clusters in its genome, which are known as SPIs (Mills *et al.*, 1995). Virulence factors encoded by SPI genes tamper with host cellular mechanisms and are thought to dictate the host specificity of the different *S. enterica* serovars (Eswarappa *et al.*, 2008). Many of the SPIs are found next to a tRNA gene (Supporting Information, Fig. S1) and their G+C content differs from the rest of the genome (Fig. 2). Hence, such genomic islands were most likely inserted into the DNA of *Salmonella* by horizontal transfer events, although this explanation remains uncertain (Amavisit *et al.*, 2003). Twenty-one SPIs are known to date in *Salmonella* (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001; Chiu *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2005; Vernikos & Parkhill, 2006; Fuentes *et al.*, 2008; Blondel *et al.*, 2009). The *S. Typhimurium* and *S. Typhi* genomes contain 11 common SPIs (SPIs-1 to 6, 9, 11, 12, 13 and 16) (Fig. 2). SPIs-8 and 10 were initially found in *S. Typhi*, and considered as absent in *S. Typhimurium*. However, at both locations in *S. Typhimurium*, there is a completely different set of genes. There is only one SPI specific to *S. Typhimurium*, SPI-14 (Shah *et al.*, 2005), and four SPIs are specific to *S. Typhi* (SPIs-7, 15, 17 and 18) (Fig. 2). SPIs-19, 20 and 21 are absent in both of these serovars and will not be discussed further (Blondel *et al.*, 2009). Even if many of these islands are found in both serovars, differences emerge when comparing equivalent SPIs. In the following section, the genomic differences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi* are described for each SPI using *S. Typhimurium* strain LT2 and *S. Typhi* strain CT18 as the genomic references. Amino acid alignments of SPIs between these strains were performed using the XBASE software (Chaudhuri & Pallen, 2006) and can be seen in Fig. S1.

SPI-1 is a 40 kb locus located at centisome 63 encoding a type three secretion system (T3SS) (Mills *et al.*, 1995) and the *sit* metal transport system (Janakiraman & Slauch, 2000). The T3SS is involved in the invasion of nonphagocytic cells and proinflammatory responses (Galán & Curtiss, 1989; Mills *et al.*, 1995; Galán & Collmer, 1999). T3SS are used by the

bacteria to inject proteins, called effectors, directly inside the host cells that will act as mediators of cell invasion and modifications contributing to intracellular growth. Effectors can be encoded by genes located inside or outside SPI-1. Genomic comparison confirmed a high degree of identity between the two serovars and revealed the presence of four additional ORFs in *S. Typhimurium*, including the bacterial effector *avrA* (Hardt & Galán, 1997) and three distal ORFs (STM2901, STM2902 and STM2903) encoding putative cytoplasmic proteins (Fig. S1a) (Parkhill *et al.*, 2001). In *S. Typhi*, a partial insertion sequence and transposase are present at the end of the locus. Therefore, the major difference in SPI-1 between both serovars may be at the functional level, as some genes coding effectors located outside SPI-1 are missing (*sspH1*, *steB*) or are pseudogenes (*sopA*, *sopE2* and *slrP*) in *S. Typhi*. All known SPI-1 and SPI-2 effectors of the two serovars are listed in Table S1. Amino acid substitutions in the SipD translocon and the SptP effector were identified between these serovars and may reflect a potential functionality difference (Eswarappa *et al.*, 2008).

SPI-2 is a 40 kb locus inserted next to the *valV* tRNA gene at centisome 30 and encodes a second T3SS, which is involved in intracellular survival (Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998). Using comparative genomics, no major differences in SPI-2 were observed between both serovars (Fig. S1b). Three ORFs (STY1735, STY1739 and STY1742) are pseudogenes in *S. Typhi*. These ORFs, however, are not part of the T3SS, but part of a tetrathionate reductase complex. As with SPI-1, some genes encoding effectors in *S. Typhimurium* that are located outside SPI-2 are missing (*sseI*, *sseK1*, *sseK2* and *sseK3*) or are pseudogenes (*sopD2*, *sseJ*) in *S. Typhi* (Table S1). Molecular differences were observed in translocon genes *sseC* and *sseD*, and effectors *sseF* and *sifA* (Eswarappa *et al.*, 2008), reflecting a probable difference in functionality between these serovars.

SPI-3 is a 36 kb locus inserted next to the *selC* tRNA gene located at centisome 82, is involved in intracellular survival and encodes a magnesium transporter (Blanc-Potard & Groisman, 1997). SPI-3 shows extensive variations in its structure in various *S. enterica* serovars and can be divided into three regions (Fig. S1c) (Blanc-Potard *et al.*, 1999; Amavisit *et al.*, 2003). The region found next to the *selC* tRNA gene is where variations between *S. Typhimurium* and *S. Typhi* are the highest, including deletions and insertions. This region contains many pseudogenes in *S. Typhi*: STY4024 (*cigR*), STY4027 (*marT*), STY4030 (*misL*), STY4034, STY4035 and STY4037. A few more pseudogenes in *S. Typhi* are found in the second and third portions of SPI-3, including STY4012, STY4007 and STY4003 (Fig. S1c). In brief, the autotransporter MisL involved in intestinal colonization (Dorsey *et al.*, 2005), its regulator MarT (Tükel *et al.*, 2007) and an unknown putative transcriptional regulator (STY4012) are inactivated in *S. Typhi*.

SPI-4 is a 24 kb fragment located next to a potential tRNA-like gene at centisome 92 (Fig. S1d) and involved in adhesion to epithelial cells (Wong *et al.*, 1998). *SPI-4* harbours the *siiABCDEF* gene cluster encoding a type one secretion system (T1SS) for SiiE, a giant nonfimbrial adhesin of 595 kDa (Morgan *et al.*, 2004; Gerlach *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2007). SiiE mediates a close interaction with microvilli found on the apical side of epithelial cells, thereby aiding efficient translocation of *SPI-1* effectors required for apical membrane ruffling (Gerlach *et al.*, 2008). SiiE is encoded by one ORF in *S. Typhimurium* (STM4261), but is segmented into two ORFs in *S. Typhi* (STY4458 and STY4459) because of a stop codon, also present in *S. Typhi* strain Ty2 (Fig. S1d) (Deng *et al.*, 2003). This suggests that *siiE* is a pseudogene in *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2004), which correlates with a loss of function for an adhesin that contributes to intestinal colonization by *S. Typhimurium* (Morgan *et al.*, 2007).

SPI-5 is an island < 8 kb in size, inserted next to the *serT* tRNA gene at centisome 25, and is required for enteropathogenicity (Wood *et al.*, 1998). *SPI-5* encodes effectors of both *SPI-1* and *SPI-2*. No difference is observed between the two serovars, except that an additional ORF (STY1114) is predicted to encode a transposase in *S. Typhi* (Fig. S1e).

SPI-6 is located next to the *aspV* tRNA gene at centisome 7 and is a 47 kb island in *S. Typhimurium* (Folkesson *et al.*, 1999; Folkesson *et al.*, 2002), whereas it is rather 59 kb in *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001). It was previously shown that the complete deletion of this island reduced the entry of *S. Typhimurium* in Hep2 cells (Folkesson *et al.*, 2002). Located on this island are a type six secretion system (T6SS), the *safABCD* fimbrial gene cluster and the invasin *pagN* (Lambert & Smith, 2008), all present in both serovars (Folkesson *et al.*, 1999; Townsend *et al.*, 2001; Porwollik & McClelland, 2003). A 10 kb fragment downstream of the *saf* operon is found only in *S. Typhi*, and includes probable transposase remnants (STY0343 and STY0344, both pseudogenes), the fimbrial operon *tcfABCD* and genes *tinR* (STY0349) and *tioA* (STY0350) (Fig. S1f) (Folkesson *et al.*, 1999; Townsend *et al.*, 2001; Porwollik & McClelland, 2003). The T6SS of *S. Typhi* contains two pseudogenes, *scil* (STY0298) and *scis* (STY0308), and some ORFs are missing or divergent, probably rendering its T6SS nonfunctional. Interestingly, *scis* was shown to limit the intracellular growth of *S. Typhimurium* in macrophages at a late stage of infection and to decrease virulence in mice (Parsons & Heffron, 2005).

SPI-7 remains the largest island identified to date and is absent in *S. Typhimurium*, but present in *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001; Pickard *et al.*, 2003; Bueno *et al.*, 2004). In *S. Typhi*, it is 134 kb in size, corresponding to approximately 150 genes inserted between duplicated *pheU* tRNA sequences (Hansen-Wester & Hensel, 2002; Pickard *et al.*, 2003). This island contains the Vi capsule biosynthesis genes (Hashimoto *et al.*,

1993), whose production is associated with virulence (see section below), a type IVB pilus operon (Zhang *et al.*, 2000) and the *SopE* prophage (ST44) encoding the *SPI-1* effector *SopE* (Miroid *et al.*, 1999). *SopE* is also encoded in *S. Typhimurium*'s genome, but within the temperate *SopE* prophage (Hardt *et al.*, 1998) located at a different location (*sopE* is absent in most *S. Typhimurium* strains, including *S. Typhimurium* strain LT2, but present and located on a prophage in *S. Typhimurium* strains SL1344 and 14028) (Hardt *et al.*, 1998; Miroid *et al.*, 1999; Pelludat *et al.*, 2003). At the *SPI-7* location in *S. Typhimurium* LT2, we find a single complete *pheU* tRNA sequence and STM4320 (a putative *merR* family bacterial regulatory protein) (Fig. S1g).

SPI-8 is an 8 kb DNA fragment found next to the *pheV* tRNA gene that is part of *SPI-13* and will be discussed in that section (Fig. S1l) (Parkhill *et al.*, 2001; Hensel, 2004).

SPI-9 is a 16 kb locus present in both serovars (Fig. S1h). This island contains three genes encoding for a T1SS and one for a large protein, sharing an overall 40% nucleotide identity to *siiCDEF* genes from *SPI-4* (Morgan *et al.*, 2004, 2007). The large protein-coding ORF (STM2689) in *S. Typhimurium* strain LT2 was first suggested to be a pseudogene (McClelland *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2004). However, a subsequent study showed an undisrupted gene coding a putative 386 kDa product renamed BapA (Latasa *et al.*, 2005).

SPI-10 is an island found next to the *leuX* tRNA gene at centisome 93. This locus is completely different in each serovar and has been termed *SPI-10* only in *S. Typhi*. In *S. Typhimurium*, it is substituted by a 20 kb uncharacterized island without any *SPI* annotation (Fig. S1i), comprising functionally unrelated genes that share little homology to sequences from the genomic databases (Edwards *et al.*, 2001; Bishop *et al.*, 2005). However, a possible relationship of these genes with DNA repair has been proposed (Porwollik & McClelland, 2003). Deletion of this island in *S. Typhimurium* strain 14028 caused attenuation of virulence in mice (Haneda *et al.*, 2009). In *S. Typhi*'s genome, this island corresponds to a 33 kb fragment (Parkhill *et al.*, 2001) carrying a full P4-related prophage, termed ST46 (Edwards *et al.*, 2001; Thomson *et al.*, 2004; Bishop *et al.*, 2005). ST46 harbours the *prpZ* cluster as cargo genes encoding eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases involved in *S. Typhi* survival in macrophages (Faucher *et al.*, 2008). There is also a complete, but inactivated *sefABCDR* (*S. Enteritidis* fimbriae) fimbrial operon (Fig. S1i). Many pseudogenes are found in *S. Typhi*: STY4835 (*IS1230*), STY4836 (*sefA*), STY4839 (*sefD*), STY4841 (*sefR*), STY4845 (a thiol:disulphide interchange protein) and STY4848 (putative transposase) (Fig. S1i). Interestingly, ORFs STY4842–4846 of *S. Typhi* are homologues to *S. Typhimurium* genes located on the virulence plasmid, including *srgA* (Rodríguez-Peña *et al.*, 1997). *srgA* encodes a functional disulphide oxidoreductase in *S. Typhimurium* and is a

pseudogene in *S. Typhi* (STY4845) (Bouwman *et al.*, 2003). It was shown that *SrgA* acts in concert with *DsbA*, another disulphide oxidoreductase, to target *SipA* (a SPI-2 effector), and that an *srgA dsbA* double mutant had a stronger attenuation than either single mutants, with a level of attenuation similar to a SPI-2 mutant (Miki *et al.*, 2004).

SPI-11 was initially identified in the genome sequencing of serovar *Choleraesuis* as a 14 kb fragment inserted next to the Gifsy-1 prophage (Chiu *et al.*, 2005). This SPI is shorter in *S. Typhimurium* (6.7 kb) and in *S. Typhi* (10 kb) (Fig. S1j). *SPI-11* includes the *phoP*-activated genes *pagD* and *pagC* involved in intramacrophage survival (Miller *et al.*, 1989; Gunn *et al.*, 1995). The putative envelope lipoprotein *envF* is absent in *S. Typhi*, while six additional ORFs (STY1884–1891), including the typhoid toxin *cdtB*, are present in *S. Typhi* (Fig. S1j) (Spanò *et al.*, 2008).

SPI-12, located next to the *proL* tRNA gene at centisome 48, is 15.8 kb long in *S. Typhimurium* and 6.3 kb long in *S. Typhi* (Fig. S1k) (Hansen-Wester & Hensel, 2002). It contains the effector *SspH2* (Miao *et al.*, 1999). The additional 9.5 kb fragment in *S. Typhimurium* contains 11 ORFs, which include some putative and phage-associated genes as well as *oafA*, encoding a *Salmonella*-specific gene for O-antigen acetylase (Fig. S1k) (Slauch *et al.*, 1996; Hansen-Wester & Hensel, 2002). *SPI-12* was shown to be required for systemic infection of mice in *S. Typhimurium* strain 14028 (Haneda *et al.*, 2009). In *S. Typhi*, three ORFs are pseudogenes (STY2466a, STY2468 and STY2469), leaving only the *sspH2* gene as functional on this island.

SPI-13 was initially identified in serovar *Gallinarum* (Shah *et al.*, 2005). This 25 kb gene cluster is found next to the *pheV* tRNA gene at centisome 67 in *S. Typhimurium* and in *S. Typhi*. However, an 8 kb portion is different in each serovar and corresponds to SPI-8 only in *S. Typhi* (Fig. S1l). In *S. Typhimurium*, this region contains the ORFs STM3117 to STM3123, a cluster unique to *S. Typhimurium*, coding genes for a putative lyase, hydrolase, oxidase, arylsulphatase and arylsulphatase regulator as well as two putative LysR family transcriptional regulators (Fig. S1l). In strain *S. Typhimurium* 14028, STM3117–STM3121 are novel virulence-associated genes, as they were shown to be involved in systemic infection of mice (Haneda *et al.*, 2009) and replication inside murine macrophages (Shi *et al.*, 2006). In *S. Typhi*, the virulence function of SPI-8 is unknown and it harbours two bacteriocin immunity proteins (STY3281 and STY3283) and four pseudogenes (Fig. S1l) (Parkhill *et al.*, 2001). The 17 kb conserved portion of SPI-13 has not been shown to contribute to virulence (Haneda *et al.*, 2009).

SPI-14 corresponds to 9 kb present in *S. Typhimurium* at centisome 19 and is absent in *S. Typhi* (Shah *et al.*, 2005; Morgan, 2007). It harbours seven ORFs encoding putative cytoplasmic proteins (Fig. S1m). The function of genes on this island is unknown, but gene upregulation was observed

in macrophages infected by *S. Typhimurium* strain SL1344 (Eriksson *et al.*, 2003).

SPI-15 is a 6.5 kb island of five ORFs encoding hypothetical proteins, is inserted near the *glyU* tRNA gene in *S. Typhi* and is absent in *S. Typhimurium* (Fig. S1n) (Vernikos & Parkhill, 2006). Different genes are found at the same location in *S. Typhi* strain Ty2 (Fig. S1n) (Vernikos & Parkhill, 2006). *SPI-15*, as well as *SPI-16* and *17*, were identified by bioinformatic work (Vernikos & Parkhill, 2006).

SPI-16 is found in *S. Typhimurium* and *S. Typhi* as a 4.5 kb fragment inserted next to an *argU* tRNA site, and encodes five or seven ORFs, respectively, four of which are pseudogenes in *S. Typhi* (Fig. S1o). The three remaining ORFs show a high level of identity with P22 phage genes involved in seroconversion (Vernikos & Parkhill, 2006) and were suggested to mediate O-antigen glycosylation (Mavris *et al.*, 1997; Guan *et al.*, 1999) and cell surface variation (Allison & Verma, 2000; Bogomolnaya *et al.*, 2008). These ORFs (genes *yfdH*, *rfbI* and STM0557) were required for the intestinal persistence of *S. Typhimurium* in mice (Bogomolnaya *et al.*, 2008).

SPI-17 is a 5 kb island encoding six ORFs inserted next to an *argW* tRNA site and is absent in *S. Typhimurium*, but present in *S. Typhi* (Fig. S1p) (Vernikos & Parkhill, 2006). Seroconversion genes homologous to P22 phage are present and showed high homology to genes of *SPI-16*, including a putative lipopolysaccharide modification acyltransferase. Most of these genes (four) are pseudogenes in *S. Typhi* (Fig. S1p).

SPI-18 was recently identified in *S. Typhi* as a 2.3 kb fragment harbouring only two ORFs: STY1498 and STY1499 (Fig. S1q) (Fuentes *et al.*, 2008). *clyA* (STY1498), also known as *hlyE* or *sheA*, encodes a 34 kDa pore-forming secreted cytolysin found in *E. coli* and *S. enterica* serovars *Typhi* and *Paratyphi A* (del Castillo *et al.*, 1997; Green & Baldwin, 1997; Oscarsson *et al.*, 1999, 2002). *clyA* is important for invasion of human epithelial cells *in vitro*, with its heterologous expression in *S. Typhimurium* leading to colonization of deep organs in a murine model (Fuentes *et al.*, 2008). *taiA* (STY1499) is a secreted 27 kDa invasin that increases bacterial uptake by human macrophages (Faucher *et al.*, 2009). Both genes are part of a common operon and are controlled by the virulence-related regulator *PhoP* (Faucher *et al.*, 2009).

Other pathogenicity islands are found in the *S. Typhimurium* and *S. Typhi* genomes and have not been identified as SPIs, but encode genes responsible for virulence in the host, such as CS54. The CS54 island is a 25 kb region found between *xseA* and *yfgJ* at centisome 54 in *S. Typhimurium* (Kingsley *et al.*, 2003) and *S. Typhi* (Fig. S1r). Five genes are found within this island, which are *shdA*, *ratB*, *ratA*, *sinI* and *sinH* (*sivH*). In *S. Typhimurium*, *ShdA* was shown to be an outer membrane protein of the autotransporter family that binds fibronectin, *RatB* is a predicted secreted protein of unknown function and *SinH* is a putative outer membrane

protein (Kingsley & Bäumlér, 2002; Kingsley *et al.*, 2003; Abd El Ghany *et al.*, 2007). *shdA*, *ratB* and *sinH* (*sivH*) are all implicated in intestinal colonization of BALB/c mice by *S. Typhimurium*, but are all pseudogenes in *S. Typhi* (Kingsley *et al.*, 2003).

Other virulence factors

Fimbriae

Fimbriae or pili are proteinous structures found on bacteria that can mediate interaction with cells. Fimbriae are normally specific to a receptor and can be used at different critical times during the infection. Each serovar harbours a unique combination of fimbrial operons (Fig. 2). Whole-genome sequence analysis revealed eight putative fimbrial operons shared by both *S. Typhimurium* and *S. Typhi* [*bef*, *csf* (*agf*), *fim*, *saf*, *stb*, *stc*, *std*, *sth*] (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* possesses five unique fimbrial sequences known as *lpf*, *stf*, *pef*, *sti* and *stj* (McClelland *et al.*, 2001). These unique fimbriae were not involved in systemic colonization of the spleen, and *Lpf* was shown to be involved in intestinal colonization of mice (Weening *et al.*, 2005). A type IVB pilus located on SPI-7 is only found within the *S. Typhi* genome, along with five other unique fimbrial operons (*sef*, *sta*, *ste*, *stg* and *tcf*) (Parkhill *et al.*, 2001). For the majority of these fimbriae, little is known about their true function, expression conditions or their importance for virulence during infection. Type IV pili are used by *Typhi* for adhesion to human monocytes and epithelial cells by interaction with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator receptor (Pier *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Tsui *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2005). *Tcf* was recognized by human sera from patients with typhoid (Harris *et al.*, 2006) and *Stg* mediates adherence to epithelial cells and reduces phagocytosis (Forest *et al.*, 2007). All fimbrial operons are intact in *S. Typhimurium* strain LT2, although pseudogenes are found within six fimbrial operons of *S. Typhi* strain CT18 (*fimI*, *safE*, *sefA*, *sefD*, *befC*, *steA*, *stgC*, *sthE*) (Townsend *et al.*, 2001) (<http://www.pseudogene.org/cgi-bin/db-gen.cgi?type=Prokaryote>). The unique repertoire of fimbrial adhesion systems may explain in part some differences observed between the host tropism colonization niches of these two serovars.

Flagella

In *Salmonella*, the major subunit of flagella is usually encoded by *fliC* or *fljB*, which correspond to the H1 and H2 variants of the H antigen, respectively (Silverman & Simon, 1980). Only one type of flagellin can be expressed at a specific time by a mechanism known as phase variation (Lederberg & Iino, 1956; Simon *et al.*, 1980). This antigenic

variation can be observed in *S. Typhimurium*, but most *S. Typhi* strains are considered monophasic, as they lack a corresponding *fljB* locus (Frankel *et al.*, 1989). However, some *S. Typhi* isolates from Indonesia contain a linear plasmid encoding a novel flagellin, *fljB*^{z66}, but reversion to *fliC* is considered irreversible due to a deletion (Baker *et al.*, 2007a). *fliB*, involved in methylation of the flagellin in *S. Typhimurium*, is a pseudogene in *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001).

Vi antigen

The Vi antigen is a polysaccharidic capsule absent in *S. Typhimurium* and present in *S. Typhi*. Vi is important for virulence and is controlled by two loci: *viaA* and *viaB* (Kolyva *et al.*, 1992). The *viaB* locus located on SPI-7 is composed of two operons: *tviABCDE* and *vexABCDE*. The Vi capsule causes several differences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi* at the level of the host's response to infection. The Vi capsule is associated with inhibition of complement activation, resistance to serum and to phagocytosis and is involved in survival inside phagocytes (Looney & Steigbigel, 1986; Hirose *et al.*, 1997; Miyake *et al.*, 1998). The *viaB* locus lowers the invasiveness of the bacteria towards epithelial cells, as *viaB* mutants are superinvasive (Arricau *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001), and *S. Typhimurium* harbouring the *viaB* locus is less invasive (Haneda *et al.*, 2009). *TviA* avoids interleukin-8 production in the intestinal mucosa by repressing flagellin secretion, which reduces the recognition and activation of Toll-like receptor (TLR)-5 (Raffatellu *et al.*, 2005; Winter *et al.*, 2008). Vi also prevents the recognition of lipopolysaccharide by TLR-4 and reduces inflammation in the intestinal mucosa (Sharma & Qadri, 2004; Wilson *et al.*, 2008). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* sets off an immune response, which causes inflammation characterized by an important neutrophil influx that may be the result of its lack of capsule. Thus, Vi allows *S. Typhi* to disseminate systemically in its human host by crossing intestinal cells without activating the immune response, promotes resistance to killing by serum and contributes to survival inside phagocytes (Raffatellu *et al.*, 2006). Vi is a protective antigen and the actual constituent of the parenteral typhoid fever vaccine.

Conclusions

Acquisition and loss of genetic material play an important role in bacterial evolution. Here, we have described the major genetic differences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi*, two important *S. enterica* serovars associated with distinct diseases in humans (Fig. 1). Gene degradation in *S. Typhi* may be responsible for its human host restriction, but factors contributing to its systemic dispersion and survival during typhoid may be multiple and scattered, which

complicates the identification of genomic regions that reflect differences in habitat and lifestyle.

Each serovar is distinguished by its own repertoire of virulence factors, whether surface expressed or secreted, that leads to specific diseases or hosts. The bacterial cell surface is different between the two serovars, as represented by various O:H:K antigens. Lipopolysaccharide differences (O antigen) allowed the classification of *S. Typhimurium* in serogroup B, while *S. Typhi* belongs to serogroup D. Only *S. Typhimurium* is capable of phase variation of its H antigen, by differential expression of two flagella subunits. The most important feature is undoubtedly the presence of a polysaccharidic capsule (K antigen) specific to *S. Typhi*, the Vi antigen. However, it is also interesting to note that some *S. Typhi* strains and *S. Paratyphi A* lack the Vi antigen, but both cause a disease very similar to *S. Typhi* in the human host (McClelland *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2005).

Virulence factors can be secreted using the general secretion machinery of the bacteria or by specific systems, such as the T3SS used to inject proteins directly into the host. No major differences were observed in both T3SS (Fig. S1a,b), but some of the effectors were missing in *S. Typhi* (Table S1). However, the T6SS included on SPI-6 is probably inactivated in *S. Typhi* by the presence of pseudogenes. Some toxins were specific to *S. Typhimurium*, such as SpvB present on the virulence plasmid. On the other hand, the CdtB and ClyA toxins are only produced by *S. Typhi*.

Interestingly, most of the genes involved in intestinal colonization identified in *S. Typhimurium* are inactivated in *S. Typhi*. These genes encode autotransporters MisL and ShdA, adhesin SiiE, secreted protein RatB, putative outer membrane protein SinH and Lpf fimbriae (Fig. 1), suggesting that they are not needed by *S. Typhi* in the human host. This particular divergence is further acknowledged when looking at some work involving vaccine development (DiPetrillo *et al.*, 1999; Angelakopoulos & Hohmann, 2000; Hindle *et al.*, 2002). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *S. Typhi* live-attenuated vaccine strains, both modified with the same genetic deletions, did not show the same level of intestinal colonization when administered orally to human volunteers. Prolonged bacterial shedding by the host was observed over time with *S. Typhimurium*, but not with *S. Typhi*. Thus, precautions must be taken when extrapolating the *S. Typhimurium* data to *S. Typhi*. Many clinical trials investigating novel *S. Typhi* vaccine strains harbouring mutations that render *S. Typhimurium* avirulent and immunogenic in mice led to disappointing results at the attenuation level when administered to humans (Hone *et al.*, 1988; Tacket *et al.*, 1992a, b).

The completion of additional genome sequencing projects of other *Salmonella* serovars or strains will contribute considerably to our understanding of niche adaptation and bacterial evolution in general, as well as conceiving the

molecular basis of epidemics and how new virulent strains emerge. However, the availability of whole-genome sequences of several strains of different *S. enterica* serovars has not revealed any explanation that correlates with their specific niches and fitness, which suggests that the answer is probably already under our noses . . .

Acknowledgements

The authors would like to thank Charles M. Dozois and Frédéric Douesnard-Malo for critical comments concerning this manuscript. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) grant number 251114-06. S.C.S. was supported by a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). C.G.F. and J.M.L. were supported by scholarships from NSERC. C.G.F. was also supported by a scholarship from the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP).

References

- Abd El Ghany M, Jansen A, Clare S, Hall L, Pickard D, Kingsley R & Dougan G (2007) Candidate live, attenuated *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* vaccines with reduced fecal shedding are immunogenic and effective oral vaccines. *Infect Immun* **75**: 1835–1842.
- Achtman M (2008) Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens (review). *Annu Rev Microbiol* **62**: 53–70.
- Ahmer B, Tran M & Heffron F (1999) The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol* **181**: 1364–1368.
- Allison G & Verma N (2000) Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends Microbiol* **8**: 17–23.
- Alokam S, Liu S, Said K & Sanderson K (2002) Inversions over the terminus region in *Salmonella* and *Escherichia coli*: IS200s as the sites of homologous recombination inverting the chromosome of *Salmonella enterica* serovar *typhi*. *J Bacteriol* **184**: 6190–6197.
- Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF & Markham PF (2003) Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J Bacteriol* **185**: 3624–3635.
- Angelakopoulos H & Hohmann E (2000) Pilot study of phoP/phoQ-deleted *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Infect Immun* **68**: 2135–2141.
- Arricau N, Hermant D, Waxin H, Ecobichon C, Duffey P & Popoff M (1998) The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol Microbiol* **29**: 835–850.

- Baker S & Dougan G (2007) The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin Infect Dis* **45** (suppl 1): S29–S33.
- Baker S, Sarwar Y, Aziz H, Haque A, Ali A, Dougan G, Wain J & Haque A (2005) Detection of Vi-negative *Salmonella enterica* serovar typhi in the peripheral blood of patients with typhoid fever in the Faisalabad region of Pakistan. *J Clin Microbiol* **43**: 4418–4425.
- Baker S, Hardy J, Sanderson KE, Quail M, Goodhead I, Kingsley RA, Parkhill J, Stocker B & Dougan G (2007a) A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella* Typhi. *PLoS Pathog* **3**: e59.
- Baker S, Holt K, Whitehead S *et al.* (2007b) A linear plasmid truncation induces unidirectional flagellar phase change in H:z66 positive *Salmonella* Typhi. *Mol Microbiol* **66**: 1207–1218.
- Bishop A, Baker S, Jenks S *et al.* (2005) Analysis of the hypervariable region of the *Salmonella enterica* genome associated with tRNA(leuX). *J Bacteriol* **187**: 2469–2482.
- Blanc-Potard A & Groisman E (1997) The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* **16**: 5376–5385.
- Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J & Groisman EA (1999) The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **181**: 998–1004.
- Blondel C, Jimenez J, Contreras I & Santiviago C (2009) Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics* **10**: 354.
- Bogomolnaya L, Santiviago C, Yang H, Baumler A & Andrews-Polymenis H (2008) ‘Form variation’ of the O12 antigen is critical for persistence of *Salmonella* Typhimurium in the murine intestine. *Mol Microbiol* **70**: 1105–1119.
- Bossi L & Figueroa-Bossi N (2005) Prophage arsenal of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology* (Waldor M, Friedman DI & Adhya SL, eds), pp. 165–186. ASM Press, Washington DC.
- Bouwman C, Kohli M, Killoran A, Touchie G, Kadner R & Martin N (2003) Characterization of SrgA, a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid-encoded paralogue of the disulfide oxidoreductase DsbA, essential for biogenesis of plasmid-encoded fimbriae. *J Bacteriol* **185**: 991–1000.
- Boyd E & Brüssow H (2002) Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol* **10**: 521–529.
- Boyd E, Porwollik S, Blackmer F & McClelland M (2003) Differences in gene content among *Salmonella enterica* serovar typhi isolates. *J Clin Microbiol* **41**: 3823–3828.
- Brüssow H, Canchaya C & Hardt W (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol R* **68**: 560–602.
- Bueno SM, Santiviago CA, Murillo AA *et al.* (2004) Precise excision of the large pathogenicity island, SPI7, in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* **186**: 3202–3213.
- Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M & Parkhill J (2009) DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* **25**: 119–120.
- Chau T, Campbell J, Galindo C *et al.* (2007) Antimicrobial drug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhi in asia and molecular mechanism of reduced susceptibility to the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Ch* **51**: 4315–4323.
- Chaudhuri R & Pallen M (2006) xBASE, a collection of online databases for bacterial comparative genomics. *Nucleic Acids Res* **34**: D335–D337.
- Chiu C, Tang P, Chu C *et al.* (2005) The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res* **33**: 1690–1698.
- Dagan T, Blekhman R & Graur D (2006) The ‘domino theory’ of gene death: gradual and mass gene extinction events in three lineages of obligate symbiotic bacterial pathogens. *Mol Biol Evol* **23**: 310–316.
- del Castillo F, Leal S, Moreno F & del Castillo I (1997) The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol Microbiol* **25**: 107–115.
- Deng W, Liou SR, Plunkett G III *et al.* (2003) Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol* **185**: 2330–2337.
- DiPetrillo M, Tibbetts T, Kleanthous H, Killeen K & Hohmann E (1999) Safety and immunogenicity of *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Vaccine* **18**: 449–459.
- Doolittle R, Feng D, Tsang S, Cho G & Little E (1996) Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science* **271**: 470–477.
- Dorsey C, Laarakker M, Humphries A, Weening E & Bäuml A (2005) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* **57**: 196–211.
- Edwards R, Matlock B, Heffernan B & Maloy S (2001) Genomic analysis and growth-phase-dependent regulation of the SEF14 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Microbiology* **147**: 2705–2715.
- Ehrbar K & Hardt W (2005) Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect Genet Evol* **5**: 1–9.
- Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M & Hinton JC (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**: 103–118.
- Eswarappa S, Janice J, Nagarajan A, Balasundaram S, Karnam G, Dixit N & Chakravorty D (2008) Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*. *PLoS ONE* **3**: e3829.
- Faucher S, Forest C, Béland M & Daigle F (2009) A novel PhoP-regulated locus encoding the cytolysin ClyA and the secreted invasin TaiA of *Salmonella enterica* serovar Typhi is involved in virulence. *Microbiology* **155**: 477–488.

- Faucher SP, Viau C, Gros PP, Daigle F & Le Moual H (2008) The *prpZ* gene cluster encoding eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases is repressed by oxidative stress and involved in *Salmonella enterica* serovar Typhi survival in human macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **281**: 160–166.
- Fica A, Fernandez-Beros ME, Aron-Hott L, Rivas A, D'Ottone K, Chumpitaz J, Guevara JM, Rodriguez M & Cabello F (1997) Antibiotic-resistant *Salmonella typhi* from two outbreaks: few ribotypes and IS200 types harbor Inc HI1 plasmids. *Microb Drug Resist* **3**: 339–343.
- Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Malorli D & Bossi L (2001) Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* **39**: 260–271.
- Folkesson A, Advani A, Sukupolvi S, Pfeifer J, Normark S & Löfdahl S (1999) Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. *Mol Microbiol* **33**: 612–622.
- Folkesson A, Löfdahl S & Normark S (2002) The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol* **153**: 537–545.
- Forest C, Faucher SP, Poirier K, Houle S, Dozois CM & Daigle F (2007) Contribution of the *stg* fimbrial operon of *Salmonella enterica* serovar Typhi during interaction with human cells. *Infect Immun* **75**: 5264–5271.
- Frankel G, Newton S, Schoolnik G & Stocker B (1989) Unique sequences in region VI of the flagellin gene of *Salmonella typhi*. *Mol Microbiol* **3**: 1379–1383.
- Fuentes J, Villagra N, Castillo-Ruiz M & Mora G (2008) The *Salmonella* Typhi *hlyE* gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to *S. Typhimurium* promotes deep organ infection in mice. *Res Microbiol* **159**: 279–287.
- Galán J & Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322–1328.
- Galán J & Curtiss R III (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *P Natl Acad Sci USA* **86**: 6383–6387.
- Gerlach R, Cláudio N, Rohde M, Jäckel D, Wagner C & Hensel M (2008) Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol* **10**: 2364–2376.
- Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, Hardt WD & Hensel M (2007) *Salmonella* pathogenicity island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* **9**: 1834–1850.
- Grassl G & Finlay B (2008) Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Curr Opin Gastroen* **24**: 22–26.
- Green J & Baldwin M (1997) The molecular basis for the differential regulation of the *hlyE*-encoded haemolysin of *Escherichia coli* by FNR and HlyX lies in the improved activating region 1 contact of HlyX. *Microbiology* **143**: 3785–3793.
- Guan S, Bastin D & Verma N (1999) Functional analysis of the O antigen glucosylation gene cluster of *Shigella flexneri* bacteriophage SfX. *Microbiology* **145**: 1263–1273.
- Gulig P, Caldwell A & Chiodo V (1992) Identification, genetic analysis and DNA sequence of a 7.8-kb virulence region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *Mol Microbiol* **6**: 1395–1411.
- Gulig PA & Doyle TJ (1993) The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun* **61**: 504–511.
- Gunn J, Alpuche-Aranda C, Loomis W, Belden W & Miller S (1995) Characterization of the *Salmonella typhimurium* *pagC/pagD* chromosomal region. *J Bacteriol* **177**: 5040–5047.
- Haneda T, Ishii Y, Danbara H & Okada N (2009) Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol Lett* **297**: 241–249.
- Hansen-Wester I & Hensel M (2002) Genome-based identification of chromosomal regions specific for *Salmonella* spp. *Infect Immun* **70**: 2351–2360.
- Haraga A, Ohlson M & Miller S (2008) Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**: 53–66.
- Hardt W & Galán J (1997) A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. *P Natl Acad Sci USA* **94**: 9887–9892.
- Hardt W, Urlaub H & Galán J (1998) A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage. *P Natl Acad Sci USA* **95**: 2574–2579.
- Harris JB, Baresch-Bernal A, Rollins SM et al. (2006) Identification of *in vivo*-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* **74**: 5161–5168.
- Hashimoto Y, Li N, Yokoyama H & Ezaki T (1993) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of ViB region encoding Vi antigen in *Salmonella typhi*. *J Bacteriol* **175**: 4456–4465.
- Hensel M (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **294**: 95–102.
- Hensel M, Shea J, Waterman S et al. (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* **30**: 163–174.
- Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J et al. (2002) Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. *Infect Immun* **70**: 3457–3467.
- Hirose K, Ezaki T, Miyake M et al. (1997) Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted *Salmonella typhi* strains in cultured

- macrophage expressing different levels of CD14 antigen. *FEMS Microbiol Lett* **147**: 259–265.
- Holt K, Parkhill J, Mazzoni C *et al.* (2008) High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. *Nat Genet* **40**: 987–993.
- Holt K, Thomson N, Wain J *et al.* (2009) Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* **10**: 36.
- Hone D, Attridge S, Forrest B *et al.* (1988) A *galeE* via (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. *Infect Immun* **56**: 1326–1333.
- Janakiraman A & Slauch JM (2000) The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **35**: 1146–1155.
- Jones G, Rabert D, Svinarich D & Whitfield H (1982) Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella typhimurium* with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect Immun* **38**: 476–486.
- Kidgell C, Pickard D, Wain J *et al.* (2002a) Characterisation and distribution of a cryptic *Salmonella typhi* plasmid pHCM2. *Plasmid* **47**: 159–171.
- Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G & Achtman M (2002b) *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect Genet Evol* **2**: 39–45.
- Kingsley R & Bäumlner A (2002) Pathogenicity islands and host adaptation of *Salmonella* serovars. *Curr Top Microbiol* **264**: 67–87.
- Kingsley R, Humphries A, Weening E *et al.* (2003) Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun* **71**: 629–640.
- Kolyva S, Waxin H & Popoff M (1992) The Vi antigen of *Salmonella typhi*: molecular analysis of the *viaB* locus. *J Gen Microbiol* **138**: 297–304.
- Lambert M & Smith S (2008) The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol* **8**: 142.
- Lataca C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo J, Gamazo C, Penadés J & Lasa I (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* **58**: 1322–1339.
- Lederberg J & Iino T (1956) Phase variation in *Salmonella*. *Genetics* **41**: 743–757.
- Le Minor L, Popoff M, Laurent B & Hermant D (1987) Characterization of a 7th subspecies of *Salmonella*: *S. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. nov. *Ann Inst Pasteur Mic* **137B**: 211–217.
- Le T, Fabre L, Roumagnac P, Grimont P, Scavizzi M & Weill F (2007) Clonal expansion and microevolution of quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhi* in Vietnam from 1996 to 2004. *J Clin Microbiol* **45**: 3485–3492.
- Lesnick M, Reiner N, Fierer J & Guiney D (2001) The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **39**: 1464–1470.
- Liu S & Sanderson K (1996) Highly plastic chromosomal organization in *Salmonella typhi*. *P Natl Acad Sci USA* **93**: 10303–10308.
- Liu S-L & Sanderson KE (1995) Rearrangements in the genome of the bacterium *Salmonella typhi*. *P Natl Acad Sci USA* **92**: 1018–1022.
- Looney RJ & Steigbigel RT (1986) Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense *in vitro*. *J Lab Clin Med* **108**: 506–516.
- Maher D & Taylor DE (1993) Host range and transfer efficiency of incompatibility group HI plasmids. *Can J Microbiol* **39**: 581–587.
- Mavris M, Manning P & Morona R (1997) Mechanism of bacteriophage SfiI-mediated serotype conversion in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **26**: 939–950.
- McClelland M, Sanderson K, Spieth J *et al.* (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**: 852–856.
- McClelland M, Sanderson K, Clifton S *et al.* (2004) Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat Genet* **36**: 1268–1274.
- McGhie E, Brawn L, Hume P, Humphreys D & Koronakis V (2009) *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* **12**: 117–124.
- Miao E, Scherer C, Tsois R, Kingsley R, Adams L, Bäumlner A & Miller S (1999) *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* **34**: 850–864.
- Miki T, Okada N & Danbara H (2004) Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *J Biol Chem* **279**: 34631–34642.
- Miller SI, Kukral AM & Mekalanos JJ (1989) A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *P Natl Acad Sci USA* **86**: 5054–5058.
- Mills D, Bajaj V & Lee C (1995) A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* **15**: 749–759.
- Mirold S, Rabsch W, Rohde M *et al.* (1999) Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain. *P Natl Acad Sci USA* **96**: 9845–9850.
- Miyake M, Zhao L, Ezaki T *et al.* (1998) Vi-deficient and nonfimbriated mutants of *Salmonella typhi* agglutinate human blood type antigens and are hyperinvasive. *FEMS Microbiol Lett* **161**: 75–82.
- Monack DM, Bouley DM & Falkow S (2004) *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1* *+/+* mice and

- can be reactivated by IFN γ neutralization. *J Exp Med* **199**: 231–241.
- Morgan E (2007) *Salmonella* pathogenicity islands. *Salmonella Molecular Biology and Pathogenesis* (Rhen M, Maskell D, Mastroeni P & Threlfall J, eds), pp. 67–88. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Morgan E, Campbell JD, Rowe SC *et al.* (2004) Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **54**: 994–1010.
- Morgan E, Bowen A, Carnell S, Wallis T & Stevens M (2007) SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infect Immun* **75**: 1524–1533.
- Oscarsson J, Mizunoe Y, Li L, Lai XH, Wieslander A & Uhlin BE (1999) Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **32**: 1226–1238.
- Oscarsson J, Westermarck M, Lofdahl S *et al.* (2002) Characterization of a pore-forming cytotoxin expressed by *Salmonella enterica* serovars typhi and paratyphi A. *Infect Immun* **70**: 5759–5769.
- Pan Q, Zhang XL, Wu HY *et al.* (2005) Aptamers that preferentially bind type IVB pili and inhibit human monocytic-cell invasion by *Salmonella enterica* serovar typhi. *Antimicrob Agents Ch* **49**: 4052–4060.
- Parkhill J, Dougan G, James K *et al.* (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**: 848–852.
- Parsons DA & Heffron F (2005) *scsI*, an *icmF* homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun* **73**: 4338–4345.
- Pelludat C, Mirol S & Hardt W (2003) The SopEPhi phage integrates into the *ssrA* gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium A36 and is closely related to the Fels-2 prophage. *J Bacteriol* **185**: 5182–5191.
- Pickard D, Wain J, Baker S *et al.* (2003) Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol* **185**: 5055–5065.
- Pier G, Grout M, Zaidi T *et al.* (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* **393**: 79–82.
- Porwollik S & McClelland M (2003) Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* **5**: 977–989.
- Raffatellu M, Chessa D, Wilson R, Dusold R, Rubino S & Bäumlér A (2005) The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infect Immun* **73**: 3367–3374.
- Raffatellu M, Chessa D, Wilson R, Tükel C, Akçelik M & Bäumlér A (2006) Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun* **74**: 19–27.
- Reeves M, Evins G, Heiba A, Plikaytis B & Farmer J (1989) Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol* **27**: 313–320.
- Rodríguez-Peña J, Alvarez I, Ibáñez M & Rotger R (1997) Homologous regions of the *Salmonella enteritidis* virulence plasmid and the chromosome of *Salmonella typhi* encode thiol: disulphide oxidoreductases belonging to the DsbA thioredoxin family. *Microbiology* **143**: 1405–1413.
- Rotger R & Casadesús J (1999) The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol* **2**: 177–184.
- Roumagnac P, Weill F, Dolecek C *et al.* (2006) Evolutionary history of *Salmonella typhi*. *Science* **314**: 1301–1304.
- Rychlik I, Gregorova D & Hradecka H (2006) Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* **112**: 1–10.
- Selander R, Beltran P, Smith N *et al.* (1990) Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect Immun* **58**: 2262–2275.
- Shah D, Lee M, Park J, Lee J, Eo S, Kwon J & Chae J (2005) Identification of *Salmonella gallinarum* virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **151**: 3957–3968.
- Sharma A & Qadri A (2004) Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *P Natl Acad Sci USA* **101**: 17492–17497.
- Shea J, Hensel M, Gleeson C & Holden D (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *P Natl Acad Sci USA* **93**: 2593–2597.
- Shi L, Adkins JN, Coleman JR *et al.* (2006) Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar typhimurium inside macrophages. *J Biol Chem* **281**: 29131–29140.
- Silverman M & Simon M (1980) Phase variation: genetic analysis of switching mutants. *Cell* **19**: 845–854.
- Simon M, Zieg J, Silverman M, Mandel G & Doolittle R (1980) Phase variation: evolution of a controlling element. *Science* **209**: 1370–1374.
- Slauch J, Lee A, Mahan M & Mekalanos J (1996) Molecular characterization of the *oafA* locus responsible for acetylation of *Salmonella typhimurium* O-antigen: *oafA* is a member of a family of integral membrane trans-acylases. *J Bacteriol* **178**: 5904–5909.
- Spanò S, Ugalde J & Galán J (2008) Delivery of a *Salmonella* Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* **3**: 30–38.
- Tacket C, Hone D, Curtiss R III *et al.* (1992a) Comparison of the safety and immunogenicity of delta *aroC* delta *aroD* and delta *cya* delta *crp* *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infect Immun* **60**: 536–541.

- Tackett C, Hone D, Losonsky G, Guers L, Edelman R & Levine M (1992b) Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine* **10**: 443–446.
- Thomson N, Baker S, Pickard D *et al.* (2004) The role of prophage-like elements in the diversity of *Salmonella enterica* serovars. *J Mol Biol* **339**: 279–300.
- Townsend S, Kramer N, Edwards R *et al.* (2001) *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* **69**: 2894–2901.
- Tsolis R, Young G, Solnick J & Bäumlner A (2008) From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nat Rev Microbiol* **6**: 883–892.
- Tsui IS, Yip CM, Hackett J & Morris C (2003) The type IVB pili of *Salmonella enterica* serovar Typhi bind to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infect Immun* **71**: 6049–6050.
- Tükel C, Akçelik M, de Jong M, Simsek O, Tsolis R & Bäumlner A (2007) MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Bacteriol* **189**: 3922–3926.
- Vernikos G & Parkhill J (2006) Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics* **22**: 2196–2203.
- Vernikos GS, Thomson NR & Parkhill J (2007) Genetic flux over time in the *Salmonella* lineage. *Genome Biol* **8**: R100.
- Vidal S, Tremblay M, Govoni G *et al.* (1995) The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med* **182**: 655–666.
- Wain J, Diem Nga LT, Kidgell C *et al.* (2003) Molecular analysis of incHI1 antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever. *Antimicrob Agents Ch* **47**: 2732–2739.
- Weening EH, Barker JD, Laarakker MC, Humphries AD, Tsolis RM & Baumler AJ (2005) The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect Immun* **73**: 3358–3366.
- Wilson RP, Raffatellu M, Chessa D, Winter SE, Tükel C & Baumler AJ (2008) The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cell Microbiol* **10**: 876–890.
- Winter SE, Raffatellu M, Wilson RP, Russmann H & Baumler AJ (2008) The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. *Cell Microbiol* **10**: 247–261.
- Wong K, McClelland M, Stillwell L, Sisk E, Thurston S & Saffer J (1998) Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Infect Immun* **66**: 3365–3371.
- Wood M, Jones M, Watson P, Hedges S, Wallis T & Galyov E (1998) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella enteropathogenicity*. *Mol Microbiol* **29**: 883–891.
- Zhang XL, Tsui IS, Yip CM *et al.* (2000) *Salmonella enterica* serovar Typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **68**: 3067–3073.
- Zhao L, Ezak T, Li ZY, Kawamura Y, Hirose K & Watanabe H (2001) Vi-suppressed wild strain *Salmonella typhi* cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches. *Microbiol Immunol* **45**: 149–158.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Genomic comparison of pathogenicity islands from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 and *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18.

Table S1. List of SPI-1 and SPI-2 effectors from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 and *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18.

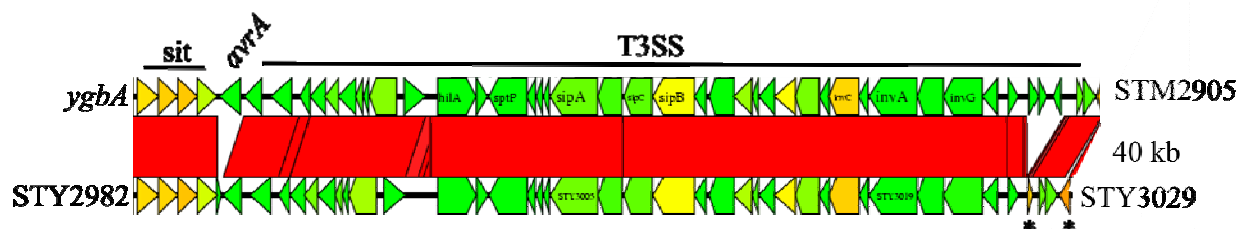
Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Figures supplémentaires de l'article 1 (Annexe 1). Sabbagh S, Forest C, Lepage C, Leclerc J, Daigle F (2010) So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. FEMS Microbiol Lett 305: 1-13.

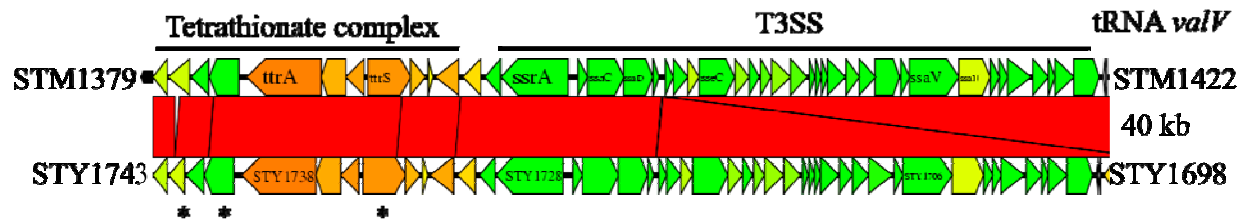
Fig. S1. Genomic comparison of pathogenicity islands from *S. Typhimurium* LT2 and *S. Typhi* CT18.

Pseudogenes in *S. Typhi* are represented by an asterisk (*). Amino acid sequence alignments of pathogenicity islands were generated using xBASE (promer) (Chaudhuri & Pallen, 2006).

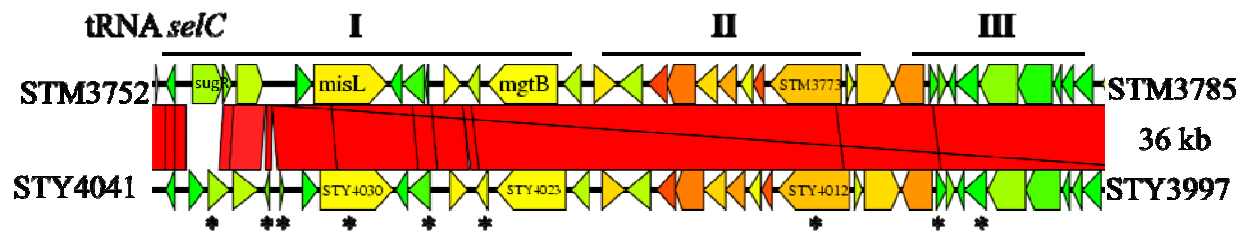
a) SPI-1



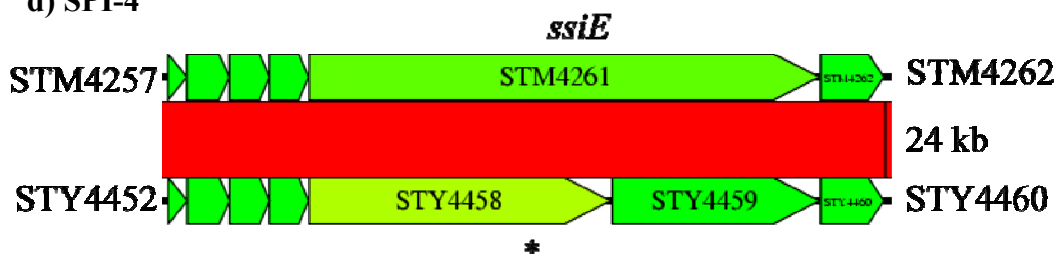
b) SPI-2



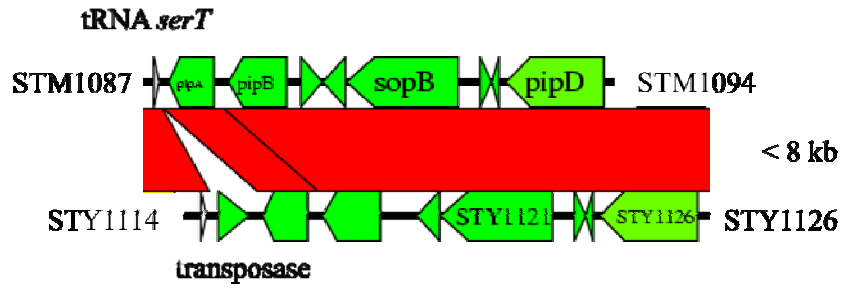
c) SPI-3



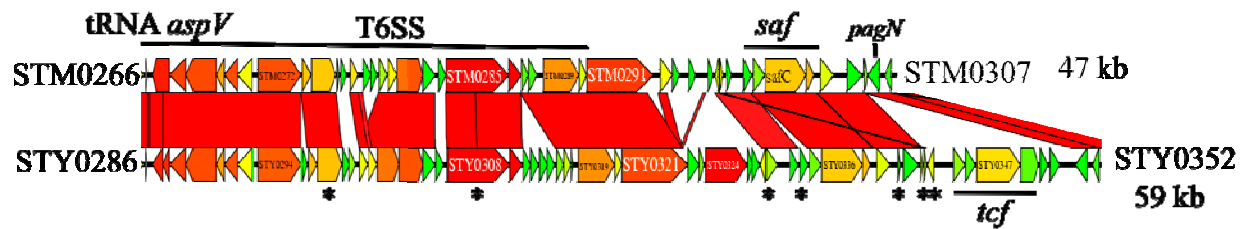
d) SPI-4



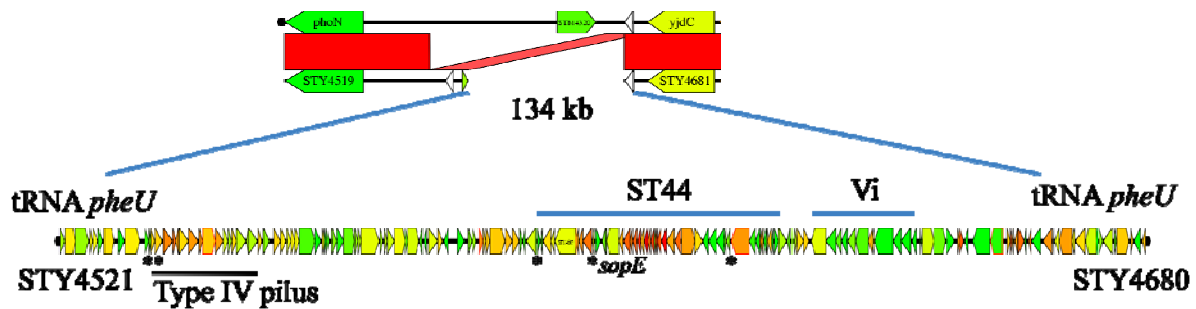
e) SPI-5



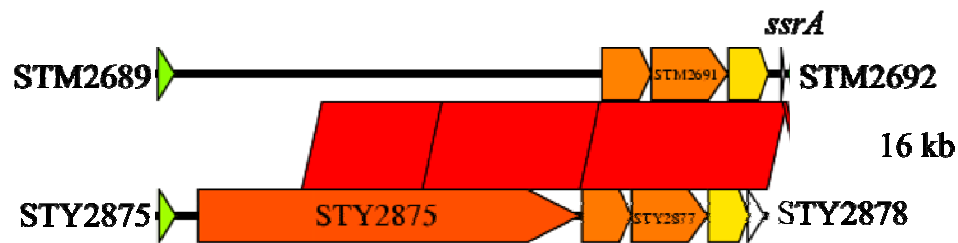
f) SPI-6



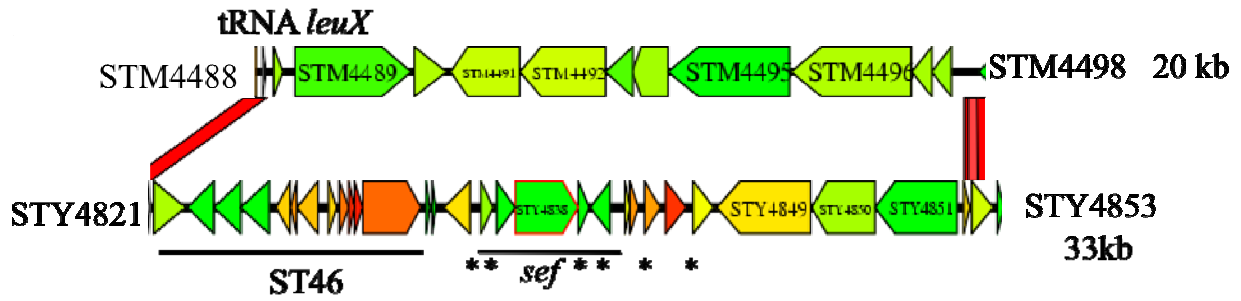
g) SPI-7



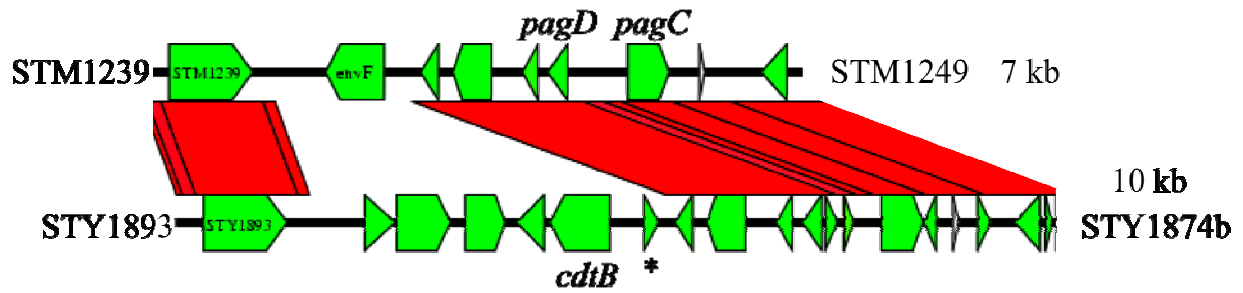
h) SPI-9



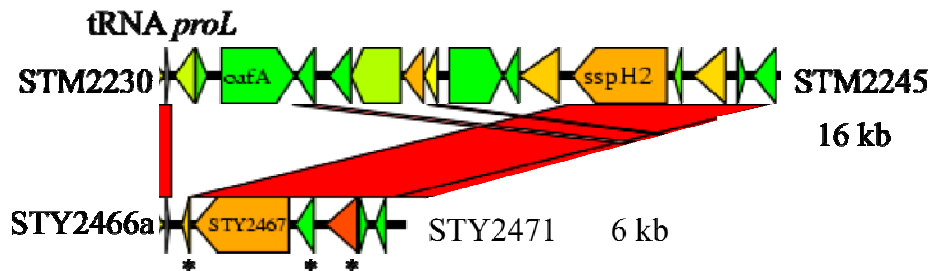
i) SPI-10



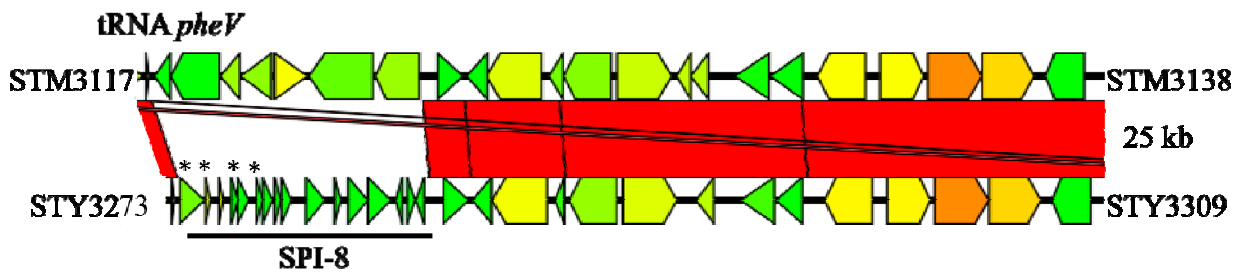
j) SPI-11



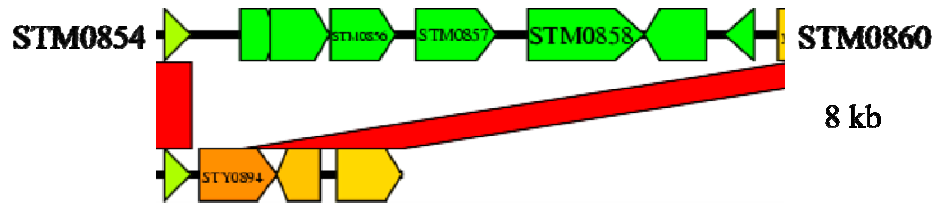
k) SPI-12



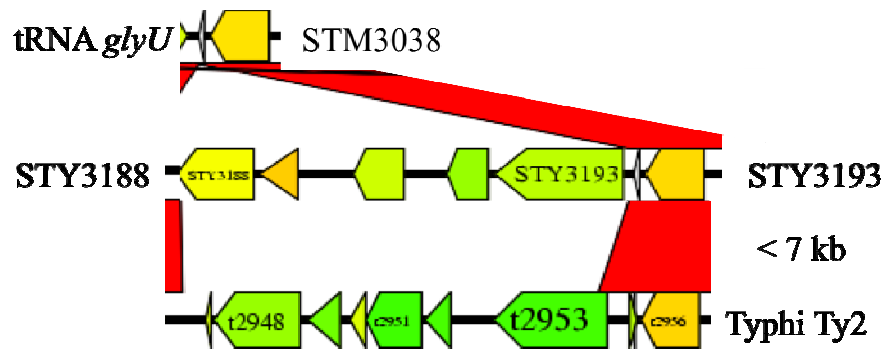
l) SPI-13



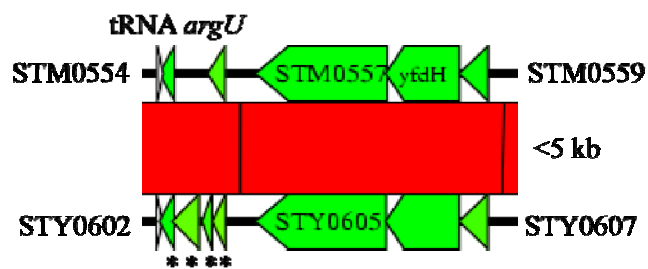
m) SPI-14



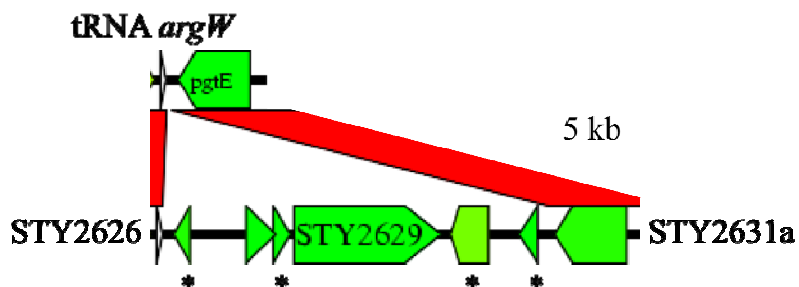
n) SPI-15



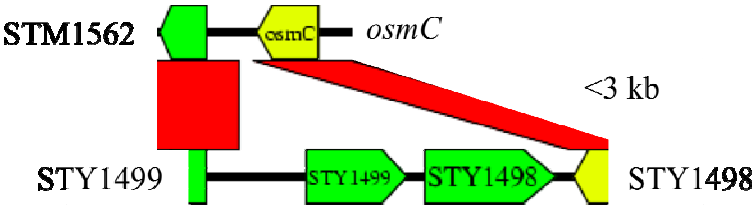
o) SPI-16



p) SPI-17



q) SPI-18



r) CS54

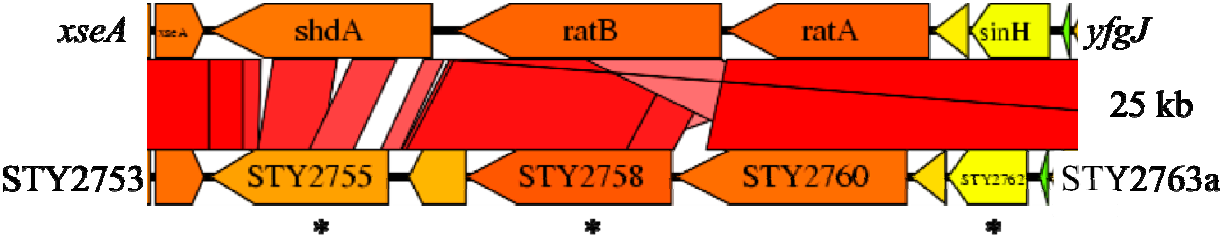


Table S1. List of SPI-1 and SPI-2 effectors from *S. Typhimurium* LT2 and *S. Typhi* CT18.

Effectors	LT2	CT18	% identity	% homology
<i>SPI1 T3SS</i>				
AvrA	STM2865	A ^c	- ^a	-
SipA (SspA)	STM2882	STY3005	97	98
SipB (SspB)	STM2885	STY3008	99	99
SipC (SspC)	STM2884	STY3007	99	99
SipD (SspD)	STM2883	STY3006	87	93
SopA	STM2066	(STY2275) ^b	-	-
SopB (SigD)	STM1091	STY1121	98	98
SopE	A ^c	STY4609	-	-
SopE2	STM1855	(STY1987)	-	-
SptP	STM2878	STY3001	94	96
SopD	STM2945	STY3073	98	99
SteA	STM1583	STY1482	88	93
SteB	STM1629	A	-	-
<i>SPI2 T3SS</i>				
GogB	STM2584	A	-	-
PipB	STM1088	STY1117	97	98
PipB2	STM2780	STY2897	91	96
SifA	STM1224	STY1264	93	95
SifB	STM1602	STY1462	98	99
SopD2	STM0972	(STY0971)	-	-
SpiC (SsaB)	STM1393	STY1727	100	100
SseF	STM1404	STY1716	96	96
SseG	STM1405	STY1715	98	99
SseI	STM1051	A	-	-
SseJ	STM1631	(STY1439a)	-	-
SseK1	STM4157	A	-	-
SseK2	STM2137	A	-	-
SseK3	A ^d	A	-	-
SseL	STM2287	STY2517	93	97
SspH2	STM2241	STY2467	99	99
SteC	STM1698	STY1353	91	95
SpvB	pSLT039	A	-	-
SpvC	pSLT038	A	-	-
<i>Translocated by both SPI1 and SPI2 T3SS</i>				
SlrP	STM0800	(STY0833)	-	-
SspH1	A	A	-	-

^aNo BlastP can be done.

^bORFs in parentheses and gray shade are pseudogenes.

^cOnly present in ATCC strain 14028 on Gifsy-3 prophage.

^dPresent on ST64B prophage.

^eA, absent from chromosome.

Selection of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Genes Involved during Interaction with Human Macrophages by Screening of a Transposon Mutant Library

Sébastien C. Sabbagh¹, Christine Lepage¹, Michael McClelland^{2,3}, France Daigle^{1*}

1 Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, **2** Vaccine Research Institute of San Diego, San Diego, California, United States of America, **3** Department of Pathology and Laboratory Medicine, School of Medicine, University of California Irvine, Irvine, California, United States of America

Abstract

The human-adapted *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) causes a systemic infection known as typhoid fever. This disease relies on the ability of the bacterium to survive within macrophages. In order to identify genes involved during interaction with macrophages, a pool of approximately 10⁵ transposon mutants of *S. Typhi* was subjected to three serial passages of 24 hours through human macrophages. Mutants recovered from infected macrophages (output) were compared to the initial pool (input) and those significantly underrepresented resulted in the identification of 130 genes encoding for cell membrane components, fimbriae, flagella, regulatory processes, pathogenesis, and many genes of unknown function. Defined deletions in 28 genes or gene clusters were created and mutants were evaluated in competitive and individual infection assays for uptake and intracellular survival during interaction with human macrophages. Overall, 26 mutants had defects in the competitive assay and 14 mutants had defects in the individual assay. Twelve mutants had defects in both assays, including *acrA*, *exbDB*, *flhCD*, *fliC*, *gppA*, *mlc*, *pgtE*, *typA*, *waaQGP*, *SPI-4*, *STY1867-68*, and *STY2346*. The complementation of several mutants by expression of plasmid-borne wild-type genes or gene clusters reversed defects, confirming that the phenotypic impairments within macrophages were gene-specific. In this study, 35 novel phenotypes of either uptake or intracellular survival in macrophages were associated with *Salmonella* genes. Moreover, these results reveal several genes encoding molecular mechanisms not previously known to be involved in systemic infection by human-adapted typhoidal *Salmonella* that will need to be elucidated.

Citation: Sabbagh SC, Lepage C, McClelland M, Daigle F (2012) Selection of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Genes Involved during Interaction with Human Macrophages by Screening of a Transposon Mutant Library. PLoS ONE 7(5): e36643. doi:10.1371/journal.pone.0036643

Editor: Michael Hensel, University of Osnabrueck, Germany

Received: December 8, 2011; **Accepted:** April 4, 2012; **Published:** May 4, 2012

Copyright: © 2012 Sabbagh et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work described in this manuscript was supported by the Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) grant number 251114-06. SCS was supported by scholarships from NSERC and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). CL was supported by a scholarship from the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The human specific pathogenic bacteria *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) is responsible for the systemic infection known as typhoid fever. Epidemiological studies show that in 2000, typhoid fever caused nearly 22 million infections, while killing more than 200 000 individuals in endemic countries of the world [1]. Unfortunately, multidrug-resistant strains of *S. Typhi* are arising in many of these regions, rendering typhoid treatment more complex and difficult than ever [2]. Hence, there is a critical need to uncover new potential therapeutic targets within this pathogen, leading to either new antimicrobials or more effective vaccine therapy against typhoid fever [3].

Survival of *Salmonella* within macrophages is crucial for systemic infection, since mutants that fail to replicate in these cells *in vitro* are avirulent in animals [4]. Thus, macrophage infection represents a good model for the study of *Salmonella* genes involved in virulence. Genes playing a role in intracellular survival within macrophages have been identified. Some of these include the *phoPQ* regulatory system [5–8] as well as components of the type

three secretion system (T3SS) encoded by *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 genes [9–11]. The critical role of SPI-2 T3SS regarding intramacrophage survival has been clearly demonstrated for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) [11–13], which causes localized gastroenteritis during human infection and systemic disease in mice. Interestingly, although both *S. Typhi* and *S. Typhimurium* serovars are closely related, and have about 90% of their genomes in common [14], SPI-2 T3SS was not essential for *S. Typhi* survival within human macrophages [8], whereas no major differences in SPI-2 T3SS genetic composition were observed between both serovars [15]. Vaccine development has also witnessed many situations where inactivation of the same genes in both serovars led to different phenotypes in the animal model or human host [16–21]. Moreover, the intracellular strategies used by *Salmonella* are not fully understood, suggesting that several genes used by the bacteria to survive inside macrophages remain to be identified.

Screening methods have been developed to comprehensively identify genes involved during infection. Signature-tagged mutagenesis (STM) was the first technique to simultaneously screen a

pool of mutants obtained by transposon insertion to identify virulence genes in an animal model [22]. With this strategy, mutants from the initial input pool that are underrepresented in the output pool point towards candidate genes potentially involved during infection. Recent advances, including genome sequencing and microarrays, have led to even more sophisticated screening techniques and have been used successfully to identify virulence genes of *S. Typhimurium* in macrophages and within mice [23–26]. In order to extend our knowledge on the genetic determinants of *Salmonella* used during interaction with macrophages, such a strategy was applied to identify genes for which mutants were underrepresented following competitive passage of a transposon mutant library through macrophages, with the unprecedented use of serovar Typhi and human macrophages. Following the screening, isogenic markerless deletion mutants were created to verify the phenotypes associated with uptake and intracellular survival, using mixed and individual infection experiments. Most importantly, several new *S. Typhi* genes involved during interaction with human macrophages were identified.

Materials and Methods

Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. Bacteria were routinely grown overnight statically (low aeration) in Luria-Bertani (LB) broth and plates at 37°C, unless indicated. Auxotrophy among deletion mutants was tested using M63-glucose minimal medium supplemented with 40 mg/L tryptophan, 40 mg/L cysteine, and 0.6% (w/v) glucose during overnight growth and optical densities at 600 nm (OD₆₀₀) of these cultures were compared to that of the wild-type. In order to evaluate resistance of mutants to the detergent sodium deoxycholate (DOC), bacteria were grown overnight in RPMI 1640 (Wisent) medium containing 0.1% (w/v) DOC. OD₆₀₀ were compared to that of the wild-type. To test survival of mutant *acrA* in DOC, 5 × 10⁶ CFUs of an overnight culture grown statically were inoculated in 1 ml of 0.1% (w/v) DOC in PBS. Samples were left on ice and viable bacteria were determined as CFUs at 0 and 2 hours (h) after inoculation. When necessary, antibiotics or supplements were added at concentrations of 50 µg ml⁻¹ for ampicillin (Ap), kanamycin (Km), nalidixic acid (Nal) or diamino-pimelic acid (DAP); 34 µg ml⁻¹ for chloramphenicol (Cm); or 50 µM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Transformation of bacterial strains was routinely done by using the calcium/manganese-based method or by electroporation [27].

Construction of the transposon harbouring a T7 RNA polymerase promoter for generation of the mutant library

A PCR-based strategy was used to insert a T7 RNA polymerase promoter at the 3' region of the mini-Tn10-Km transposon from the pLOFKm suicide conjugative plasmid [28], kindly provided by Kenneth E. Sanderson, University of Calgary. This vector contains a mini-Tn10-Km transposon with IS10 inverted repeated sequences flanking a kanamycin resistance (Km^r) cassette and an IPTG-inducible transposase located outside the mobile element. The Km^r cassette was amplified with a primer that added the T7 promoter at its 3' end (Front NotI-Kan and Rear NotI-Kan) (Table S2). The PCR product was ligated into pLOFKm, both digested with *NotI*, thus creating pLOFKm-T7 (pSIF117). This plasmid was transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) MGN-617 [29] and conjugated into *S. Typhi* wild-type strain ISP1820 [30] with IPTG present in the agar mating plate. Approximately 10⁵

transposon insertion mutants (Km^r) were obtained and represent the library of mutants used for our screening.

Competitive selection of the mutant library in cultured macrophages

The human monocyte cell line THP-1 (ATCC TIB-202) was maintained in RPMI 1640 containing 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Wisent), 25 mM HEPES (Wisent), 2 mM L-glutamine (Wisent), 1 mM sodium pyruvate (Wisent) and 1% modified Eagle's medium nonessential amino acids (Wisent). A stock culture of these cells was maintained as monocyte-like, non-adherent cells at 37°C in an atmosphere containing 5% (v/v) CO₂. For screening, 10⁷ macrophages were seeded in a 100 × 20 mm Petri dish (Sarstedt) and differentiated by addition of 10⁻⁷ M phorbol 12-myristate 13-acetate for 48 h. Prior to infection, the macrophage supernatant was changed with fresh medium at 37°C. The mutant library (used as input pool) was grown overnight statically in 20 ml LB with Km at 37°C and used to infect two separate macrophage monolayers (generating two independent output pools). Bacteria were added at a multiplicity of infection (MOI) of 10 to the cell monolayer and incubated at 37°C for 30 minutes to allow internalization. This corresponds to the initial interaction with cells, where some bacteria will be associated (adherence) and some will be intracellular (uptake). Cells were then washed three times with prewarmed PBS, pH 7.4, and medium containing 100 µg ml⁻¹ of gentamicin (Wisent) was added to kill extracellular bacteria (0 h). After 2 h of incubation with high-concentration gentamicin at 37°C, cells were washed and medium containing 12 µg ml⁻¹ of gentamicin was added for the remainder of the experiment. After 22 h of low-concentration gentamicin treatment (24 h post-infection), cells were washed and lysed by addition of 10 ml 0.1% (w/v) DOC in PBS. The lysate was centrifuged and bacteria were resuspended in 20 ml LB with Km and grown overnight statically at 37°C for the next serial passage in macrophages. After three serial passages through macrophages, bacteria released from infected macrophages were grown overnight with agitation in LB with Km at 37°C and represent the output pools (two output pools were generated in parallel). Bacterial cultures from the macrophage output pools and from the initial input pool were used for genomic DNA extraction.

Amplification and labelling of transposon-flanking sequences

Genomic DNA from the input and output pools was isolated using phenol/chloroform extraction, followed by ethanol precipitation [31]. Four µg of genomic DNA from each pool was sonicated using five pulses of two seconds each, with a Sonics & Materials Vibra-cell VC600 device (Sonics & Materials Inc., Danbury, CT). Sonicated genomic DNA was then poly(A)-tailed with terminal transferase (TdT) (New England Biolabs) and purified as described previously [23]. Purified sonicated poly(A)-tailed DNA obtained from input and output pools was used as template for nested PCR reactions as previously described [23] with some modifications, in order to specifically amplify the segments encompassing the 3' end of the transposon (including the inserted T7 RNA polymerase promoter) and the adjacent genomic DNA region. Briefly, 50 ng of purified sonicated poly(A)-tailed DNA was included in the first round of nested PCR in a total volume of 25 µL. This reaction combined 1 × PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 µM primers pLOF F seq and CCT₂₄VN (the latter made to anneal to the poly(A)-tail), and 1.25 U Taq polymerase (Feldan). The PCR steps followed were: initial denaturation (hot start) at 94°C for 1 minute, then 30 cycles

including denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 50°C for 30 seconds, and elongation at 72°C for 30 seconds. The reaction ended with one last elongation at 72°C for 3 minutes. The second round of nested PCR was done in a volume of 50 μ L and included 1 μ L of the first PCR amplification reaction, internal primer STY:PCRNiche#2 and primer CCT₂₄VN used in the first round. The amplified DNA was then subjected to an *in vitro* transcription reaction, using the MEGAscript T7 High yield transcription kit (Ambion) with 5 μ L of the nested PCR reaction included directly as the template in a 20 μ L reaction, by following the manufacturer's protocol with some modifications. Briefly, the transcription reaction was done at 37°C for 2 h, and subsequently, the synthesized RNA was treated with DNase (Ambion) for 30 minutes at 37°C, purified with the RNeasy Mini kit (Qiagen) and eluted in RNase-free H₂O.

Purified RNA was used to synthesize labelled cDNA probes as described previously [32], except that 4.8 μ g of total RNA were added to 4 μ g of random hexamers (Sigma) and reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) while incorporating Cy5-dCTP (Amersham Biosciences) for the input (control sample) and Cy3-dCTP (Amersham Biosciences) for the output (experimental sample). Labelled first-strand cDNA was column-purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen), and eluted with RNase-free H₂O.

Microarray hybridization of labelled cDNA

The non-redundant *Salmonella* microarray that comprises >98% of *S. Typhi* strain CT18 genes was used as described previously [32,33]. Microarrays were scanned using a GenePix 4000B laser scanner (Molecular Devices) at 5 μ m resolution and signal intensities were quantified with GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments). Background subtraction was done with GenePix Pro, by applying the software's default «local median intensity» subtraction method. Results were normalized and analyzed using WebArrayDB (<http://www.webarraydb.org>) [34]. Genes with a signal intensity two standard deviations above the average background level were considered as detected [32]. The array platform and hybridization data are MIAME-compliantly deposited at <http://www.webarraydb.org> (MPMDB ID 144).

Generation of individual mutants and complementation

Gene deletions were generated by allelic exchange as described previously [30], by using the overlap-extension PCR method [35]. Primers used for each gene are listed in Table S2. Mutations were confirmed by PCR. Complementation of mutants was performed by cloning an intact copy of the *S. Typhi* wild-type gene or gene cluster into the low-copy-number vector pWSK29 [36]. This plasmid has been shown to have no deleterious effect on *S. Typhi* infection of host cells [37]. For infection assays, the complemented strains were grown overnight in LB with Ap.

Infection assays of cultured human macrophages

For competitive index (CI) experiments in macrophages [38], a spontaneous nalidixic acid-resistant (Nal^r) *S. Typhi* ISP1820 strain was used as the wild-type (DEF566). This Nal^r strain showed no intracellular attenuation compared with strain ISP1820 when both were used in a CI experiment in THP-1 macrophages [8]. The wild-type and mutant strains used for competition experiments were separately grown overnight (static) in LB broth and the concentration (CFU/ml) of each strain was evaluated by OD₆₀₀ of the suspension culture. CFU counts obtained by plating on LB agar with and without antibiotic assessed that the mixture contained equivalent numbers of actual viable bacteria from each strain. The 1:1 mixture (CFU/ml) of the two cultures was added to

the THP-1 cell monolayer as described above for screening of the mutant library, except that cells were seeded at 5×10⁵ cells per well in 24-well tissue-culture dishes at an MOI of 50 [38]. Cells were lysed by addition of 1 ml 0.1% (w/v) DOC in PBS per well, and the numbers of viable intracellular bacteria were determined as CFUs at 0 and 24 h after infection by plating on LB agar and on LB agar with antibiotic. For CI experiments involving plasmid-rescued mutant strains, the complemented mutant was grown overnight separately in LB broth with Ap, resuspended in LB without antibiotic, and used to prepare a 1:1 mixture (CFU/ml) with the mutant. The CI for bacterial uptake is defined as the mutant to wild-type ratio of bacteria recovered at 0 h divided by the equivalent ratio of bacteria in the mixed inoculum. The CI for bacterial survival is defined as the mutant to wild-type ratio of bacteria recovered at 24 h post-infection divided by the equivalent ratio of bacteria recovered at 0 h. Results are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments performed in duplicate and Student's two-tailed *t*-test was used for statistical analysis.

Macrophage infection with individual mutants was performed as described above for the CI assay, except that an MOI of 10 was used. Bacterial uptake was defined as the number of bacteria recovered at 0 h after infection divided by the number of bacteria in the inoculum. Survival was defined as the number of bacteria recovered 24 h after infection divided by the number of bacteria recovered at 0 h. In order to compare data from different experiments, the values representing recovery percentages were then normalized relative to that of the wild-type control, which was designated 100% at each time point, unless indicated. Results are expressed as the mean ± SEM of at least three independent experiments performed in duplicate and Student's two-tailed *t*-test was used for statistical analysis.

Motility assay

Mutants were tested for their ability to swim in LB 0.3% agar plates as previously described [39], with some modifications. Prior to inoculation, the plates were allowed to dry for 1 h under a sterile laminar flow hood at room temperature. Strains were grown overnight with agitation in LB at 37°C, were then diluted 1:100 in LB and grown with agitation at 37°C to an OD₆₀₀ ranging from 0.4 to 0.5. Each mutant strain was tested along with the wild-type counterpart, where both were spotted into the agar using 6 μ L of bacterial culture on the same swimming plate. The plates were incubated at 30°C for 16 to 17 h, except for mutant *typA*, whose swimming plate was incubated at 37°C for 10 to 11 h (this mutant showed a reduced growth rate at 30°C compared to 37°C; data not shown) and *typA*, also known as *bipA*, has been shown to be involved in growth at low temperature [40–43]. Following incubation, outward migration diameters for each mutant were measured and compared to that of the respective wild-type counterpart found on the same plate, in order to identify mutants exhibiting a swimming defect. Motility levels of mutants are expressed as the percentage obtained by dividing the mutant swimming diameter by that of the wild-type (Table 1). Results represent the mean ± SEM of at least three independent experimental replicates and Student's two-tailed *t*-test was used for statistical analysis.

Sensitivity of mutant strains to hydrogen peroxide

Sensitivity to hydrogen peroxide (H₂O₂) was evaluated by an agar overlay diffusion method as previously described [44], with some modifications. Mutant and wild-type strains were grown overnight statically in LB at 37°C to an OD₆₀₀ ranging from 0.5 to 0.6. For each strain, 100 μ L of bacterial culture were mixed to

Table 1. Summary of *S. Typhi* deletion mutants.

ORF(s) (gene name) ^a	Description	Fold-change ^b	Uptake/Survival defects observed in macrophages			Motility level (%) ^e	H ₂ O ₂ sensitivity (mm) ^f
			<i>S. Typhi</i> ^c (typhoid patients) ^d	Other <i>Salmonella</i> serovars			
Cell envelope							
STY0520 (<i>acrA</i>)	Acriflavine resistance protein	-4.13	uptake/survival (AcrA)	uptake [63]	-	-	
STY2167 (<i>fliC</i>)	flagellin	-2.72	uptake/survival	uptake [97]	20 (±0.7) ^g	-	
STY2632 (<i>pgtE</i>)	outer membrane protease E	-3.20	uptake	survival [98]	-	-	
STY4071-73 (<i>waaQGP</i>)	LPS core biosynthesis proteins	-3.25	uptake/survival	survival [92,93]	62 (±11.9) ^g	3 (±0.6)	
STY2303-04 (<i>rfbIC</i>)	O-Ag biosynthesis	-2.87/-3.48	survival	ND ^h	70 (±5.7) ^g	-	
STY0024-34 (<i>bcfABCDEF</i>)	fimbrial structure	-2.12	uptake (BcfD)	ND	-	1.3 (±0.3) ^g	
STY1176-82 (<i>csgGFEDBAC</i>)	fimbrial structure	-4.74	uptake (CsgEFG)	ND	-	-	
STY0369-73 (<i>stbABCDE</i>)	fimbrial structure	-3.69	uptake (StbD)	ND	-	-	
STY2378-81 (<i>stcABCD</i>)	fimbrial structure	-2.85	survival	ND	-	2 (±1.0)	
STY0041	putative exported protein	-5.75	survival	ND	-	-	
STY1358-67 ⁱ (64)	genetic island	-3.47	ND (STY1364)	ND	-	2.5 (±0.5) ^g	
STY1867-1868	putative proteins	-5.46/-4.14	uptake/survival	ND	-	1.5 (±0.5)	
Pathogenesis							
STY2753-63a (<i>sinH</i>)	pathogenicity island (CS54)	-2.32	uptake (ShdA ¹)	ND	-	-	
STY1878 (<i>pagC</i>)	outer membrane invasion protein	-2.23	uptake/survival (PagC)	survival [6]	-	-	
STY3004 (<i>sipF</i>)	acyl carrier protein (SPI-1)	-5.00	uptake/survival	ND	-	-	
STY4452-60 (<i>siiABCDEF</i>)	T1SS and adhesin (SPI-4)	-3.55/-3.43/ -2.35	uptake/survival	ND	-	2 (±0.0) ^g	
STY467 ^g	putative membrane protein (SPI-7)	-3.33	uptake	ND	84 (±2.6)	-	
ⁱ STY4842-43	putative regulatory proteins (SPI-10)	-3.74	uptake/survival	ND	-	2.5 (±0.5)	
Regulatory functions							
STY2133-34 (<i>flhCD</i>)	flagellar master regulators	-3.22	uptake/survival	ND	21 (±0.9) ^g	-	
STY3641 (<i>gppA</i>)	guanosine pentaphosphatase	-4.16	uptake/survival	ND	-	2 (±0.6) ^g	
STY1576 (<i>mlc</i>)	putative regulatory protein	-2.25	survival	ND	-	3 (±0.0) ^g	
STY3871 (<i>typA</i>)	GTP-binding protein	-2.94	uptake/survival	ND	76 (±4.5) ^{g, k}	2 (±0.0)	
Transport and binding proteins							
STY3331-32 (<i>exbDB</i>)	biopolymer transport proteins	-6.04/-3.53	uptake/survival	ND	-	1.5 (±0.9)	
STY1649 (<i>ompN</i>)	outer membrane protein N	-3.87	survival	ND	-	-	
Unknown function							
STY0016	hypothetical protein	-3.13	ND	ND	-	-	
STY1398	hypothetical protein	-3.84	survival	ND	-	1.5 (±0.5)	
STY1869	hypothetical protein	-2.10	uptake/survival	ND	-	-	

Table 1. Cont.

ORF(s) (gene name) ^a	Description	Fold-change ^b	Uptake/Survival defects observed in macrophages			H ₂ O ₂ sensitivity (mm) ^f
			<i>S. Typhi</i> ^c (typhoid patients) ^d	Other <i>Salmonella</i> serovars	Motility level (%) ^e	
<i>STY2346</i>	hypothetical protein	-4.47	uptake	ND	-	2 (±1.0)

^aLoci which have been inactivated in each of the 28 markerless deletion mutants created for this study are listed. Numbers or characters in bold among a gene cluster represent ORF(s) or genes selected following initial screening through macrophages.

^bLog₂ of output/input values for genes identified following screening of mutant pool through macrophages. For gene clusters, the fold-changes are associated to selected genes (bold) among the cluster.

^cPhenotypes have been deduced from results of competitive assays in combination with those from individual infections performed in this study using *S. Typhi* deletion mutants, the wild-type strain, and the nalidixic acid-resistant wild-type strain (DEF566).

^dGene or ORF products which are among *S. Typhi* antigens detected in blood of typhoid fever patients according to previous studies [56–58].

^ePercentages represent mutant swimming diameter in mm divided by that of the wild-type, thus indicating the level of motility remaining for the mutants in comparison to the wild-type. Results represent the mean ± standard error of the mean (SEM) of at least three independent experimental replicates and Student's two-tailed *t*-test was used for statistical analysis.

^fValues were obtained by subtracting mutant inhibition diameter in mm by that of the wild-type. Results represent the mean ± SEM of at least two independent experimental replicates and Student's two-tailed *t*-test was used for statistical analysis.

^gResults for mutant are significantly different from those of the wild-type ($P < 0.05$).

^hND, no defects during interaction with macrophages are reported in previously published literature on *Salmonella* serovars other than Typhi.

ⁱPseudogene in *S. Typhi* strains CT18 [66] and Ty2 [99].

^jUnique to *S. Typhi* compared to *S. Typhimurium* [66].

^kMotility assay was done at 37°C for Δ *typA*, instead of 30°C used for other mutants, since this mutant exhibited reduced *in vitro* growth at 30°C (data not shown).

doi:10.1371/journal.pone.0036643.t001

3 ml of molten top agar (0.5% agar). The mix was then poured evenly over an LB plate (1.5% agar) and let to dry at room temperature until the top agar had completely solidified. One filter paper disc (6 mm diameter; Becton Dickinson) was then placed at the center of the solidified overlay, and 10 μ L of 29.9% H₂O₂ (Sigma) were spotted onto the disc. Plates were incubated overnight at 37°C, and following growth, the diameters of inhibition zones of the mutants were measured and compared to that of the wild-type counterpart. H₂O₂ sensitivity of mutants was defined as the difference in mm between the mutant inhibition zone and that of the wild-type (Table 1). Results represent the mean ± SEM of at least two independent experimental replicates and Student's two-tailed *t*-test was used for statistical analysis.

Results

Genome-wide mutagenesis of *S. Typhi*

In order to identify *S. Typhi* genes involved in interaction with human macrophages, a library of transposon insertion mutants was constructed by conjugative transfer of the mini-Tn10-T7 transposon into the *S. Typhi* wild-type strain ISP1820 [45]. A library of approximately 10⁵ mutants was generated. Southern blot analysis of some of the transposon mutants was used to verify and to confirm that the mutagenesis resulted in single random insertions (data not shown). Moreover, 3859 out of 4452 *S. Typhi* genes printed on the microarray were detected in the input library (data not shown).

Competitive selection of transposon mutant library in macrophages

The transposon mutant library was subjected to three rounds of competitive serial passages through human cultured THP-1 macrophages. Bacterial genomic DNA from output pools following passages through cells and from the unpassed input pool was extracted. From these, probes corresponding to DNA adjacent to the transposon were synthesized and labelled for microarray hybridization, in order to target *S. Typhi* genes selected following competitive passages through macrophages. 130 genes were

identified as potentially involved due to negative selection of transposon mutants (Table S3), by using a four-fold change threshold (input:output ratio of 4:1, $\log_2 \left[\frac{\text{output}}{\text{input}} \right] \leq -2$) and a P -value < 0.0005. Among these selected genes, we found many for biogenesis of lipopolysaccharides (LPS), fimbriae and flagella, as well as virulence genes (Table S3). Additionally, many of these selected genes are part of SPIs-1, -2, -4, -5, -6, -7, -10, -11, -12, -13, and -16 from *S. Typhi*. The 130 genes, corresponding to mutants underrepresented during the competitive screening assay, were grouped into functional classes based mainly on the Sanger Institute classification (<http://www.sanger.ac.uk>) (Figure 1). The most highly represented classes were *Cell envelope* (24%), *Unknown function* (18%), *Pathogenesis* (15%), and *Transport and binding proteins* (12%). Only 10 of these 130 genes were previously selected as less fit during repeated passages of an *S. Typhi* mutant library in rich media (*btuC*, *gpmA*, *kdgA*, *mlc*, *prc*, *proC*, *rplS*, *ycdC*, *waaG*, and *ybiS*) (Table S3) [46].

In vitro characterization of markerless deletion mutants

A total of 28 isogenic markerless deletion mutants were generated in *S. Typhi* strain ISP1820 (Table 1), chosen from the top functional classes of genes (Figure 1). The deletions were gene-specific and nonpolar or sometimes targeted a gene cluster, such as a complete operon (or putative operon) or a portion of it. Clusters include *exbDB*, *waaQGP*, *rfbIC*, the *bef*, *csq*, *stb*, and *stc* fimbrial operons, *STY1358-67*, *STY1867-1868*, the CS54 pathogenicity island, SPI-4, *STY4842-4843* from SPI-10, and *flhCD*. Each of these clusters includes at least one of the selected genes (bold) (Table S3). We first determined if gene inactivation of our mutants affected growth *in vitro*. All deletion mutants had growth curves in LB broth similar to that of the wild-type strain, except mutants *waaQGP* and *mlc* which had a slight defect (data not shown). Growth deficiency for these mutants has been previously observed [47,48]. None of the mutants demonstrated auxotrophy when grown in M63-glucose minimal medium (data not shown). Resistance to the detergent DOC, as used in the infection assays, was also verified for all of the mutants. Only mutant *acrA* failed to

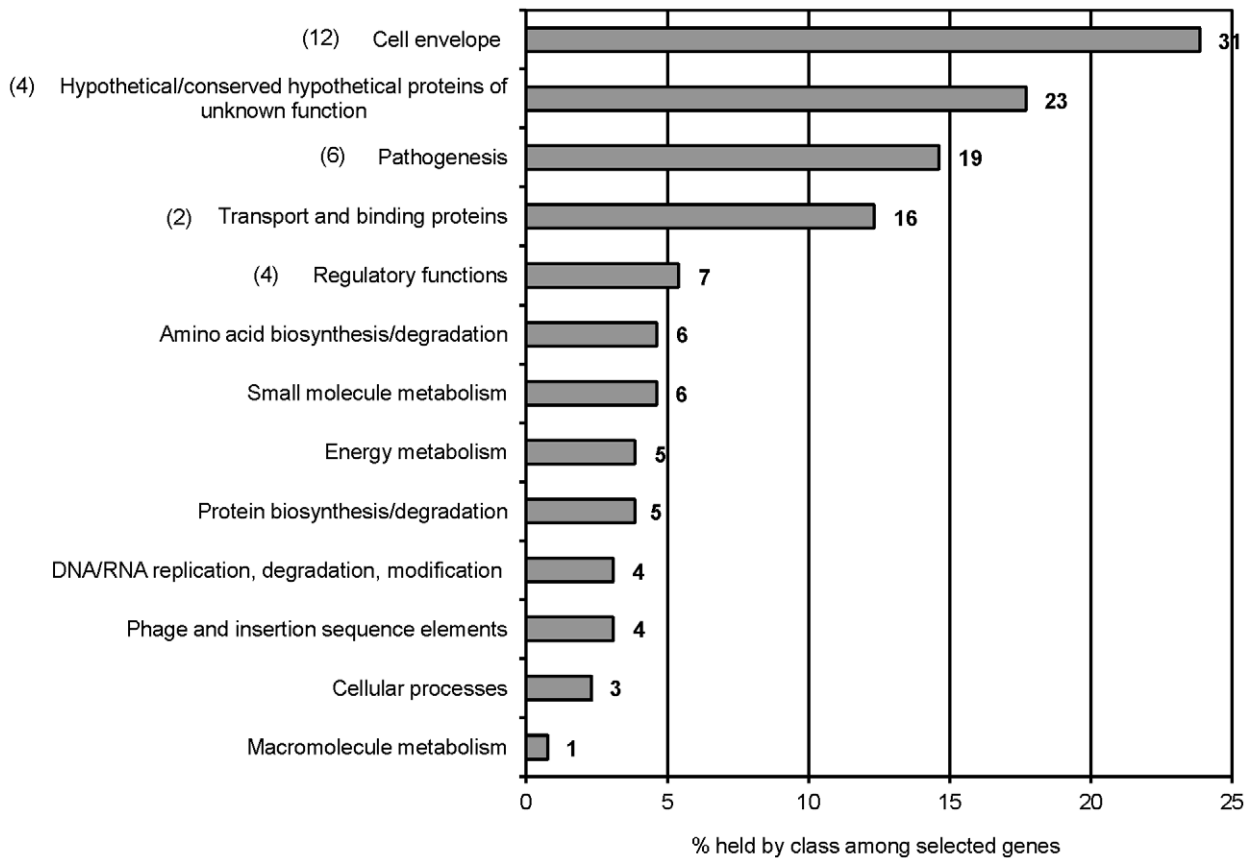


Figure 1. Functional classification of 130 *S. Typhi* genes identified following competitive selection in macrophages. Functional classes are indicated on the left and the number of genes within a class is indicated in bold on the right of each bar. The number of mutants created among each class is shown in parentheses on the left of each class.
doi:10.1371/journal.pone.0036643.g001

grow overnight in RPMI containing 0.1% DOC and showed approximately 10% mortality over 2 h in PBS with 0.1% DOC. Motility is a property that has been previously associated with *S. Typhi* virulence towards eukaryotic cells [49], thus the abilities of the mutants to swim in soft agar was evaluated. Mutants *fliC*, *waaQGP*, *rflbIC*, *flhCD*, and *typA* swam significantly less in LB 0.3% agar plates than the wild-type strain ($P < 0.05$), and mutant *STY4679* also exhibited a swimming defect that was not significant ($P = 0.226$) (Table 1). The motility defect was expected for mutants *flhCD* and *fliC*, as they represent the master regulators and main structural subunit of the flagellar system, respectively [50]. Mutation of *waaG* (*rfaG*) was previously shown to affect swimming motility in *E. coli*, *S. Typhimurium* and *S. Typhi* [47,51,52]. Phagocytic cells are able to produce reactive oxygen species, such as H_2O_2 , as part of defense mechanisms against invading microorganisms [53]. Hence, we investigated sensitivity of the mutants when exposed to oxidative stress mediated by H_2O_2 . Mutants *waaQGP*, *bef*, *stc*, *STY1358-67*, *STY1867-68*, *SPI-4*, *STY4842-43*, *gppA*, *mlc*, *typA*, *exbDB*, *STY1398*, and *STY2346* showed a slightly higher sensitivity relatively to the wild-type strain. These higher sensitivities were significant for mutants *bef*, *STY1358-67*, *SPI-4*, *gppA*, and *mlc* ($P < 0.05$) (Table 1).

Interaction of deletion mutants with macrophages during competitive assay

During the initial screening through macrophages, transposon mutants from the library were competing against each other while entering into and replicating inside the cells. Hence, the deletion mutants were tested using a competitive assay, where a NaI^+ isogenic *S. Typhi* strain (DEF566) was used as the wild-type counterpart. CI values of mutants upon uptake (0 h) and during survival (24 h post-infection) were obtained. Nine mutants had a significantly lower CI upon uptake by macrophages (*pgtE*, *bef*, *csg*, *stb*, *STY1867-68*, CS54, *STY4679*, *STY4842-43*, and *STY2346*), and eight mutants were significantly less competitive during intramacrophage survival (*ompN*, *rflbIC*, *stc*, *STY0041*, *pagC*, *gppA*, *mlc*, and *STY1398*) ($P < 0.05$) (Figure 2). Furthermore, nine mutants were significantly outcompeted by the wild-type for both uptake and survival within macrophages (*acrA*, *exbDB*, *fliC*, *waaQGP*, *sipF*, *SPI-4*, *flhCD*, *typA*, and *STY1869*) ($P < 0.05$) (Figure 2).

Mutants highly defective during interaction with macrophages, such as *fliC*, *waaQGP*, and *flhCD*, and those representing genes of unknown function, such as *STY1398*, *STY1869*, and *STY2346*, were complemented by a wild-type copy of the gene(s). These strains were used for competitive infection of macrophages with their corresponding mutants. The competition between the

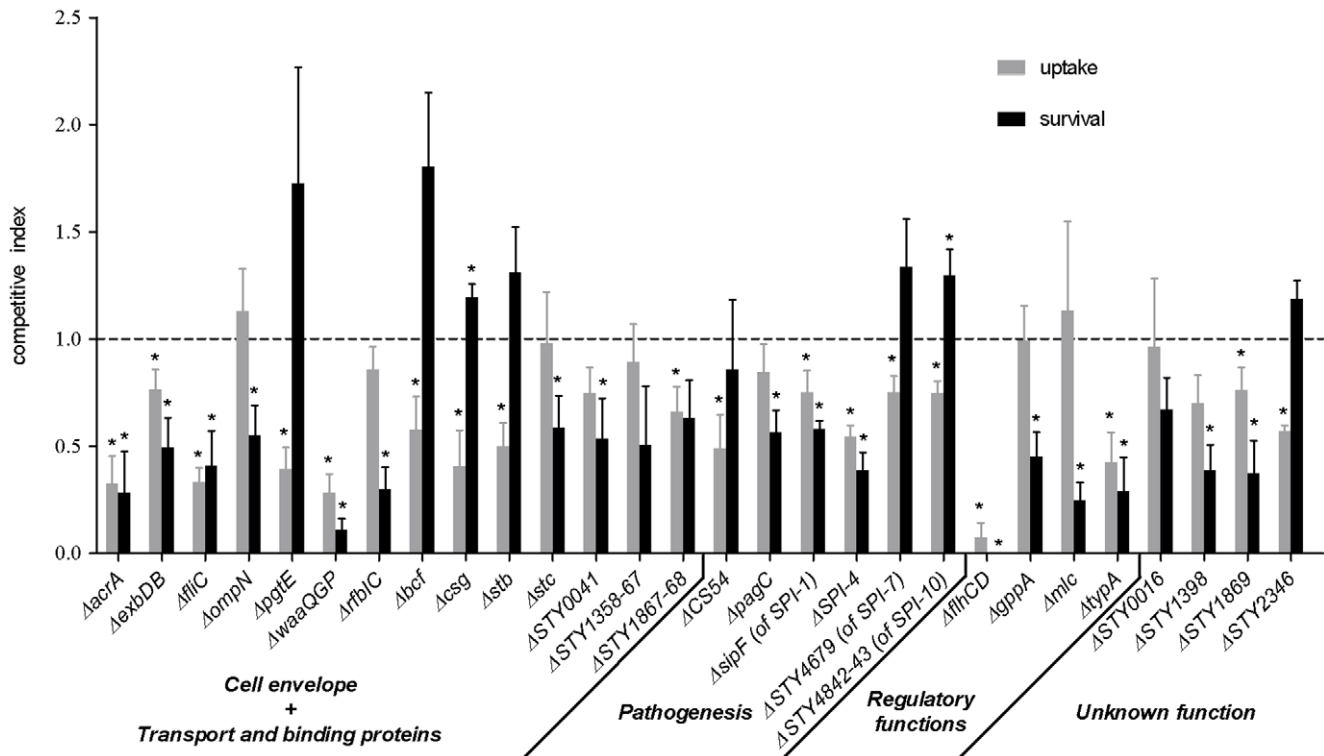


Figure 2. Uptake and intracellular survival of mutants within macrophages during the mixed infection assay. Competitive index (CI) assays for uptake (0 h) and intracellular survival (24 h post-infection) against the nalidixic acid-resistant wild-type *S. Typhi* (DEF566) were performed for all 28 isogenic mutants during infection of cultured THP-1 human macrophages. Functional classes are indicated below the gene names. Data presented are the mean \pm standard error of the mean of at least three independent experiments performed in duplicate. Asterisks (*) represent CI values for mutants which are significantly different from 1 ($P < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0036643.g002

complemented strains and their mutants reproduced the phenotypes observed against the wild-type strain (Table 2). Complemented strains outcompeted their mutant counterparts at the uptake and survival stages, except for *waaQGP* at uptake (CI = 1.04) and *STY1398* during intracellular survival (CI = 1.19).

Interaction of deletion mutants with macrophages tested individually

The deletion mutants were individually assessed for their ability to infect macrophages. Hence, the rates of uptake and intracellular survival within human macrophages were determined for all the *S. Typhi* mutants, and compared with those of the isogenic wild-type strain, tested in parallel. Six mutants showed significantly lower

Table 2. Effect of plasmid-borne gene complementation on *S. Typhi* deletion mutants during competitive assays within macrophages.

ORF(s) (gene name)	CI ^a value for uptake		CI value for survival	
	vs wild-type ^b	vs complemented mutant ^c	vs wild-type	vs complemented mutant
<i>STY2167 (fliC)</i>	0.33 (± 0.07) * ^d	0.42 (± 0.09) *	0.41 (± 0.16) *	0.10 (± 0.07) *
<i>STY4071-73 (waaQGP)</i>	0.28 (± 0.09) *	1.04 (± 0.14)	0.11 (± 0.06) *	0.19 (± 0.10) *
<i>STY2133-34 (flhCD)</i>	0.07 (± 0.07) *	0.16 (± 0.05) *	0.00 (± 0.00) *	0.07 (± 0.07) *
<i>STY1398</i>	0.70 (± 0.13)	0.97 (± 0.19)	0.39 (± 0.12) *	1.19 (± 0.13)
<i>STY1869</i>	0.76 (± 0.11) *	0.73 (± 0.03) *	0.37 (± 0.15) *	0.53 (± 0.10) *
<i>STY2346</i>	0.57 (± 0.03) *	0.67 (± 0.12) *	1.19 (± 0.09)	0.76 (± 0.12)

^aCI, competitive index.
^bThe wild-type counterpart is represented by the nalidixic acid-resistant wild-type *S. Typhi* (DEF566).
^cComplemented mutants all carry the low-copy-number cloning vector pWSK29 [36] harbouring the respective deleted gene or gene cluster.
^dData presented are the mean \pm standard error of the mean of at least three independent experiments performed in duplicate, where the deletion mutants were mixed either with the wild-type strain or the respective complemented mutant during infection of human macrophages. Asterisks (*) represent CI values for mutants which are significantly different from 1 ($P < 0.05$).
 doi:10.1371/journal.pone.0036643.t002

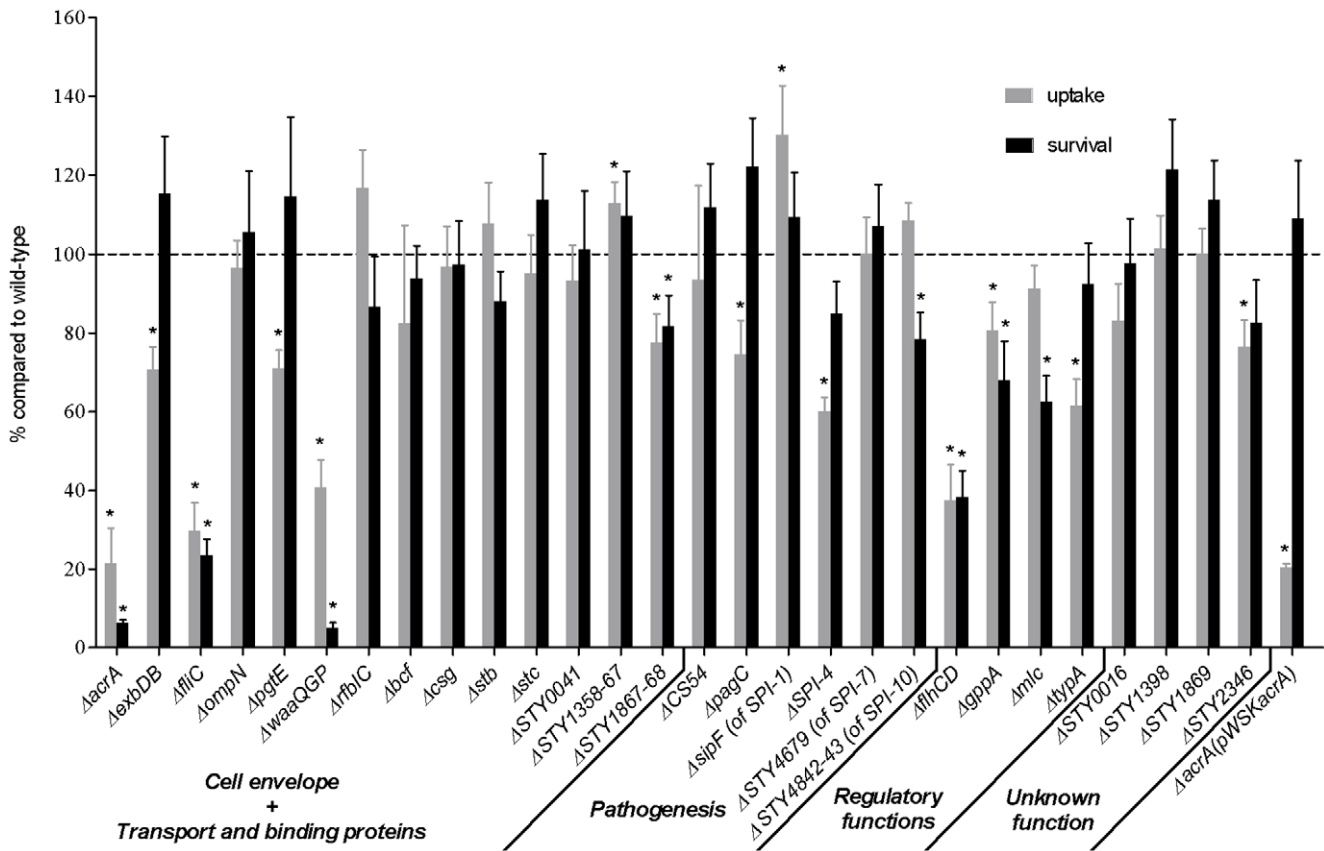


Figure 3. Uptake and intracellular survival rates of mutants tested individually in macrophages. THP-1 human macrophages were infected with *S. Typhi* wild-type strain ISP1820, all 28 isogenic mutants, and the complemented *ΔacrA(pWSKacrA)* strain. The number of intracellular bacteria was determined upon uptake (0 h) and during survival (24 h post-infection) within macrophages. Functional classes are indicated below the gene names. The values for percent recovery were normalized to the wild-type control value, defined as 100% at each time point. Data presented are the mean ± standard error of the mean of at least three independent experiments performed in duplicate. Asterisks (*) represent percentages for mutants which are significantly different from the isogenic wild-type ($P < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0036643.g003

uptake by macrophages (*exbDB*, *pgtE*, *pagC*, SPI-4, *typA*, and *STY2346*) and two mutants showed significantly lower intracellular survival (*STY4842-43* and *mlc*) ($P < 0.05$) (Figure 3). Moreover, six mutants had a global interaction defect towards macrophages, with significant attenuation phenotypes observed both upon uptake and during survival (*acrA*, *fliC*, *waaQGP*, *STY1867-68*, *flhCD*, and *gppA*) ($P < 0.05$) (Figure 3). The strongly attenuated mutant *acrA* was complemented with wild-type *acrA* (pWSK*acrA*). The significant survival defect within macrophages ($P < 0.05$) was reversed in this complemented strain, as intracellular growth from 0 to 24 h post-infection was equivalent to that of the wild-type strain (Figure 3), hence confirming that the growth defect observed for the mutant was due to inactivation of *acrA*.

Overall, infection results of deletion mutants revealed that several mutants had a significant defect only during the competition experiment, including eight mutants during uptake (*bcf*, *csg*, *stb*, CS54, *sipF*, *STY4679*, *STY4842-43*, and *STY1869*) and 11 mutants defective in survival (*exbDB*, *ompN*, *rfbIC*, *stc*, *STY0041*, *pagC*, *sipF*, SPI-4, *STY1398*, *typA*, and *STY1869*) ($P < 0.05$) (Figures 2 and 3). Interestingly, 12 mutants were significantly attenuated when subjected to both individual and competitive experiments, with 10 mutants in uptake (*acrA*, *exbDB*, *fliC*, *pgtE*, *waaQGP*, *STY1867-68*, SPI-4, *flhCD*, *typA*, and *STY2346*), and six mutants in survival (*acrA*, *fliC*, *waaQGP*, *flhCD*, *gppA* and *mlc*) ($P < 0.05$) (Figures 2 and 3).

Discussion

One of the key virulence features of *Salmonella* is its ability to survive inside macrophages, enabling the pathogen to systemically infect its animal [4] or human host [54]. To better understand how *S. Typhi* adapts to the macrophage environment, a comprehensive method was applied to screen for candidate genes used by *S. Typhi* during infection of human macrophages. Serial competitive passages of a transposon mutant library through macrophages led to the identification of 130 genes, belonging to 13 functional classes (Figure 1). Some of these genes were previously identified following screening of *S. Typhi* mutant pool within humanized mice (*STY0016*, *STY0039*, *STY2607*, *yddO* and *STY4458*) [55] and antibodies against some of their products (CdtB, AcrA, PagC, PflB, STY1364, members of the *bcf*, *csg*, *stb* fimbrial operons and of the CS54 island) were detected in blood from typhoid patients [56–58], suggesting the importance of these proteins during *S. Typhi* systemic infection of its human host.

Surprisingly, comparison of genes selected inside human macrophages with transcriptomic data obtained at 24 h post-infection [33] revealed that among the 130 genes identified, only 8% (10 genes) were also upregulated inside these cells. A lack of correlation between expression and a fitness role for genes inside macrophages was also observed with the human-adapted pathogen *Mycobacterium tuberculosis* [59]. This suggests that bacterial genes

involved in interaction with macrophages are not necessarily overexpressed at 24 h post-infection, but may be already expressed upon uptake or earlier during intracellular survival.

We constructed 28 isogenic markerless deletion mutants representing genes or gene clusters that belong to the five major functional classes (Figure 1). Competitive and individual infection assays were then conducted with these mutants to better determine involvement of genes during interaction with human macrophages. Using these assays, 35 defective phenotypes of either uptake or intracellular survival within macrophages were observed for the mutants (Table 1), all previously unassociated to the *Salmonella* genes studied here. 26 mutants were less competitive than the wild-type strain during either uptake into cells, intracellular survival or both of these processes (Figure 2), corroborating the selection of genes during the competitive screening strategy. Among these 26 mutants outcompeted by the wild-type strain during infection, six were resubmitted to competition experiments against their respective mutant bearing the plasmid-borne wild-type gene or gene cluster (Table 2). All mutant defects initially identified against the wild-type counterpart were maintained (Table 2), thus directly linking the genes complemented here to the attenuation phenotypes in intracellular survival observed during competition, with the exception of *STY1398*. The reasons explaining the failure to complement the *STY1398* mutant may result from plasmid loss or imbalance in gene copy-number. Moreover, when mutants were tested individually, a significant defect was observed in half of them (14 of 28 mutants) either upon uptake and/or during intracellular survival (Figure 3). Hence, the competitive assay was more sensitive than the individual infection assay in determining mutant impairment during bacterial infection of macrophages. Noticeable is that all the fimbrial mutants showed involvement only when under competition against the wild-type, either upon uptake (*bcf*, *csg*, *stb*) or during intracellular survival (*ste*) (Figure 2). In contrast, our results show a few examples of attenuation only when mutants were subjected to individual infection assay. This is possible if a mutant impaired when tested alone is rescued *in trans* by a product of the wild-type strain during the competitive assay, a phenomenon previously described in competition experiments [23,26]. This was observed for mutants *pagC* and *gfpA* upon entry in macrophages and mutants *STY1867-68* and *STY4842-43* during intracellular survival (Figures 2 and 3). For example, the PagC protein is important for induction of membrane vesicles released by *S. Typhimurium* in the extracellular environment [60]. This suggests that presence of vesicles produced by the wild-type strain in the surroundings of the *pagC* mutant could overcome its inability to secrete vesicle-associated virulence factors participating in macrophage infection. Only mutants *STY0016* and *STY1358-67* showed no significant attenuation when tested in competition or individually. However, phenotypes of impairment upon uptake or during intracellular survival may possibly be revealed only following multiple serial passages through macrophage infection assays, similar to the initial screening.

Among the deletion mutants, several defects of uptake and/or survival during infection of macrophages were observed for the first time in *Salmonella* (Table 1). For instance, mutation of *exbDB* in *S. Typhi* impaired both uptake and survival in macrophages (Figures 2 and 3). ExbD and ExbB interact with TonB, forming a complex transducing energy to outer membrane transporters. The *exbDB* mutant was probably affected in *tonB*-dependant substrate acquisition inside human macrophages, however the reason explaining the entrance defect remains unclear. The efflux pump component AcrA [61,62] promoted *S. Typhi* uptake, which is similar to that observed in *S. Typhimurium* [63], but was also

involved in survival up to 24 h post-infection inside human macrophages (Figures 2 and 3). Previous transcriptomic results have shown that inactivation of *acrA* in *S. Typhimurium* decreased expression of *phoP* [64], part of the two-component *phoPQ* system playing a key role in intracellular survival of *Salmonella* inside macrophages, thus explaining attenuation of the *S. Typhi* *acrA* mutant within macrophages observed here. Furthermore, an *S. Typhimurium* *acrA* mutant was affected in growth under anaerobic conditions after 24 h [64]. Hence, since the *Salmonella*-containing vacuole within infected cells is considered hypoxic [65], it can be postulated that inactivation of *acrA* in the *S. Typhi* mutant is in fact impairing the ability of the bacteria to replicate under such anaerobic conditions. However, it is less clear why the mutant is defective in uptake inside macrophages, although it has been proposed that lack of *acrA* creates membrane instability, which may confer poor entrance inside eukaryotic cells [64]. Although the *acrA* mutant was less resistant to 0.1% DOC in PBS over 2 h (10% mortality), bacteria were exposed to this compound for a much shorter time period following macrophage cell lysis when conducting infection assays. Moreover, the mortality rate of the mutant during intracellular survival in macrophages was much higher (approximately 80% mortality), hence its defect within macrophages was not attributable to a strong survival defect in DOC. Another explanation may be that membrane instability renders the *acrA* mutant more sensitive to antimicrobial peptides of the macrophage. As observed, the attenuated survival phenotype of the mutant was complemented by a plasmid-borne wild-type copy of the gene (Figure 3). Mutants with transposons in ORFs *STY1867*, *STY1868*, and *STY1869* were selected during screening (Table S3). *STY1867* and *STY1868* are roughly 150 bp apart in the *S. Typhi* genome and perhaps part of an operon, whereas *STY1869* is divergently transcribed [66]. *STY1867* encodes for a putative lipoprotein [66] that could be mediating attachment of *S. Typhi* to macrophage surfaces, since uptake of mutant *STY1867-68* was affected (Figures 2 and 3). *STY1868*, annotated as a putative cytochrome [66], is predicted to be an inner membrane protein [67]. Both *STY1868* and *STY1869* are of unknown function [66]. However, the *S. Typhimurium* homologue of *STY1868* (*STM1253*) is induced by the PmrA/PmrB two-component system involved in resistance to antimicrobial peptides [68,69], and along with the *STY1869* homologue (*STM1252*), both ORFs are induced by the PreA/PreB two-component system, which itself regulates PmrA/PmrB and promotes invasion of human epithelial cells by *S. Typhimurium* [70,71]. Sequence comparison of these homologous ORFs revealed a high degree of conservation between promoter regions of both serovars. Hence, it can be speculated that ORFs *STY1868* and *STY1869* from *S. Typhi* are regulated similarly to those of *S. Typhimurium*. However, an *STM1253* mutant showed no virulence defect in the mouse [68]. In *S. Typhi*, these ORFs may be mediating uptake and survival inside macrophages as part of the PreA/PreB regulon. The intramacrophage survival impairment of mutant *STY1867-68* could only be observed when tested individually and not when submitted to the competitive assay (Figures 2 and 3). Thus, this suggests that the products of *STY1867-68* in the wild-type are able to largely alleviate defects in these genes, *in trans*.

Many of the underrepresented genes were located on SPIs. SPI-1 encodes a T3SS involved in invasion of non-phagocytic epithelial cells [72,73]. However, SPI-1 transposon mutants *hilC*, *prgI*, *sipC*, *sipF*, *spaS*, and *ygbA* were underrepresented after passages in macrophages (Table S3). Deletion of *sipF* (*iacP*) in *S. Typhi* impaired uptake and survival within macrophages (Figure 2). The *iacP* gene has been previously associated with invasiveness of chicks by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) [74] and

with invasion of epithelial cells by *S. Typhimurium* [75], phenotypes in conformity with the recognized operating functions of SPI-1. *iacP* was also associated with virulence of *S. Typhimurium* during infection of the mouse [25,75]. Additionally, several genes from SPI-1 in *S. Typhi* were detected as virulence determinants when a transposon mutant pool was screened within a humanized mouse model [55]. Together, our results suggest that SPI-1 genes could represent *S. Typhi* virulence factors participating in optimal infection of human macrophages. SPI-2 encodes a T3SS involved in intracellular survival and systemic disease of *S. Typhimurium*. Genes *ssaN*, *ssaP*, *ssaQ*, and *orf408* from SPI-2 were identified during our screening (Table S3). However, a *ssaP* mutant replicates as much as the wild-type in human macrophages (data not shown), which correlates with previous data where complete deletion of SPI-2 T3SS was not involved in intracellular survival of *S. Typhi* in human macrophages [8]. We noticed that input values from these SPI-2 genes were higher than the average input intensity and that their output values were similar to the average output intensity while remaining higher than those of the other underrepresented genes (data not shown). SPI-4 encodes a T1SS for a non-fimbrial adhesin, that promotes adhesion to epithelial cells [76]. Since many SPI-4 genes were detected during initial screening (Table S3), the entire SPI-4 region was deleted and when tested, the mutant showed impaired uptake (Figures 2 and 3) and survival within macrophages (Figure 2). SPI-4 was initially thought to contribute to *S. Typhimurium* survival within mouse macrophages as indicated by screening of a transposon mutant bank [4,77], but further research found no such involvement [76,78,79]. Interestingly, the transposon mutant of SPI-4 gene *STY4458* was underrepresented following competitive passage of an *S. Typhi* mutant pool in a humanized mouse infection model, and in our screening (Table S3) [55]. Hence, our results reiterate a potential intracellular role played by SPI-4, shown here specifically with serovar Typhi inside macrophages, but also identifies a role concerning uptake inside these cells (Figures 2 and 3). SPI-7 and -10 are both unique to *S. Typhi* when compared to *S. Typhimurium* [15]. Mutant *STY4679*, from SPI-7, and *STY4842-43*, from SPI-10, showed defects in uptake when under competition with the wild-type (Figure 2). Furthermore, the SPI-10 mutant was also attenuated during intramacrophage survival when tested individually (Figure 3).

Of genes with regulatory functions identified during screening (Figure 1 and Table S3), we tested mutants representing *flhCD*, *mlc*, *typA* and also *gppA* (for which the transposon mutant was strongly underrepresented ($\log_2 \frac{\text{output}}{\text{input}} = -4.16$), although not significantly (P -value of 0.008). All these mutants showed defective phenotypes during infection assays with human macrophages that were described here for the first time (Table 1). Among other selected regulators (Table S3), the LysR-family regulator *ybdO* was detected and previously identified during screening of *S. Typhimurium* mutants underrepresented in murine macrophages [24] and in a mouse model of infection [25]. The deletion of *typA* affects uptake as well as intracellular survival (Figures 2 and 3). TypA (or BipA) is a translational GTPase [80] that regulates virulence mechanisms in *E. coli* [81,82]. It is involved in flagella-associated motility and growth below 30°C [41,42] and we have observed similar phenotypes in *S. Typhi* (Table 1; data not shown). It also mediates resistance to certain antimicrobial peptides in *S. Typhimurium* and *E. coli* [81,83] and was detected as a gene potentially involved in virulence of *S. Typhimurium* within a mouse model of infection [26]. Our work attributes a novel role to this regulatory element, linked for the first time to macrophage infection. Nonetheless, its precise functions concerning *Salmonella*

virulence remain unclear, as more work is required to gain insight on its controlled regulon. The GppA enzyme hydrolyzes guanosine pentaphosphate (pppGpp) to guanosine tetraphosphate (ppGpp) rapidly *in vivo* [84,85]. These are the two signal molecules mediating the stringent response [86]. Defective (p)ppGpp production causes impaired invasion and intracellular growth of *S. Typhimurium* in mouse macrophages [87,88], and diminishes invasion and intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum in murine and avian macrophages [89]. Thus, we propose that the stringent response, in which *gppA* takes part, is also required for full virulence of *S. Typhi*, and our novel results imply that GppA is involved in interaction of *Salmonella* with macrophages, since the mutant was attenuated both for uptake and intramacrophage survival (Figures 2 and 3).

In addition to genes with novel roles within macrophages described above, we have also confirmed defective phenotypes for mutations of genes that have been previously identified in other *Salmonella* serovars, such as those associated with LPS and flagella biosynthesis. For example, *waaG* is involved in linking the outer core to the inner core of LPS [90,91], and when the *waaQGP* cluster was inactivated, uptake by human macrophages was lower compared to the wild-type strain (Figure 3), whereas a *waaG* (*yfaG*) mutant in *S. Typhimurium* shows higher uptake in murine macrophages [92,93]. However, intracellular survival in macrophages of these mutants is lower for both serovars (Figure 3) [92,93]. It is noteworthy that the *rfbIC* mutant, encoding genes involved in O-Ag biosynthesis [94], was outcompeted by the wild-type strain 24 h post-infection (Figure 2). This result corroborates the previously shown potential involvement of *rfbI* from *S. Enteritidis* during interaction with chicken macrophages, observed by screening of a mutant library [95]. Involvement of surface LPS during *S. Typhi* infection of human macrophages was further demonstrated by identification of outer core biosynthesis genes *waaI* and *waaK*, and the O-Ag ligase gene *waaL* (Table S3). A *waaL* mutant in *S. Typhimurium* is affected in intracellular growth inside murine macrophages [92,93]. Thus, with the exception that the outer core seems to differentially influence entry into macrophages of serovars Typhi and Typhimurium, the survival phenotypes observed here concerning our LPS-associated mutants in *S. Typhi* are similar to those previously observed with other *Salmonella* serovars.

Strong attenuation was observed for flagellar mutants *flhCD* and *fliC* during macrophage infection (Figures 2 and 3). In *S. Typhimurium*, a higher replication of *flhD* and *fliB fliC* mutants within mouse macrophages was observed [96]. In *S. Enteritidis*, a *fliC* mutant was deficient in entry into porcine blood monocytes, similar to *S. Typhi* results in human macrophages (Figure 3) [97]. *fliG* and *fliD* were also identified during our screening (Table S3). The *fliD* locus in *S. Typhimurium* [4,77] and *fliG*, *fliD*, *fliC* and *fliH* in *S. Enteritidis* [95] were identified upon passages of mutant libraries within macrophages. Nonetheless, our study has highlighted for the first time involvement of flagellar genes during intracellular survival of serovar Typhi within human macrophages.

In conclusion, screening of a *S. Typhi* transposon mutant library through cultured human macrophages for 24 h selected mutants with less fitness in these cells and revealed 130 genes potentially involved in interaction with macrophages. Among the defined deletion mutants representing selected genes, a great majority were significantly defective for uptake and/or intracellular survival inside macrophages during competitive and individual infection assays. Many of these were genes not previously known to contribute to entry and to intracellular survival of serovar Typhi within human macrophages, including cell envelope components, SPI-encoded features, regulatory elements and many ORFs of unknown function (Table 1). Furthermore, as attenuation of *S.*

Typhi replication inside macrophages has been associated with avirulence within human beings [54], S. Typhi genes involved in infection of human macrophages represent potential targets for improvement or development of typhoid fever therapies.

Supporting Information

Table S1 Bacterial strains and plasmids used in this study.

(PDF)

Table S2 Primers used in this study.

(PDF)

Table S3 List of S. Typhi genes identified following negative selection of mutant pool in human macrophages.

(PDF)

References

- Crump JA, Luby SP, Mintz ED (2004) The global burden of typhoid fever. Bull World Health Organ 82: 346–353.
- Parry CM, Threlfall EJ (2008) Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. Curr Opin Infect Dis 21: 531–538.
- Guzman CA, Borsutzky S, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Pearman J, et al. (2006) Vaccines against typhoid fever. Vaccine 24: 3804–3811.
- Fields P, Swanson R, Haidaris C, Heffron F (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc Natl Acad Sci U S A 83: 5189–5193.
- Groisman E, Chiao E, Lipps C, Heffron F (1989) *Salmonella typhimurium phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 7077–7081.
- Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ (1989) A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 5054–5058.
- Garvis S, Beuzón C, Holden D (2001) A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages. Cell Microbiol 3: 731–744.
- Forest CG, Ferraro E, Sabbagh SC, Daigle F (2010) Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2. Microbiology 156: 3689–3698.
- Shea J, Hensel M, Gleeson C, Holden D (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 2593–2597.
- Cirillo DM, Valdivia RH, Monack DM, Falkow S (1998) Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. Mol Microbiol 30: 175–188.
- Hensel M, Shea J, Waterman S, Mundy R, Nikolaus T, et al. (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. Mol Microbiol 30: 163–174.
- Ochman H, Soncini F, Solomon F, Groisman E (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 7800–7804.
- Shea J, Beuzon C, Gleeson C, Mundy R, Holden D (1999) Influence of the *Salmonella typhimurium* pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. Infect Immun 67: 213–219.
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, et al. (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature 413: 852–856.
- Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc JM, Daigle F (2010) So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. FEMS Microbiol Lett 305: 1–13.
- DiPetrillo M, Tibbetts T, Kleanthous H, Killeen K, Hohmann E (1999) Safety and immunogenicity of *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. Vaccine 18: 449–459.
- Angelakopoulos H, Hohmann E (2000) Pilot study of *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. Infect Immun 68: 2135–2141.
- Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J, Bentley M, Johnson J, et al. (2002) Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. Infect Immun 70: 3457–3467.
- Hone D, Attridge S, Forrest B, Morona R, Daniels D, et al. (1988) A *galE* via (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. Infect Immun 56: 1326–1333.
- Tacket C, Hone D, Curtiss R, III, Kelly S, Losonsky G, et al. (1992) Comparison of the safety and immunogenicity of delta *aroC* delta *aroD* and delta *cya* delta *crp* *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. Infect Immun 60: 536–541.
- Tacket C, Hone D, Losonsky G, Guers L, Edelman R, et al. (1992) Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 *Salmonella typhi* vaccine strain. Vaccine 10: 443–446.
- Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, et al. (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science 269: 400–403.
- Santiviago CA, Reynolds MM, Porwollik S, Choi SH, Long F, et al. (2009) Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. PLoS Pathog 5: e1000477.
- Chan K, Kim CC, Falkow S (2005) Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. Infect Immun 73: 5438–5449.
- Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR, et al. (2006) Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. PLoS Pathog 2: e11.
- Chaudhuri RR, Peters SE, Pleasance SJ, Northen H, Willers C, et al. (2009) Comprehensive identification of *Salmonella enterica* serovar typhimurium genes required for infection of BALB/c mice. PLoS Pathog 5: e1000529.
- O’Callaghan D, Charbit A (1990) High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. Mol Gen Genet 223: 156–158.
- Herrero M, de Lorenzo V, Timmis K (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J Bacteriol 172: 6557–6567.
- Kaniga K, Compton M, Curtiss R, III, Sundaram P (1998) Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. Infect Immun 66: 5599–5606.
- Faucher SP, Forest C, Beland M, Daigle F (2009) A novel PhoP-regulated locus encoding the cytolysin ClyA and the secreted invasin TaiA of *Salmonella enterica* serovar Typhi is involved in virulence. Microbiology 155: 477–488.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 3 v p.
- Porwollik S, Frye J, Florea L, Blackmer F, McClelland M (2003) A non-redundant microarray of genes for two related bacteria. Nucleic Acids Res 31: 1869–1876.
- Faucher S, Porwollik S, Dozois C, McClelland M, Daigle F (2006) Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 1906–1911.
- Xia XQ, McClelland M, Porwollik S, Song W, Cong X, et al. (2009) WebArrayDB: cross-platform microarray data analysis and public data repository. Bioinformatics 25: 2425–2429.
- Basso H, Rharbaoui F, Staendner LH, Medina E, Garcia-Del Portillo F, et al. (2002) Characterization of a novel intracellularly activated gene from *Salmonella enterica* serovar typhi. Infect Immun 70: 5404–5411.
- Wang RF, Kushner SR (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. Gene 100: 195–199.
- Abromaitis S, Faucher S, Beland M, Curtiss R, III, Daigle F (2005) The presence of the *tet* gene from cloning vectors impairs *Salmonella* survival in macrophages. FEMS Microbiol Lett 242: 305–312.
- Segura I, Casadesús J, Ramos-Morales F (2004) Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. J Microbiol Methods 56: 83–91.
- Toguchi A, Siano M, Burkart M, Harshey RM (2000) Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. J Bacteriol 182: 6308–6321.
- Beckering CL, Steil L, Weber MH, Völker U, Marahiel MA (2002) Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 184: 6395–6402.

Acknowledgments

We would like to thank Nabil Arrach (University of California, Irvine) for his technical guidance concerning the negative selection strategy used in our study. We would also like to thank undergraduate students of the Daigle laboratory for their technical assistance, as well as Sébastien P. Faucher (McGill University, Montreal), Patrick C. Hallenbeck (University of Montreal, Montreal), and members of the Daigle laboratory for critical reading of this manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SCS MM FD. Performed the experiments: SCS CL FD. Analyzed the data: SCS MM FD. Contributed reagents/materials/analysis tools: MM FD. Wrote the paper: SCS CL MM FD.

41. Grant AJ, Haigh R, Williams P, O'Connor CD (2001) An *in vitro* transposon system for highly regulated gene expression: construction of *Escherichia coli* strains with arabinose-dependent growth at low temperatures. *Gene* 280: 145–151.
42. Pfennig PL, Flower AM (2001) BipA is required for growth of *Escherichia coli* K12 at low temperature. *Mol Genet Genomics* 266: 313–317.
43. Reva ON, Weinel C, Weinel M, Böhm K, Stjepandic D, et al. (2006) Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* 188: 4079–4092.
44. Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P, Cellier MF (2002) Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 70: 6032–6042.
45. Hone DM, Harris AM, Chatfield S, Dougan G, Levine MM (1991) Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9: 810–816.
46. Langridge GC, Phan MD, Turner DJ, Perkins TT, Parts L, et al. (2009) Simultaneous assay of every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants. *Genome Research* 19: 2308–2316.
47. Kong Q, Yang J, Liu Q, Alamuri P, Roland KL, et al. (2011) Effect of deletion of genes involved in lipopolysaccharide core and O-antigen synthesis on virulence and immunogenicity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 79: 4227–4239.
48. Kimata K, Inada T, Tagami H, Aiba H (1998) A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the *ptsG* gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 29: 1509–1519.
49. Liu SL, Ezaki T, Miura H, Matsui K, Yabuuchi E (1988) Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infect Immun* 56: 1967–1973.
50. Macnab RM (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57: 77–100.
51. Girgis HS, Liu Y, Ryu WS, Tavazoie S (2007) A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet* 3: 1644–1660.
52. Hoare A, Bittner M, Carter J, Alvarez S, Zaldivar M, et al. (2006) The outer core lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for bacterial entry into epithelial cells. *Infect Immun* 74: 1555–1564.
53. Beaman L, Beaman BL (1984) The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annu Rev Microbiol* 38: 27–48.
54. Dragunsky EM, Rivera E, Hochstein HD, Levenbook IS (1990) *In vitro* characterization of *Salmonella typhi* mutant strains for live oral vaccines. *Vaccine* 8: 263–268.
55. Libby SJ, Brehm MA, Greiner DL, Shultz LD, McClelland M, et al. (2010) Humanized nonobese diabetic-*scid* *IL2γ^{mut}* mice are susceptible to lethal *Salmonella* Typhi infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15589–15594.
56. Harris JB, Baresch-Bernal A, Rollins SM, Alam A, LaRocque RC, et al. (2006) Identification of *in vivo*-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* 74: 5161–5168.
57. Charles RC, Sheikh A, Krastins B, Harris JB, Bhuiyan MS, et al. (2010) Characterization of anti-*Salmonella enterica* serotype Typhi antibody responses in bacteremic Bangladeshi patients by an immunoaffinity proteomics-based technology. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1188–1195.
58. Hu Y, Cong Y, Li S, Rao X, Wang G, et al. (2009) Identification of *in vivo* induced protein antigens of *Salmonella enterica* serovar Typhi during human infection. *Sci China C Life Sci* 52: 942–948.
59. Rengarajan J, Bloom B, Rubin E (2005) Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8327–8332.
60. Kitagawa R, Takaya A, Ohya M, Mizunoe Y, Takade A, et al. (2010) Biogenesis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium membrane vesicles provoked by induction of PagC. *J Bacteriol* 192: 5645–5656.
61. Eaves DJ, Ricci V, Piddock LJ (2004) Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: role in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1145–1150.
62. Yu EW, Aires JR, Nikaïdo H (2003) AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J Bacteriol* 185: 5657–5664.
63. Blair JM, La Ragione RM, Woodward MJ, Piddock LJ (2009) Periplasmic adaptor protein AcrA has a distinct role in the antibiotic resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* 64: 965–972.
64. Webber MA, Bailey AM, Blair JM, Morgan E, Stevens MP, et al. (2009) The global consequence of disruption of the AcrAB-TolC efflux pump in *Salmonella enterica* includes reduced expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host. *J Bacteriol* 191: 4276–4285.
65. García-del Portillo F, Núñez-Hernández C, Eisman B, Ramos-Vivas J (2008) Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Curr Opin Microbiol* 11: 46–52.
66. Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, et al. (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413: 848–852.
67. Shen HB, Chou KC (2010) Gneg-mPLOC: a top-down strategy to enhance the quality of predicting subcellular localization of Gram-negative bacterial proteins. *J Theor Biol* 264: 326–333.
68. Tamayo R, Prouty AM, Gunn JS (2005) Identification and functional analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PmrA-regulated genes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43: 249–258.
69. Gunn JS, Miller SI (1996) PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol* 178: 6857–6864.
70. Merighi M, Septer AN, Carroll-Portillo A, Bhatiya A, Porwollik S, et al. (2009) Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol* 9: 42.
71. Merighi M, Carroll-Portillo A, Septer AN, Bhatiya A, Gunn JS (2006) Role of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium two-component system PreA/PreB in modulating PmrA-regulated gene transcription. *J Bacteriol* 188: 141–149.
72. Galán J, Curtiss R, III (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6383–6387.
73. Mills DM, Bajaj V, Lee CA (1995) A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* 15: 749–759.
74. Parker CT, Guard-Petter J (2001) Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in chicks. *FEMS Microbiol Lett* 204: 287–291.
75. Kim JS, Eom JS, Jang JI, Kim HG, Seo DW, et al. (2011) Role of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 protein IacP in *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenesis. *Infect Immun* 79: 1440–1450.
76. Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, et al. (2007) *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* 9: 1834–1850.
77. Bäuml A, Kusters J, Stojilkovic I, Heffron F (1994) *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect Immun* 62: 1623–1630.
78. Morgan E, Campbell JD, Rowe SC, Bispham J, Stevens MP, et al. (2004) Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 54: 994–1010.
79. Morgan E, Bowen A, Carnell S, Wallis T, Stevens M (2007) SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infect Immun* 75: 1524–1533.
80. Margus T, Remm M, Tenson T (2007) Phylogenetic distribution of translational GTPases in bacteria. *BMC Genomics* 8: 15.
81. Farris M, Grant A, Richardson TB, O'Connor CD (1998) BipA: a tyrosine-phosphorylated GTPase that mediates interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells. *Mol Microbiol* 28: 265–279.
82. Grant AJ, Farris M, Alefounder P, Williams PH, Woodward MJ, et al. (2003) Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol* 48: 507–521.
83. Barker HC, Kinsella N, Jaspe A, Friedrich T, O'Connor CD (2000) Formate protects stationary-phase *Escherichia coli* and *Salmonella* cells from killing by a cationic antimicrobial peptide. *Mol Microbiol* 35: 1518–1529.
84. Keasling JD, Bertsch L, Kornberg A (1993) Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7029–7033.
85. Hara A, Sy J (1983) Guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate 5'-phosphohydrolase. Purification and substrate specificity. *J Biol Chem* 258: 1678–1683.
86. Potrykus K, Cashel M (2008) (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* 62: 35–51.
87. Thompson A, Rolfé MD, Lucchini S, Schwer P, Hinton JC, et al. (2006) The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of *Salmonella*. *J Biol Chem* 281: 30112–30121.
88. Haneda T, Sugimoto M, Yoshida-Ohta Y, Kodera Y, Oh-Ishi M, et al. (2010) Comparative proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ppGpp-deficient mutant to identify a novel virulence protein required for intracellular survival in macrophages. *BMC Microbiol* 10: 324.
89. Jeong JH, Song M, Park SI, Cho KO, Rhee JH, et al. (2008) *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells. *J Bacteriol* 190: 6340–6350.
90. Creeger ES, Rothfield LI (1979) Cloning of genes for bacterial glycosyltransferases. I. Selection of hybrid plasmids carrying genes for two glycosyltransferases. *J Biol Chem* 254: 804–810.
91. Schnaitman CA, Klerna JD (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev* 57: 655–682.
92. Nagy G, Danino V, Dobrindt U, Pallen M, Chaudhuri R, et al. (2006) Down-regulation of key virulence factors makes the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *rfaH* mutant a promising live-attenuated vaccine candidate. *Infect Immun* 74: 5914–5925.
93. Zenk SF, Jantsch J, Hensel M (2009) Role of *Salmonella enterica* lipopolysaccharide in activation of dendritic cell functions and bacterial containment. *J Immunol* 183: 2697–2707.
94. Reeves PR, Hobbs M, Valvano MA, Skurnik M, Whitfield C, et al. (1996) Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol* 4: 495–503.
95. Zhao Y, Jansen R, Gaastra W, Arkesteijn G, van der Zeijst BA, et al. (2002) Identification of genes affecting *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection of chicken macrophages. *Infect Immun* 70: 5319–5321.
96. Schmitt CK, Ikeda JS, Darnell SC, Watson PR, Bispham J, et al. (2001) Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid

- fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun* 69: 5619–5625.
97. Stepanova H, Volf J, Malcova M, Matiasovic J, Faldyna M, et al. (2011) Association of attenuated mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with porcine peripheral blood leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 321: 37–42.
98. Lähteenmäki K, Kyllönen P, Partanen L, Korhonen TK (2005) Antiprotease inactivation by *Salmonella enterica* released from infected macrophages. *Cell Microbiol* 7: 529–538.
99. Deng W, Liou S, Plunkett GR, Mayhew G, Rose D, et al. (2003) Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol* 185: 2330–2337.

Figures supplémentaires de l'article 2 (Annexe 1). Sabbagh SC, Lepage C, McClelland M, Daigle F (2012) Selection of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes involved during interaction with human macrophages by screening of a transposon mutant library. PLoS One 7: e36643.

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains	Characteristics	Source or Reference ^a
<i>S. Typhi</i>		
ISP1820	Wild-type <i>S. Typhi</i>	[1]
DEF566	ISP1820 Nal ^r	[2]
DEF435	ISP1820 Δ <i>fliC</i>	This study
DEF496	ISP1820 Δ <i>pgtE</i>	This study
DEF510	ISP1820 Δ <i>csg</i>	This study
DEF511	ISP1820 Δ <i>pagC</i>	This study
DEF512	ISP1820 Δ <i>typA</i>	This study
DEF534	ISP1820 Δ <i>mlc</i>	This study
DEF535	ISP1820 Δ STY1358-67	This study
DEF541	ISP1820 Δ <i>exbDB</i>	This study
DEF544	ISP1820 Δ <i>waaQGP</i>	This study
DEF546	ISP1820 Δ CS54	This study
DEF547	ISP1820 Δ STY1867-68	This study
DEF548	ISP1820 Δ STY1869	This study
DEF555	ISP1820 Δ <i>acrA</i>	This study
DEF556	ISP1820 Δ STY1398	This study
DEF557	ISP1820 Δ <i>ompN</i>	This study
DEF560	ISP1820 Δ <i>rfbIC</i>	This study

DEF561	ISP1820 $\Delta sipF$	This study
DEF562	ISP1820 $\Delta STY0041$	This study
DEF563	ISP1820 Δbcf	This study
DEF564	ISP1820 Δstb	This study
DEF571	ISP1820 $\Delta flhCD$	This study
DEF601	ISP1820 $\Delta gppA$	This study
DEF602	ISP1820 Δstc	This study
DEF625	ISP1820 $\Delta STY0016$	This study
DEF627	ISP1820 $\Delta STY2346$	This study
DEF628	ISP1820 $\Delta SPI-4$	This study
DEF632	DEF555 (pWSK <i>acrA</i>)	This study
DEF646	DEF435 (pWSK <i>fliC</i>)	This study
DEF656	ISP1820 $\Delta STY4679$	This study
DEF662	ISP1820 $\Delta STY4842-43$	This study
DEF766	DEF571 (pWSK <i>flhCD</i>)	This study
DEF767	DEF544 (pWSK <i>waaQGP</i>)	This study
DEF768	DEF556 (pWSKSTY1398)	This study
DEF769	DEF548 (pWSKSTY1869)	This study
DEF770	DEF627 (pWSKSTY2346)	This study

E. coli

MGN-617	SM10 $\lambda pir asd thi thr leu tonA lacY supE recA$ [3] RP4 2-Tc::Mu[λpir] $\Delta asdA4$
---------	--

Plasmids

pLOFKm	mini-Tn10-Km-based delivery plasmid with IPTG-inducible IS10 _R transposase driven by <i>ptac</i> promoter, <i>lacI^q mobRP4 oriR6K</i> ; Km ^r Ap ^r	[4]
pLOFKm-T7 (pSIF117)	pLOFKm with T7 RNA-polymerase promoter <i>NotI</i> -inserted in 3' region of mini-Tn10	This study
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K</i> ; Cm ^r Ap ^r	R. Curtiss III, ASU
pWSK29	Low-copy-number cloning vector; Ap ^r	[5]
pWSK <i>acrA</i>	pWSK29 carrying <i>acrA</i>	This study
pWSK <i>fliC</i>	pWSK29 carrying <i>fliC</i>	This study
pSIF113	pMEG-375 with flanking region of <i>fliC</i> used for <i>fliC</i> deletion	This study
pSIF133	pMEG-375 with flanking region of <i>pgtE</i> used for <i>pgtE</i> deletion	This study
pSIF143	pMEG-375 with flanking region of <i>csg</i> operon used for <i>csg</i> operon deletion	This study
pSIF144	pMEG-375 with flanking region of <i>pagC</i> used for <i>pagC</i> deletion	This study
pSIF145	pMEG-375 with flanking region of <i>typA</i> used for <i>typA</i> deletion	This study
pSIF156	pMEG-375 with flanking region of <i>mlc</i> used for <i>mlc</i> deletion	This study

pSIF157	pMEG-375 with flanking region of <i>exbDB</i> used for <i>exbDB</i> deletion	This study
pSIF159	pMEG-375 with flanking region of STY1358-67 used for STY1358-67 deletion	This study
pSIF160	pMEG-375 with flanking region of <i>waaQGP</i> used for <i>waaQGP</i> deletion	This study
pSIF162	pMEG-375 with flanking region of STY1869 used for STY1869 deletion	This study
pSIF163	pMEG-375 with flanking region of STY1867-68 used for STY1867-68 deletion	This study
pSIF164	pMEG-375 with flanking region of CS54 used for CS54 deletion	This study
pSIF165	pMEG-375 with flanking region of <i>acrA</i> used for <i>acrA</i> deletion	This study
pSIF166	pMEG-375 with flanking region of STY1398 used for STY1398 deletion	This study
pSIF167	pMEG-375 with flanking region of <i>ompN</i> used for <i>ompN</i> deletion	This study
pSIF171	pMEG-375 with flanking region of STY0041 used for STY0041 deletion	This study
pSIF173	pMEG-375 with flanking region of <i>sipF</i> used for <i>sipF</i> deletion	This study
pSIF174	pMEG-375 with flanking region of <i>rfbIC</i> used	This study

	for <i>rfbIC</i> deletion	
pSIF175	pMEG-375 with flanking region of <i>bcf</i> operon used for <i>bcf</i> operon deletion	This study
pSIF176	pMEG-375 with flanking region of <i>stb</i> operon used for <i>stb</i> operon deletion	This study
pSIF184	pMEG-375 with flanking region of <i>flhCD</i> used for <i>flhCD</i> deletion	This study
pSIF198	pMEG-375 with flanking region of <i>stc</i> operon used for <i>stc</i> operon deletion	This study
pSIF204	pMEG-375 with flanking region of <i>gppA</i> used for <i>gppA</i> deletion	This study
pSIF212	pMEG-375 with flanking region of SPI-4 used for SPI-4 deletion	This study
pSIF213	pMEG-375 with flanking region of STY4842-43 used for STY4842-43 deletion	This study
pSIF214	pMEG-375 with flanking region of STY2346 used for STY2346 deletion	This study
pSIF215	pMEG-375 with flanking region of STY0016 used for STY0016 deletion	This study
pSIF217	pMEG-375 with flanking region of STY4679 used for STY4679 deletion	This study
pSIF285	pWSK29 carrying <i>flhCD</i>	This study
pSIF286	pWSK29 carrying <i>waaQGP</i>	This study

pSIF287	pWSK29 carrying STY1398	This study
pSIF288	pWSK29 carrying STY1869	This study
pSIF289	pWSK29 carrying STY2346	This study

^aReferences:

1. Hone DM, Harris AM, Chatfield S, Dougan G, Levine MM (1991) Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9: 810-816.
2. Forest CG, Ferraro E, Sabbagh SC, Daigle F (2010) Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2. *Microbiology* 156: 3689-3698.
3. Kaniga K, Compton M, Curtiss III R, Sundaram P (1998) Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* 66: 5599-5606.
4. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis K (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172: 6557-6567.
5. Wang RF, Kushner SR (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100: 195-199.

Table S2. Primers used in this study.

Primers	Sequence (5'-3') ^a
Front NotI-Kan	AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCG
Rear NotI-Kan	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACTCTGA TGTTACATTGCACAAG
pLOF F seq	CAAGACGTTTCCCGTTGAAT
STY:PCRNiche#2	CTTGTGCAATGTAACATCAGAG
CCT ₂₄ VN	CCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN
STY0016 F1	CGGGATCCGTGATATCGCCATTATCGCG
STY0016 R2	TGAGGGCTTCGCCTTCAAGCGCAATAATT
STY0016 F3	TTGAAGGCGAAGCCCTCAATTGCAGTCAG
STY0016 R4	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATATCAGGCTCATCCGTGAG
STY0041 F1	CGGGATCCACCTCATGGAGTTGAGCATG
STY0041 R2	GGTCGCCGTAGTCGCCAT ATCCGAAGCTA
STY0041 F3	ATGGCGACTACGGCGACCGTATGAATTAC
STY0041 R4	AAGGAAAAAAGCGGCCGCACAAACCAATGCACAGCGAC
STY1358-67 F1	CGGGATCCGTGTACACATTGCTTGCCGA
STY1358-67 R2	TTCGATGATGAATACTGCCGGATGTAGAGAG
STY1358-67 F3	CGGCAGTATTCTCATCGAAGCATGGACT
STY1358-67 R4	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCATGTTAACGCTGGCGATG
STY1398 F1	CGGGATCCGATGAATTGTACGCGGCAGA
STY1398 R2	TGCCAGCGGCTCAATCCAGCCATCCAGTT

STY1398 F3 *TGGATTGAGCCGCTGGCATCATTTTCAGT*

STY1398 R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCATGTTAGTGTACCACGAG*

STY1398 compl R *CCGCTCGAGGCATGTTAGTGTACCACGAG*

STY1649 F1 *CGGGATCCAGGATGCCTTTGATTCAACG (ompN)*

STY1649 R2 *CGTCGTCATTCCCGTAAAGGTCCAGTTTG (ompN)*

STY1649 F3 *TTACGGGAATGACGACGACCCGTTCTAT (ompN)*

STY1649 R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCTGTCTGGGAGATAAGCAAACC (ompN)*

STY1867-68 F1 *GCTCTAGACCATCAGGTACGACATCAAC*

STY1867-68 R2 *GAGAAAAGTCCGTATATAAGCCAATCCCT*

STY1867-68 F3 *TATATACGGACTTTTCTCGCCTTACCGCT*

STY1867-68 R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCAATGGTGAAACAACGCCGCT*

STY1869 F1 *CGGGATCCCTCTCGACATTCTGCCTGTT*

STY1869 R2 *AACCAGATCATAGCGAGATAGCCAGATGG*

STY1869 F3 *TCTCGCTATGATCTGGTTAGTATGCAGGAC*

STY1869 R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCAATCCAGCGCTATCGGTTTC*

STY1869 compl R *CCGCTCGAGATTCCAGCGCTATCGGTTTC*

STY2346 F1 *CGGGATCCTTCCTCACGTTTACCCTGTG*

STY2346 R2 *ATCAACAACCAGCACGGTAAAGCAGTTGA*

STY2346 F3 *ACCGTGCTGGTTGTTGATCCTAACGTGGC*

STY2346 R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGACGCAGATCCTTCAGACGAT*

STY2346 compl R *CCGCTCGAGACGCAGATCCTTCAGACGAT*

STY2378-81 F1 *GCTCTAGATGTTGACTGCCTTCACTACC (stc)*

STY2378-81 R2 *GCTGAAATTAAGCGACTGCGCTGATCTAT (stc)*

STY2378-81 F3 *CAGTCGCTTAATTTTCAGCGGTGTTTCGTAC (ste)*

STY2378-81 R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCGATAACTTCCTGTCTATG (ste)*

STY3641 F1 *CGGGATCCGTAATCGTCGTCGTTTCAGGT (gppA)*

STY3641 R2 *AACGTCAGATCAATGGCGGCATACAACGA (gppA)*

STY3641 F3 *CGCCATTGATCTGACGTTAACCTTGCCTG (gppA)*

STY3641 R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCGGCAAAGTCACCTGGCTAAT (gppA)*

STY4452-60 F1 *GCTCTAGACTATAAAGCGTATTGGTAGC (SPI-4)*

STY4452-60 R2 *TGATCAACGTCAACAAAACCTAGGCCACGG (SPI-4)*

STY4452-60 F3 *TTTTGTTGACGTTGATCATGGTGACGCAT (SPI-4)*

STY4452-60 R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTGCCGACTCGTTAAATGAC (SPI-4)*

STY4679 F1 *CGGGATCCACGAATGATTGCCACACAG*

STY4679 R2 *TGACCCAACCTTGAGGGCTTGGATGGTAAG*

STY4679 F3 *AGCCCTCAAGTTGGGTCAATCGTTCCTAT*

STY4679 R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCCACAGACTTCGGTTTTGGT*

STY4842-43 F1 *CGGGATCCACTCGAGTACTCTGATGAA*

STY4842-43 R2 *GACCCACAACCTCATTACGATATGGTCA*

STY4842-43 F3 *TAATGAGGTTGTGGGTTCGGAAGCTGGATA*

STY4842-43 R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCGAGCCGGAATATCCGGTCAT*

acrA F1 *CGGGATCCACGCAGCAATGGGTTTAAGG*

acrA R2 *CCACTTATCTTGCTGGTCCTGTTTGTTCGT*

acrA F3 *GACCAGCAAGATAAGTGGCTGGTGACTGA*

acrA R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCAAGTTAAGACCTGGGCTGAG*

bcf F1 *CGGGATCCACTCACGACGTTGAGTAGCT*

bcf R2 *ACGTCATTCTGACGGTTGTAGTATCCGCT*

bcf F3 *CAACCGTCAGAATGACG TGGGAACCTTAG*

bcf R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCTGCTACGCGGTTTCAGTCATA*

CS54 F1 *GCTCTAGACCTGCTGATTTAGAATTTGATCC*

CS54 R2 *GAGTCACGCGCAGGCTGCGTGAAATTAGA*

CS54 F3 *GCAGCCTGCGCGTGACTCGCTTTTACTTG*

CS54 R4 *CCCGGGGGAGAACCCGTATGCGAACAA*

csg F *CGGGATCCTGGGGCTAATCTTTGGCTAT*

csg R over *AACTCAATCTATGAAGTACAGGCAGGCGT*

csg F over *TACTTCATAGATTGAGTTGTCTCGTCTTA*

csg R *AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCCTATGGCAGGGATATTTT*

exbD/B F1 *CGGGATCCTGATGCAGACGGATCTTTCC*

exbD/B R2 *ACTCTACGGTTAAGCGGCGCTTTTGCGT*

exbD/B F3 *GCCGCTTAACCGTAGAGTATGAAACCCTG*

exbD/B R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCGGGAACATTTAGGCTAACGC*

flhC/D F1 *CGGGATCCCTATGACAGGATGCGCAGTC*

flhC/D R2 *CAGCGTTTGTGCGTGTAAGTTTATGCCAG*

flhC/D F3 *TACACGCAACAAACGCTGTGCAAGGAGTA*

flhC/D R4 *AAGGAAAAAAGCGGCCGCTGGGAAGCTGCGTTATACGT*

fliC F *CGGGATCCAAGCCATGCCTTCTTCCTTT*

fliC R-over *AGAGGACGTACAGCGACAGGCTGTTTGT*

fliC F-over *TGTCGCTGTACGTCCTCTCTTTACTGCGTTA*

fliC R *GCTCTAGAGGGAAAGAGGAACAGGTATGA*

LPS compl F	CGGGAT <u>CCCC</u> CAGACAATGGGAATGACC
LPS compl R	CCGCTCGAG <u>CCCC</u> AATGATAAGAGTTACCT
mlc F1	CGGGAT <u>CCGCCT</u> GGGCATATCGATCAAA
mlc R2	<i>CAGAATGCGTTT</i> GCTGCTAAGATCGCGCA
mlc F3	<i>AGCAGCAA</i> ACGCATTCTGGCTATCATGGT
mlc R4	AAGGAAAAAAG <u>CGGCCGCCT</u> CCACCGTTATGCTTCGAA
pagC F	CGGGAT <u>CCC</u> ATTGTAGAACCGGTTACCT
pagC R over	<i>CACCCGCGCAAT</i> CCTGAACTTTACTTTGTG
pagC F over	<i>TTCAGGATTGCGCGGGT</i> GTACAGATGAAT
pagC R	AAGGAAAAAAG <u>CGGCCGCAT</u> CACCTACCTGAGCAACCT
pgtE F	CGGGAT <u>CC</u> ATTATGATTATAGATTGCTTATT
pgtE R over	<i>ATAATATCCGGTGT</i> CGGTATCATAAACCA
pgtE F over	<i>ACCGACACCGGAT</i> ATTATATTACCAGTAATGC
pgtE R	AAGGAAAAAAG <u>CGGCCGCC</u> ACAAAGAGTATATGGAAAG
rfbI/C F1	CGGGAT <u>CCCC</u> CAGGATGACCGCTTTCATA
rfbI/C R2	<i>TTGGCGATGTGT</i> CCATCATGCTGTGATGG
rfbI/C F3	<i>TGATGGACACAT</i> CGCCAAAACTTTAGGC
rfbI/C R4	AAGGAAAAAAG <u>CGGCCGCATA</u> AAAACCTGGCCGGGCCAT
sipF F1	CGGGAT <u>CCCCTT</u> ATCGGAGACGGTAGCT
sipF R2	<i>GAGCGAGAGCAT</i> CAACGGCAATACAGGAG
sipF F3	<i>CCGTTGATGCTCT</i> CGCTCGACAACAATTG
sipF R4	AAGGAAAAAAG <u>CGGCCGCC</u> CAGCAGTTCCTTCGGATCAT
stb F1	CGGGAT <u>CC</u> TGCTGAATTCTGGCCTGTCT

stb R2	<i>GTTATTGCCCGCCGAAAACAGCACTTGAT</i>
stb F3	<i>TTTTCGGCGGGCAATAACACGACGGGTTT</i>
stb R4	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCCAGGAGGGTATAGCTCACAT</i>
STY LPS F1	<i>CGGGATCCATCAGCACGCTGAAGCAGAA (waaQGP)</i>
STY LPS R2	<i>AACACGCTTACGATTACCGAAATCTTGCG (waaQGP)</i>
STY LPS F3	<i>GGTAATCGTAAGCGTGTTGCGACTATGGT (waaQGP)</i>
STY LPS R4	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCATCTTTGTCACGCCAGCGAA (waaQGP)</i>
typA F	<i>CGGGATCCCAAAGAGACTCTGCAATACT</i>
typA R over	<i>TCAGTTTCTCAACGATGTTGATACGATAA</i>
typA F over	<i>ACATCGTTGAGAAACTGACCAACATGCGT</i>
typA R	<i>AAGGAAAAAAGCGGCCGCTCATTGGTCGGCATAATACG</i>

^aRestriction enzyme sites are underlined. Letters in italics denote overlapping sequences. Letters in bold represent the T7 RNA-polymerase promoter sequence. Corresponding gene names are given in parenthesis following sequence where necessary.

Table S3. List of *S. Typhi* genes identified following negative selection of mutant pool in human macrophages.

<i>Salmonella</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Salmonella</i> Typhi		log2	
<i>Salmonella</i>	Typhi	<i>Salmonella</i>	Typhimurium	<i>Salmonella</i>	Typhi	output/input	P-value
Typhi	Name	Typhimurium	Name	Sanger Product	Functional class		
STY0015		STM0015		putative phage protein	Phage and insertion sequence elements	-2.54	0.00001
STY0016		STM0016		conserved hypothetical protein	Unknown	-3.13	0.00000
STY0021		STM0020		conserved hypothetical protein	Unknown	-3.57	0.00001
STY0031	<i>bcfF</i>	STM0026	<i>bcfF</i>	fimbrial subunit	Cell envelope	-2.12	0.00004
STY0039		STM0032		possible sulfatase	Small molecule metabolism	-4.00	0.00035
STY0040		STM0033		putative secreted 5'-nucleotidase	Unknown	-2.13	0.00005
STY0041		STM0034		putative exported protein	Cell envelope	-5.75	0.00001
STY0134	<i>leuO</i>	STM0115	<i>leuO</i>	probable activator protein in leuABCD operon	Amino acid biosynthesis/degradation	-2.69	0.00001
STY0207	<i>staA, yadN</i>			putative fimbrial protein	Cell envelope	-3.06	0.00002
STY0231	<i>htrA</i>	STM0209	<i>htrA</i>	protease DO precursor; heat shock protein HtrA	Protein biosynthesis/degradation	-3.69	0.00000
STY0329		STM0298		IS element transposase (pseudogene)	Phage and insertion sequence elements	-2.04	0.00015
STY0372	<i>stbB</i>	STM0339	<i>stbB</i>	fimbrial chaperone protein	Cell envelope	-3.69	0.00000
STY0419	<i>proC</i>	STM0386	<i>proC</i>	pyrroline-5-carboxylate reductase	Amino acid biosynthesis/degradation	-3.57	0.00009
STY0477		STM0437		conserved hypothetical protein	Unknown	-2.29	0.00001
STY0520	<i>acrA</i>	STM0476	<i>acrA</i>	acriflavin resistance protein A precursor	Cell envelope	-4.13	0.00014
STY0569	<i>ybbW</i>	STM0522	<i>ybbV</i>	putative allantoin permease (pseudogene)	Transport and binding proteins	-2.60	0.00011
STY0605		STM0557		putative membrane protein	Cell envelope	-4.55	0.00032
STY0651	<i>ybdO</i>	STM0606	<i>ybdO</i>	putative lysR-family transcriptional regulator	Regulatory functions	-2.91	0.00041
STY0804	<i>gpmA</i>	STM0772	<i>gpmA</i>	phosphoglycerate mutase 1	Energy metabolism	-4.71	0.00023
STY0878	<i>ybiS</i>	STM0837	<i>ybiS</i>	putative exported protein	Cell envelope	-4.52	0.00004
STY0917	<i>ulaA</i>	STM0884	<i>ulaA</i>	possible transport protein	Transport and binding proteins	-2.42	0.00008
STY0968	<i>pflA</i>	STM0970	<i>pflA</i>	pyruvate formate-lyase 1 activating enzyme	Energy metabolism	-4.12	0.00005
STY0973	<i>pflB</i>	STM0973	<i>pflB</i>	formate acetyltransferase 1	Energy metabolism	-6.02	0.00015
STY0974	<i>focA</i>	STM0974	<i>focA</i>	probable formate transporter (formate channel)	Transport and binding proteins	-6.17	0.00002

STY0977	<i>serC</i>	STM0977	<i>serC</i>	phosphoserine aminotransferase	Amino acid biosynthesis/degradation	-2.24	0.00005
STY1041				putative prophage membrane protein	Phage and insertion sequence elements	-2.33	0.00044
STY1121	<i>sigD, sopB</i>	STM1091	<i>sopB</i>	cell invasion protein	Pathogenesis	-2.08	0.00004
STY1129		STM1097		putative exported protein	Cell envelope	-2.57	0.00004
STY1157		STM1122	<i>ycdC</i>	putative transcriptional regulator	Regulatory functions	-3.16	0.00038
STY1177	<i>csgF</i>	STM1140	<i>csgF</i>	assembly/transport component in curli production	Cell envelope	-4.74	0.00041
STY1187	<i>mdoG</i>	STM1150	<i>mdoG</i>	periplasmic glucans biosynthesis protein MdoG precursor	Cellular processes	-3.16	0.00018
STY1220	<i>flgI</i>	STM1181	<i>flgI</i>	flagellar P-ring protein precursor	Cell envelope	-4.16	0.00032
STY1312	<i>cls</i>	STM1739	<i>cls</i>	cardiolipin synthetase	Cell envelope	-3.72	0.00039
STY1364				hypothetical periplasmic protein	Cell envelope	-3.47	0.00003
STY1397		STM1667		putative thiol peroxidase	Unknown	-2.33	0.00010
STY1398		STM1666		hypothetical protein	Unknown	-3.84	0.00001
STY1401		STM1663	<i>ynal</i>	putative membrane protein	Cell envelope	-2.22	0.00044
STY1408		STM1657		putative chemo-receptor protein	Cellular processes	-2.79	0.00042
STY1427	<i>acpD</i>	STM1642	<i>acpD</i>	acyl carrier protein phosphodiesterase	Small molecule metabolism	-2.37	0.00044
STY1497	<i>osmC</i>	STM1563	<i>osmC</i>	osmotically inducible protein C	Cellular processes	-3.90	0.00019
STY1523	<i>hyaA2</i>	STM1539		uptake hydrogenase small subunit	Energy metabolism	-4.89	0.00007
STY1534		STM1527		putative membrane protein	Cell envelope	-2.02	0.00002
STY1554		STM1507	<i>yfdJ</i>	putative membrane transport protein	Transport and binding proteins	-2.77	0.00021
STY1576		STM1488	<i>mle</i>	putative regulatory protein	Regulatory functions	-2.25	0.00018
STY1585		STM1482	<i>ydgF</i>	putative conserved membrane protein	Cell envelope	-5.21	0.00002
STY1643				DNA-invertase	Phage and insertion sequence elements	-2.28	0.00008
STY1649		STM1473	<i>ompN</i>	outer membrane protein	Transport and binding proteins	-3.87	0.00005
STY1690		STM1432	<i>ydhO</i>	putative secreted protein	Cell envelope	-2.70	0.00003
STY1702	<i>ssaQ</i>	STM1418	<i>ssaQ</i>	putative type III secretion protein	Pathogenesis	-2.55	0.00048
STY1703	<i>ssaP</i>	STM1417	<i>ssaP</i>	putative type III secretion protein	Pathogenesis	-3.43	0.00028
STY1705	<i>ssaN</i>	STM1415	<i>ssaN</i>	putative type III secretion ATP synthase	Pathogenesis	-2.46	0.00023
STY1739		STM1382	<i>orf408</i>	Putative ribokinase (pseudogene)	Pathogenesis	-2.26	0.00022
STY1770	<i>btuC</i>	STM1340	<i>btuC</i>	vitamin B12 transport system permease	Transport and binding proteins	-2.25	0.00033
STY1852	<i>aroQ</i>	STM1269		putative chorismate mutase	Amino acid biosynthesis/degradation	-2.95	0.00001

STY1859		STM1261		conserved hypothetical protein	Unknown	-2.76	0.00024
STY1867		STM1254		putative lipoprotein	Cell envelope	-5.46	0.00018
STY1868		STM1253		putative cytochrome	Unknown	-4.14	0.00003
STY1869		STM1252		hypothetical protein	Unknown	-2.10	0.00042
STY1878	<i>pagC</i>	STM1246	<i>pagC</i>	outer membrane invasion protein	Pathogenesis	-2.23	0.00049
STY1886	<i>cdtB</i>			putative toxin-like protein	Pathogenesis	-3.86	0.00006
STY1910		STM1784	<i>ychF</i>	putative ATP/GTP-binding protein	Unknown	-3.28	0.00039
STY1976	<i>prc</i>	STM1845	<i>prc</i>	tail-specific protease precursor	Protein biosynthesis/degradation	-4.85	0.00016
STY2091	<i>kdgA</i>	STM1884	<i>eda</i>	multifunctional:2-keto-3-deoxygluconate 6-phosphate aldolase; 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase; oxaloacetate decarboxylase	Energy metabolism	-4.16	0.00003
STY2134	<i>flhD</i>	STM1925	<i>flhD</i>	flagellar transcriptional activator FlhD	Regulatory functions	-3.22	0.00043
STY2167	<i>fliC, flaG</i>	STM1959	<i>fliC</i>	flagellin	Cell envelope	-2.72	0.00000
STY2168	<i>fliD</i>	STM1960	<i>fliD</i>	flagellar hook associated protein 2	Cell envelope	-7.08	0.00009
STY2171	<i>amyA</i>	STM1963	<i>amyA</i>	cytoplasmic alpha-amylase	Macromolecule metabolism	-2.18	0.00042
STY2251	<i>pduK</i>	STM2046	<i>pduK</i>	putative propanediol utilization protein PduK	Small molecule metabolism	-2.10	0.00008
STY2276	<i>sbcB</i>	STM2067	<i>sbcB</i>	exodeoxyribonuclease I	DNA/RNA replication, degradation, modification	-2.04	0.00003
STY2289	<i>ugd, udg</i>	STM2080	<i>udg</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	Small molecule metabolism	-2.54	0.00001
STY2303	<i>rfbI</i>	STM2093	<i>rfbI</i>	putative reductase RfbI	Cell envelope	-2.87	0.00024
STY2304	<i>rfbC</i>	STM2094	<i>rfbC</i>	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	Cell envelope	-3.48	0.00009
STY2346		STM2133		hypothetical protein	Unknown	-4.47	0.00035
STY2347		STM2134		hypothetical protein	Unknown	-2.40	0.00004
STY2378	<i>stcD, yehA</i>	STM2149	<i>stcD</i>	putative exported protein	Cell envelope	-2.85	0.00002
STY2403		STM2173		hypothetical protein	Unknown	-3.61	0.00001
STY2432		STM2198		putative transport protein (pseudogene)	Transport and binding proteins	-2.19	0.00004
STY2444		STM2208		putative membrane protein	Cell envelope	-4.39	0.00039
STY2469		STM2243		putative bacteriophage tail protein (pseudogene)	Unknown	-2.50	0.00003
STY2501		STM2274		putative transmembrane spot protein (pseudogene)	Transport and binding proteins	-3.76	0.00016
STY2504		STM2275		putative transcriptional regulator (pseudogene)	Regulatory functions	-2.33	0.00002
STY2509		STM2280		putative transmembrane transport protein	Transport and binding proteins	-2.44	0.00026
STY2574		STM2344		putative sugar phosphotransferase component II A	Small molecule metabolism	-2.06	0.00010
STY2582	<i>hisM</i>	STM2352	<i>hisM</i>	histidine transport system permease	Transport and binding proteins	-2.61	0.00003
STY2607		STM2376		putative lipoprotein	Cell envelope	-2.15	0.00013

STY2608		STM2377		conserved hypothetical protein	Unknown	-2.76	0.00016
STY2621	<i>fadI</i>	STM2389	<i>yfcY</i>	putative 3-ketoacyl-CoA thiolase	Small molecule metabolism	-2.11	0.00009
STY2632	<i>pgtE, prtA</i>	STM2395	<i>pgtE</i>	outer membrane protease E, protease VII precursor	Cell envelope	-3.20	0.00038
STY2725	<i>purC</i>	STM2487	<i>purC</i>	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	DNA/RNA replication, degradation, modification	-2.73	0.00020
STY2762	<i>sivH, sinH</i>	STM2517	<i>sinH</i>	putative intimin (pseudogene)	Pathogenesis	-2.32	0.00017
STY2820		STM2574		putative transmembrane transport protein	Transport and binding proteins	-2.57	0.00001
STY2860	<i>rplS</i>	STM2673	<i>rplS</i>	50S ribosomal subunit protein L19	Protein biosynthesis/degradation	-2.42	0.00008
STY2982	<i>ygbA</i>	STM2860	<i>ygbA</i>	conserved hypothetical protein	Unknown	-2.89	0.00010
STY2988	<i>sprA, hilC</i>	STM2867	<i>hilC</i>	possible AraC-family transcriptional regulator	Pathogenesis	-3.90	0.00002
STY2994	<i>prgI</i>	STM2873	<i>prgI</i>	pathogenicity 1 island effector protein	Pathogenesis	-3.42	0.00024
STY3004	<i>sipF</i>	STM2881	<i>iacP</i>	probable acyl carrier protein	Pathogenesis	-5.00	0.00003
STY3007	<i>sipC, sspC</i>	STM2884	<i>sipC</i>	pathogenicity island 1 effector protein	Pathogenesis	-2.01	0.00010
STY3010	<i>spaS</i>	STM2887	<i>spaS</i>	secretory protein (associated with virulence)	Pathogenesis	-2.05	0.00045
STY3047		STM2922		conserved hypothetical protein	Unknown	-3.08	0.00019
STY3167		STM3022		probable amino acid transport protein	Transport and binding proteins	-2.06	0.00043
STY3309		STM3138		hypothetical protein	Unknown	-2.43	0.00001
STY3331	<i>exbD</i>	STM3158	<i>exbD</i>	biopolymer transport ExbD protein	Transport and binding proteins	-6.04	0.00010
STY3332	<i>exbB</i>	STM3159	<i>exbB</i>	biopolymer transport ExbB protein	Transport and binding proteins	-3.53	0.00012
STY3340		STM3166.S		possible membrane transport protein	Transport and binding proteins	-2.58	0.00044
STY3456		STM3273	<i>yhbT</i>	conserved hypothetical protein	Unknown	-2.07	0.00027
STY3537		STM3357		possible transcriptional regulator	Regulatory functions	-4.71	0.00021
STY3605		STM3954	<i>yigG</i>	conserved hypothetical protein	Unknown	-3.03	0.00046
STY3862	<i>ompL</i>	STM4016	<i>ompL, yshA</i>	conserved hypothetical protein	Unknown	-2.78	0.00010
STY3871	<i>typA</i>	STM4009	<i>typA, bipA</i>	GTP-binding protein	Regulatory functions	-2.94	0.00049
STY4049	<i>trmH, spoU</i>	STM3743	<i>spoU</i>	tRNA (guanosine-2'-O)-methyltransferase	Protein biosynthesis/degradation	-2.53	0.00033
STY4072	<i>waaG, rfaG</i>	STM3722	<i>rfaG</i>	lipopolysaccharide core biosynthesis protein	Cell envelope	-3.25	0.00001
STY4077	<i>waal, rfaI</i>	STM3718	<i>rfaI</i>	lipopolysaccharide 1,3-galactosyltransferase	Cell envelope	-6.82	0.00005
STY4081	<i>waaK, rfaK</i>	STM3714	<i>rfaK</i>	lipopolysaccharide 1,2-N-acetylglucosaminetransferase	Cell envelope	-2.31	0.00007
STY4082	<i>waal, rfaL, rfbT</i>	STM3713	<i>rfaL</i>	O-antigen ligase	Cell envelope	-2.26	0.00002
STY4106		STM3690		putative lipoprotein	Cell envelope	-4.77	0.00031

STY4264		STM3547.Sc		putative ribokinase	Unknown	-3.09	0.00022
STY4400	<i>metA</i>	STM4182	<i>metA</i>	homoserine O-succinyltransferase	Amino acid biosynthesis/degradation	-2.27	0.00015
STY4426	<i>malK</i>	STM4230	<i>malK</i>	maltose/maltodextrin transport ATP-binding protein	Transport and binding proteins	-2.01	0.00026
STY4453		STM4258	<i>siiB</i>	putative integral membrane protein	Pathogenesis	-3.55	0.00020
STY4456		STM4259	<i>siiC</i>	putative type-I secretion protein	Pathogenesis	-3.43	0.00002
STY4458		STM4261	<i>siiE</i>	large repetitive protein (pseudogene)	Pathogenesis	-2.35	0.00004
STY4582				possible exported protein	Pathogenesis	-2.89	0.00038
STY4679				putative membrane protein	Pathogenesis	-3.33	0.00001
STY4725	<i>rnr</i>	STM4368	<i>vacB</i>	ribonuclease R (RNase R)	DNA/RNA replication, degradation, modification	-3.84	0.00009
STY4728	<i>yjfJ</i>	STM4371	<i>yjfJ</i>	conserved hypothetical protein (pseudogene)	Unknown	-3.37	0.00004
STY4805		STM4467		arginine deiminase	Amino acid biosynthesis/degradation	-3.06	0.00024
STY4842				probable regulatory protein	Pathogenesis	-3.74	0.00000
STY4863	<i>trpS2</i>	STM4508	<i>trpS2</i>	probable tryptophanyl-tRNA synthetase	Protein biosynthesis/degradation	-2.85	0.00015
STY4881	<i>hsdS</i>	STM4524	<i>hsdS</i>	subunit S of type I restriction - modification system	DNA/RNA replication, degradation, modification	-2.51	0.00006
STY4899		STM4546	<i>yjjP</i>	putative membrane protein	Cell envelope	-2.96	0.00035

ANNEXE 2 – Article publié comme coauteur

Les pages suivantes présentent un article auquel j'ai contribué en tant que coauteur.

3. Forest CG, Ferraro E, **Sabbagh SC**, Daigle F (2010) Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2. *Microbiology* 156: 3689-3698.

Dans cet article, nous avons évalué le rôle de composantes du SPI-2 spécifiques au sérovar Typhi dans la survie intracellulaire de la bactérie chez les macrophages humains.

Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2

Chantal G. Forest,[†] Elyse Ferraro,[†] Sébastien C. Sabbagh and France Daigle

Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, [REDACTED]

Received 27 May 2010
Revised 5 August 2010
Accepted 27 August 2010

For successful infection, *Salmonella enterica* secretes and injects effector proteins into host cells by two distinct type three secretion systems (T3SSs) located on *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs)-1 and -2. The SPI-2 T3SS is involved in intracellular survival of *S. enterica* serovar Typhimurium and systemic disease. As little is known regarding the function of the SPI-2 T3SS from *S. enterica* serovar Typhi, the aetiological agent of typhoid fever, we investigated its role for survival in human macrophages. Mutations in the translocon (*sseB*), basal secretion apparatus (*ssaR*) and regulator (*ssrB*) did not result in any reduction in survival under many of the conditions tested. Similar results were obtained with another *S. Typhi* strain or by using human primary cells. Results were corroborated based on complete deletion of the SPI-2 T3SS. Surprisingly, the data suggest that the SPI-2 T3SS of *S. Typhi* is not required for survival in human macrophages.

INTRODUCTION

Salmonella enterica is an important pathogen of animals and humans, which typically become infected by ingestion of contaminated food or water. There are two major groups of *S. enterica* that cause disease in humans: the systemic (typhoid fever) group and the non-typhoidal salmonellae group. Typhoid fever is mainly caused by *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), a host-adapted serovar that is specific for humans. Non-typhoidal salmonellae are generally associated with gastroenteritis, which rarely develops into an invasive infection. *S. enterica* serovar Typhimurium is frequently associated with gastroenteritis in humans, whereas this serovar causes a systemic typhoid-like disease in susceptible mice. *S. Typhimurium* infection in susceptible mice is usually used as a model for *S. Typhi* infection in humans, as these serovars share many virulence factors, including *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs) (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001; Sabbagh *et al.*, 2010).

S. Typhimurium encodes two distinct type three secretion systems (T3SSs), located on SPI-1 and SPI-2. The SPI-1

T3SS is involved in invasion of epithelial cells (Galán & Curtiss, 1989), whereas the SPI-2 T3SS is essential for survival and replication in host cells (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996). The SPI-2 T3SS corresponds to a 25 kb fragment organized in four operons: regulatory, structural I, structural II and effector/chaperone (see Supplementary Fig. S1, available with the online version of this paper, and Kuhle & Hensel, 2004). The two-component regulatory system SsrA/SsrB is responsible for the transcriptional regulation of SPI-2 operons as well as the regulation of effector genes located outside SPI-2 (reviewed by Haraga *et al.*, 2008). The T3SS needle complex comprises basal component proteins in the inner membrane (including SsaR), proto-channel proteins, outer membrane proteins, proteins forming a hollow tube generating the needle and outer ring proteins (including SseB), which form the translocon that traverses the host vacuolar membrane (Supplementary Fig. S1). This SPI-2 T3SS injects at least 20 effector proteins across the vacuolar membrane into the host cytosol (Haraga *et al.*, 2008). These effectors interact with the host machinery and are required for modification of the vacuole and modulation of intracellular processes (Brumell *et al.*, 2001; Waterman & Holden, 2003; Yu *et al.*, 2004), which will allow the bacteria to survive and replicate in a membrane-bound structure called the *Salmonella*-containing vacuole. Intracellular induction of SPI-2 genes was initially observed by using reporter assays (Valdivia & Falkow, 1997; Cirillo *et al.*, 1998; Pfeifer *et al.*, 1999) and was confirmed by microscopy (Kuhle & Hensel, 2002), microarray data (Eriksson *et al.*, 2003) and Western blotting (Coombes *et al.*, 2007).

[†]These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: CI, competitive index; IFN- γ , gamma interferon; MDMs, monocyte-derived macrophages; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; SPI, *Salmonella* pathogenicity island; T3SS, type three secretion system.

Two supplementary figures, showing the SPI-2 T3SS and the mutants generated during this study, are available with the online version of this paper.

Survival and replication of *S. Typhimurium* within cultured cells correlate with systemic survival and persistence in animal models, as mutants that fail to replicate in cultured cells are avirulent in animals (Fields *et al.*, 1986; Leung & Finlay, 1991; Shea *et al.*, 1999). Survival within macrophages is therefore an essential step for *Salmonella* pathogenesis. Two major systems are implicated in this process: (1) the two-component regulatory system PhoPQ and its regulon (Groisman *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989; Garvis *et al.*, 2001) and (2) the SPI-2 T3SS (Shea *et al.*, 1996; Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998). The intracellular proliferation defect of SPI-2 mutants was observed in primary macrophages and several macrophage-like cell lines as well as in epithelial cell lines (Ochman *et al.*, 1996; Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998; Beuzón *et al.*, 2002). *S. Typhimurium* strains deficient in SPI-2 are highly attenuated in the murine systemic infection model (Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2005).

The intracellular survival defect can be observed in most individual mutants, such as *sseB*, *ssaR* and *ssrB*. The *sseB* mutant of *S. Typhimurium* has a growth defect in murine macrophages (peritoneal, RAW264.7 and J774A.1), and in epithelial cells (HEp-2) but was not recovered from liver or spleen of infected BALB/c mice (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998). SseB is a translocon constituent involved in pore formation in the host membrane for delivery of effector proteins. An *sseB* mutant does not secrete SseD and SseC, two other translocon proteins (Chakravorty *et al.*, 2005), and SseB is required for the translocation of effector proteins by intracellular *Salmonella* (Nikolaus *et al.*, 2001). Also, *ssaR* mutants of *S. Typhimurium* are defective in intracellular replication in murine macrophages (RAW264.7), are attenuated in BALB/c mice and are unable to secrete SPI-2 effectors (Shea *et al.*, 1996; Coombes *et al.*, 2004). Mutants of the two-component system SsrAB are unable to survive within murine macrophages (RAW264.7, J774A.1), are impaired in epithelial cell replication (HEp-2) and are avirulent in mice (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998; Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996).

Moreover, SPI-2 has also been shown to interfere with antigen presentation (Cheminay *et al.*, 2005; Tobar *et al.*, 2006; Halici *et al.*, 2008), cytokine production (Uchiya *et al.*, 2004) and cytotoxicity (Monack *et al.*, 2001; Paesold *et al.*, 2002). The critical role of the SPI-2 T3SS for *S. Typhimurium* is therefore well established. Although most SPI-2 genes were upregulated following *S. Typhi* uptake by human macrophages (Faucher *et al.*, 2006), the specific role of the SPI-2 T3SS of *S. Typhi* has not yet been reported. In this study, we targeted specific components of the secretion system, such as the translocon (*sseB*), the basal secretion apparatus (*ssaR*) and the regulator (*ssrB*) in order to investigate the contribution of the SPI-2 T3SS during interaction of *S. Typhi* with human macrophages.

METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Bacteria were routinely grown overnight statically (low aeration) in Luria–Bertani (LB) broth, unless indicated otherwise. When required, antibiotics or supplements were added at the following concentrations: 50 µg ampicillin ml⁻¹, 34 µg chloramphenicol ml⁻¹, 50 µg nalidixic acid ml⁻¹ or 50 µg diamino-pimelic acid ml⁻¹.

Construction of SPI-2 mutants. Deletion of *sseB*, *ssaR* and the entire T3SS of SPI-2 [$\Delta(ssaU-ssrB)$] were generated by allelic exchange as described previously for the *ssrB* deletion (Faucher *et al.*, 2009) by using the overlap-extension PCR method (Basso *et al.*, 2002). Primers are listed in Table 2, and detailed information on the deletions is presented in Supplementary Fig. S2. Mutations were confirmed by PCR. All mutants have growth curves in LB broth similar to that of the wild-type strain (data not shown).

SseB antibodies and secretion assays. The amplified *sseB* gene of *S. Typhi* ISPI820 was cloned into pET-21a vector (pSIF128) and SseB proteins were purified by using Ni-nitrilotriacetic acid agarose beads (Qiagen) and polyclonal antibodies against SseB were raised in rabbits (GeneScript). For secretion assays, bacteria were grown in a low phosphate and magnesium medium (LPM; pH 5.8), corresponding to SPI-2-inducing conditions (Coombes *et al.*, 2004). Bacteria were pelleted, and supernatant was collected and precipitated as described previously (Faucher *et al.*, 2009). Samples were dissolved in an appropriate volume of SDS-PAGE loading buffer, according to the OD₆₀₀ value of the original culture. Proteins were separated on 10 or 15% (w/v) SDS-polyacrylamide gels and then transferred onto PVDF membranes and incubated with rabbit anti-GroEL (Sigma) or rabbit affinity-purified antibodies raised against recombinant SseB. Peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) was used as the secondary antibody and was detected with the ECL plus Western blotting detection reagent (GE Healthcare).

Infection of human cultured macrophages. The human monocyte cell line THP-1 (ATCC TIB-202) was maintained in RPMI 1640 (Wisent) containing 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen), 25 mM HEPES (Wisent), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 1% modified Eagle's medium with non-essential amino acids (Wisent). A stock culture of these cells was maintained as monocyte-like, non-adherent cells at 37 °C in an atmosphere containing 5% (v/v) CO₂. For macrophage infection, cells were seeded at 5 × 10⁵ cells per well in 24-well tissue-culture dishes and were differentiated by addition of 10⁻⁷ M phorbol 12-myristate 13-acetate for 48 h. Macrophage infection was performed as described previously (Daigle *et al.*, 2001) unless specified otherwise. Briefly, bacteria were grown overnight without shaking in LB broth, usually reaching an OD₆₀₀ of 0.6. Bacteria were added to the cell monolayer at an m.o.i. of 10:1, and were centrifuged for 5 min at 800g to synchronize bacterial uptake. After incubation for 20 min at 37 °C, extracellular bacteria were removed by washing cells three times with prewarmed PBS, pH 7.4, and the infected monolayers were either lysed (T₀) or incubated for 2 h with medium containing 100 µg gentamicin ml⁻¹ (Wisent) to kill extracellular bacteria, and then with 12 µg gentamicin ml⁻¹ for the remainder of the experiment. Cells were lysed by addition of 1 ml 0.1% (w/v) sodium deoxycholate in PBS per well, and the number of surviving bacteria was determined as c.f.u. by plating on LB agar. Survival (fold increase) was defined as the number of bacteria recovered 24 h after infection divided by the number of bacteria detected 2 h after infection. Results are expressed as the mean ± SEM of replicate experiments. The non-parametric Mann–Whitney test was used for statistical analysis. Where indicated, bacteria grown to stationary phase in LB broth were diluted in PBS or

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain/plasmid	Characteristic	Reference or source
Strains		
S. Typhi		
ISP1820	Wild-type <i>S. Typhi</i>	Hone <i>et al.</i> (1991)
DEF093	ISP1820 $\Delta sseB$	This study
DEF148	ISP1820 $\Delta ssaR$	This study
DEF149	ISP1820 $\Delta ssrB$	Faucher <i>et al.</i> (2009)
χ 8521	ISP1820 $\Delta phoP$	R. Curtiss III, Arizona State University (ASU)
Ty2	Wild-type <i>S. Typhi</i>	R. Curtiss III, ASU
DEF473	Ty2 $\Delta sseB$	This study
DEF566	ISP1820 Nal^r	This study
DEF574	ISP1820 $\Delta(ssaU-ssrB)$	This study
χ 4455	ISP1820 Δasd	R. Curtiss III, ASU
DEF010	χ 4455 gfp^+ (pHY11)	This study
DEF478	DEF010 $\Delta sseB$	This study
S. Typhimurium		
χ 3339	Mouse-passaged isolate of SL1344 <i>rpsL hisG</i>	Gulig & Curtiss (1987)
DEF458	χ 3339 $\Delta sseB$	This study
Escherichia coli		
MGN-617	SM10 λ pir <i>asd thi thr leu tonA lacY supE recA</i> RP4 2-Tc::Mu[λ pir] $\Delta asdA4$	Kaniga <i>et al.</i> (1998)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> , with DE3, a prophage carrying the T7 RNA <i>pol</i> gene	Novagen
Plasmids		
pET-21a	IPTG-inducible T7 RNA-polymerase-dependent expression vector, 6 × His-Tag at C terminus, Ap ^r	Novagen
pHY11	pYA810- <i>gfp</i>	H. Y. Kang, Pusan National University; Srinivasan <i>et al.</i> (1995)
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K. Cm^r Ap^r</i>	R. Curtiss III, ASU
pSIF040	pMEG-375 with flanking region of <i>sseB</i> used for <i>sseB</i> deletion	This study
pSIF073	pMEG-375 with flanking region of <i>ssaR</i> used for <i>ssaR</i> deletion	This study
pSIF128	pET-21a with <i>sseB</i>	This study
pSIF187	pMEG-375 with flanking region of <i>ssaU</i> and <i>ssrB</i> used for entire SPI-2 deletion	This study

Table 2. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')*
sseB-BF	CGGGATCCAATACGCACCACGGCTTTT
sseB-BR	CCCCGGTGGACCCTACAACAGGCACATGACAC
sseB-EF	TTGTAGGGTCCACCGGGGCTTGAGCATTAAAG
sseB-ER	GCTCTAGAAAATGGGACAGGCTCTTAGTTAGCAC
ssaR-BF	CGGGATCCTGCTGAGCGTCAACAGATTTATCC
ssaR-BR	ATTTCGTAACGTCCCCCGTTTAAAGTTGTGC
ssaR-EF	ACGGGGGACGTTACGAATTGGAGAGCATGGTTG
ssaR-ER	GCTCTAGAAGCAGAAAACCCCGCCATATC
sseBF- <i>NdeI</i>	GGAATTCATATGTCTCTCAGGAAACATCTTATG
sseBR- <i>XhoI</i>	CCGCTCGAGTGAATACGTTTTCTGCGCTATCA
ssaU-R	CGGGATCCAATACGCTATCTGGTGCTTG
ssaU-Fover	TGTTTCGACTGCAGCCTTGTTACGTATGG
ssrB-Fover	AAGGCTGCAGTCGAAACACATCGGATGAAT
ssrB-R	GCTCTAGAAGGCGTAAGGCTCATCAAAAT

*Restriction enzyme sites are underlined. Letters in italics denote overlapping sequences.

opsonized for 20 min in 10% normal human serum before being added to macrophages at an m.o.i. of 10:1. Activation of macrophages was achieved by addition of 100 U gamma interferon (IFN- γ) ml⁻¹ (PBL Biomedical Laboratories) in the medium 48 h prior to infection. The addition of IFN- γ was maintained throughout the infection.

For competitive index (CI) experiments in macrophages (Segura *et al.*, 2004), a spontaneous nalidixic acid-resistant (Nal^r) *S. Typhi* ISP1820 strain was used as the wild-type strain (DEF566). This Nal^r strain showed no intracellular attenuation compared with strain ISP1820 when both were used in a CI experiment in THP-1 macrophages (data not shown). The wild-type and mutant strains used for competition experiments were separately grown overnight (static) in LB broth, and a 1:1 mixture of the two cultures was added at an m.o.i. of 50:1 to the THP-1 cell monolayer, as described above. The numbers of viable intracellular bacteria were determined 2 and 24 h after infection by plating on LB agar and on LB agar with antibiotic. The CI for bacterial survival is defined as the mutant to wild-type ratio of bacteria recovered 24 h post-infection divided by the equivalent ratio of bacteria recovered 2 h post-infection. Statistical significance was evaluated by using Student's two-tailed *t*-test by comparing ratios (c.f.u. mutant/c.f.u. wild-type) at 24 and 2 h (Santiviago *et al.*, 2009).

Infection of human monocyte-derived macrophages (MDMs).

MDMs were obtained by using previously published protocols (Baron-Bodo *et al.*, 2005; Romieu-Mourez *et al.*, 2006; Goubau *et al.*, 2009). Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll gradient centrifugation from fresh apheresis with informed and institutionally approved consent forms from healthy donors. PBMCs were resuspended at 10⁶ cells ml⁻¹ in ISCOVE medium (Wisent) supplemented with 2% human serum (Wisent), antibiotics and 700 U ml⁻¹ recombinant human GM-CSF (a generous gift from Cingene Corporation). On day 7, adherent MDMs were harvested after three washes with PBS and gentle cell scraping and were identified based on assessment of CD14, CD64 and HLA-DR. MDMs were transferred to a 24-well tissue culture plate and further incubated for 3 days (to day 10). Infection of MDMs with *S. Typhi* was performed as described for THP-1 macrophages.

Microscopy of infected macrophages. THP-1 cells were seeded on to glass coverslips (12 mm diameter) in 24-well plates. The infection was then carried out using GFP-expressing strains. For fluorescence microscopy, cell monolayers were washed in PBS and then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, for 10 min at room temperature. Coverslips were washed three times in PBS and mounted on Geltol (Immunon Thermo). Samples were analysed using a fluorescence microscope (Eclipse E600; Nikon).

RESULTS

SPI-2 mutants

S. Typhi ISP1820 isogenic strains harbouring mutations in genes encoding distinct components of the SPI-2 T3SS were constructed by allelic exchange (Supplementary Figs S1 and S2). Deletion of *sseB*, encoding a secreted protein, was selected to investigate the effect of a mutation in the translocon. Deletion of *ssaR* was used to target the basal apparatus component of the needle complex and deletion of *ssrB* was used to evaluate the effect of a mutation in the regulatory system of the SPI-2 T3SS. To confirm that the SPI-2 mutants (*ssaR* and *ssrB*) of *S. Typhi* were non-functional, detection of the SseB protein in the wild-type

strain and SPI-2 mutants was monitored by using SPI-2-inducing conditions and anti-SseB antibodies. As expected, SseB was secreted in the culture supernatant of the wild-type strain, but not in the supernatant of the SPI-2 mutants (Fig. 1). In the bacterial pellet, the SseB protein was only detected in the wild-type and the *ssaR* mutant (Fig. 1). The *sseB* mutant was used as a control for the specificity of the antibody and GroEL was used as a control for bacterial cytoplasm leakage and was not detected in the culture supernatant. The data confirmed that the SPI-2 mutants were non-functional for secretion.

Phenotype of SPI-2 mutants within human macrophages

To evaluate bacterial survival within macrophages, THP-1 macrophages were infected with the wild-type strain and the isogenic SPI-2 mutants were grown at low aeration by using a gentamicin protection assay. The number of bacteria present at different times was determined by c.f.u. counts. Surprisingly, none of the specific deletion mutations in SPI-2-T3SS-encoding genes affected bacterial uptake or survival, as the number of bacteria recovered at different times after infection was similar to that of the wild-type strain (Fig. 2). As there were no differences observed between the different SPI-2 mutants, the *sseB* mutant was selected for further experiments.

The role of *S. Typhi* SPI-2 in survival in human macrophages was then assessed more specifically at different times after infection. *S. Typhi* had already begun to replicate 2 h after infection and continued for up to 3 days after infection (Fig. 3). A growth pattern similar to that for the wild-type strain was observed for the *sseB* mutant (Fig. 3). *S. Typhi* constitutively expressing green fluorescent protein (DEF010) and its *sseB* isogenic mutant (DEF478) were used to visualize bacteria within macrophages by fluorescence microscopy. Initially, many macrophages were infected with a single bacterium or a few bacteria (Fig. 3b). At 24 h post-infection, infected macrophages contained many bacterial clusters, suggesting that the bacteria had replicated (Fig. 3b). Interestingly, the

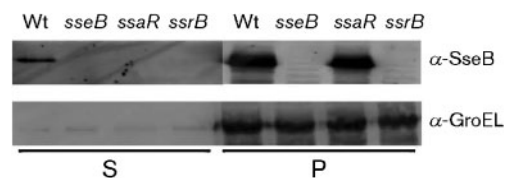


Fig. 1. *In vitro* secretion of SseB in SPI-2 mutants. Wild-type *S. Typhi* ISP1820 strain (Wt), and isogenic *sseB*, *ssaR* and *ssrB* deletion mutant strains were grown under SPI-2-inducing conditions (LPM; pH 5.8). Proteins in the supernatant (S) and bacterial pellet (P) were harvested and examined by Western blotting to detect SseB and GroEL.

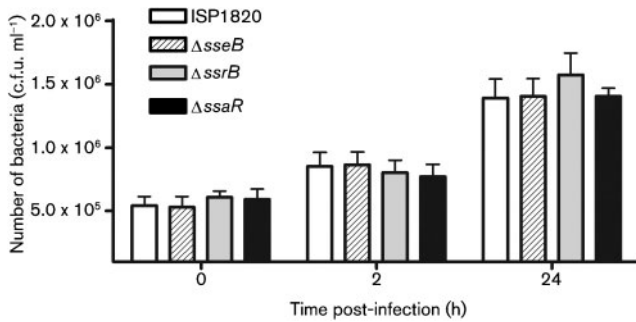


Fig. 2. Effect of mutations in SPI-2 during interactions with human macrophages. THP-1 macrophages were infected with wild-type (ISP1820), *sseB*, *ssaR* or *ssrB* deletion mutant strains and the number of intracellular bacteria were determined at different times after infection. Data presented are the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate.

infected cell monolayer was mainly intact, even 96 h post-infection (Fig. 3b) and only a few cells were detached.

To evaluate the usefulness of our infection model, an isogenic strain carrying a *phoP* deletion, a global transcriptional activator involved in *Salmonella* virulence and intracellular survival within macrophages (Miller *et al.*, 1989), was used as a control. The isogenic *phoP* mutant showed significantly reduced survival (Fig. 4), suggesting that the THP-1 macrophages are efficient for bacterial killing.

We next investigated if the absence of survival defects for an SPI-2 mutant was unique to the *S. Typhi* strain ISP1820. An *sseB* deletion was generated in *S. Typhi* strain Ty2 and no significant difference in intracellular survival between

the wild-type strain and the SPI-2 mutant was observed (Fig. 4). As a positive control, the role of SPI-2 of *S. Typhimurium* in human macrophages was then investigated. An *sseB* mutant of *S. Typhimurium* strain SL1344 was constructed and its contribution to survival in macrophages was evaluated. The *sseB* deletion in *S. Typhimurium* significantly reduced intracellular survival of the SPI-2 mutant in THP-1 macrophages (Fig. 4).

Influence of growth conditions

Salmonella can enter macrophages by several endocytic processes, which can be affected by the bacterial growth conditions prior to infection. Bacteria were grown to late exponential phase under low aeration (static), and were grown to stationary phase with or without opsonization. Regardless of the growth conditions prior to infection, there was no difference between the wild-type and the *sseB* mutant (Fig. 5). The uptake level of bacteria grown in different conditions was also similar. The number of bacteria recovered after 24 h of infection was always higher than the number of bacteria recovered after 2 h (fold increase >1) when bacteria were grown to late exponential phase without agitation (Figs 2–5). However, when *S. Typhi* uptake was investigated by using bacteria grown with shaking to stationary phase, with or without opsonization, a constant number of bacteria between 2 and 24 h after infection (fold increase of $\cong 1$) was observed (Fig. 5).

Activation of macrophages

IFN- γ is a critical cytokine that plays a central role in host defence against intracellular pathogens, including *Salmonella*

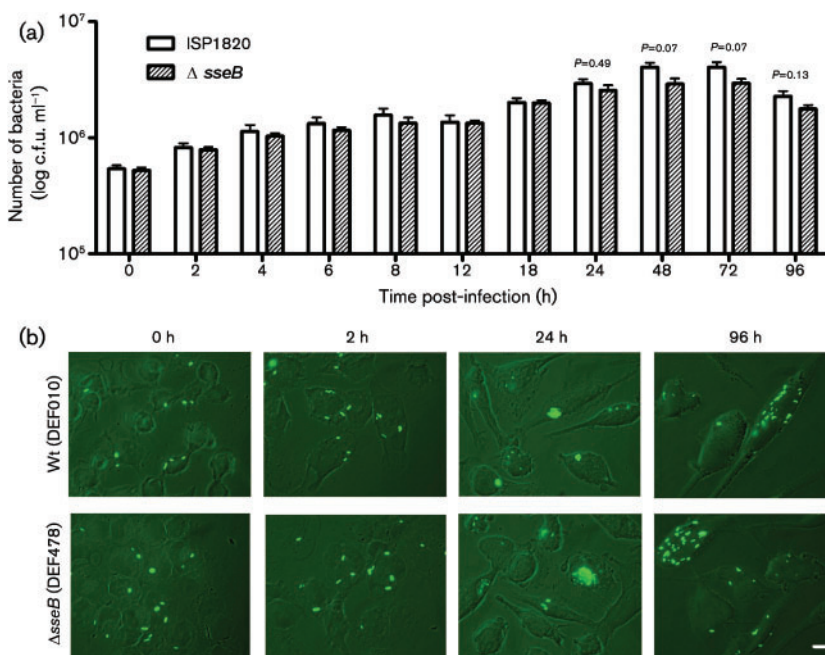


Fig. 3. Time course of *S. Typhi* survival in human macrophages. THP-1 macrophages were infected with *S. Typhi* ISP1820 and its isogenic *sseB* mutant. (a) The number of intracellular bacteria were determined at different times after infection. Data presented are the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. *P*-values are indicated for late time points. (b) Fluorescence microscopy of fixed macrophages at different times after infection with bacteria constitutively expressing the green fluorescent protein (original magnification, $\times 1000$).

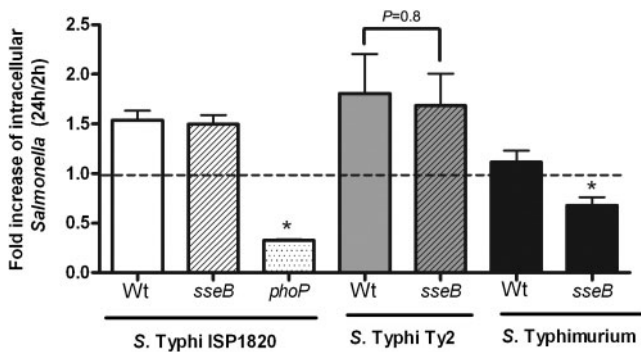


Fig. 4. Role of SPI-2 in intracellular survival in different strains of *Salmonella*. THP-1 macrophages were infected with *S. Typhi* ISP1820 (Wt) and its isogenic *sseB* and *phoP* mutants, *S. Typhi* strain Ty2 and its isogenic *sseB* mutant, and *S. Typhimurium* SL1344 and its isogenic *sseB* mutant. Intracellular survival was determined by comparing the number of bacteria 24 h post-infection with the number of bacteria at 2 h (fold increase). Data presented are the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. Mutants demonstrating a significant ($P < 0.05$) difference compared with the isogenic wild-type strain are indicated (*).

(Muotiala & Mäkelä, 1993; Rosenberg *et al.*, 2002). As *Salmonella* may encounter activated macrophages during its life cycle inside the host, we investigated the role of SPI-2 during infection of activated macrophages. THP-1 macrophages were primed with IFN- γ for 48 h and then infected

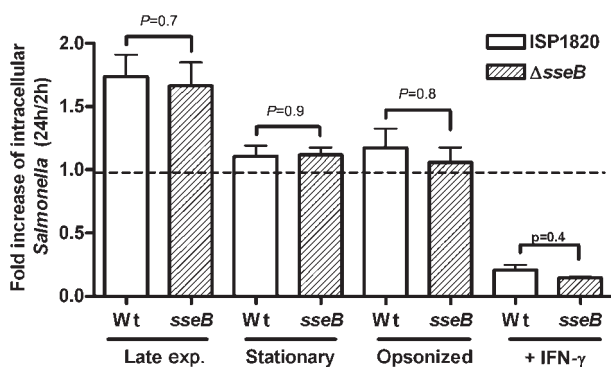


Fig. 5. Effect of growth conditions, opsonization or macrophage activation on intracellular survival of *S. Typhi*. THP-1 macrophages were infected with *S. Typhi* ISP1820 (Wt) and its isogenic *sseB* mutant grown in LB; cultures were overnight static (late exponential growth), overnight shaking (stationary phase) with or without opsonization with human serum (opsonized), or by using activated macrophages primed with IFN- γ . Intracellular survival was determined by comparing the number of bacteria 24 h post-infection with the number of bacteria at 2 h (fold increase). Data presented are the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. Exact P -values are also indicated.

with wild-type *S. Typhi* and its isogenic *sseB* SPI-2 mutant. Following IFN- γ treatment, a small number of bacteria were recovered from macrophages (Fig. 5), although there was no significant difference between the wild-type and the SPI-2 mutant in the IFN- γ -primed macrophages.

Mixed infection assay of human macrophages

Survival of the wild-type strain and its isogenic mutants was evaluated simultaneously by using the CI assay. The CIs for the *sseB* and *phoP* mutants within THP-1 cells after mixed infections with the wild-type strain were 1.19 ($P=0.50$) and 0.27 ($P=0.0048$), respectively. These results are in agreement with our data from individual strains during infection and confirm that SPI-2 does not affect survival in human macrophages and that the PhoPQ regulon is of importance.

Infection of human MDMs

It has been shown that macrophages from immortalized cell lines allow moderate growth of an SPI-2 mutant of *S. Typhimurium* compared with a greater level of growth defect in primary cells (Hensel *et al.*, 1998; Helaine *et al.*, 2010). Human MDMs were infected with the wild-type *S. Typhi* strain and the isogenic *sseB* mutant. The number of bacteria recovered decreased over time, suggesting a defect in survival; however, the number of recovered bacteria was similar for both the wild-type strain and the SPI-2 isogenic mutant (Fig. 6).

Complete deletion of the SPI-2 T3SS

To validate and understand the surprising results obtained with the different SPI-2 mutants, a 25 kb deletion of the entire T3SS (*ssaU-ssrB*) was generated and tested for survival in THP-1 macrophages. Deletion of the T3SS of SPI-2 did not affect bacterial uptake or survival, as the

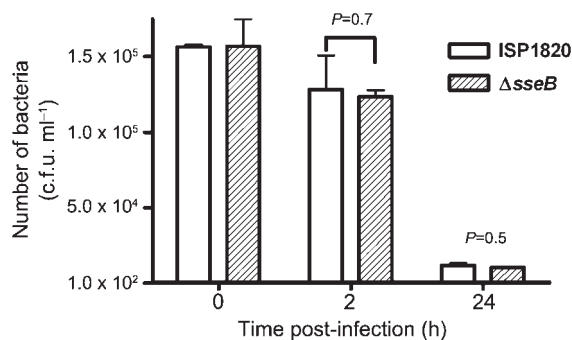


Fig. 6. Role of *S. Typhi* SPI-2 in human MDMs. Cells were infected with *S. Typhi* ISP1820 and its isogenic *sseB* mutant and intracellular bacteria were determined at different times after infection. Representative mean \pm SEM of a duplicate MDM experiment from a single donor are shown. P -values are indicated.

number of bacteria recovered at different times after infection was similar to that of the wild-type strain (Fig. 7).

DISCUSSION

As the ability to survive and replicate inside macrophages is tightly associated with the *S. Typhimurium* SPI-2 T3SS and with virulence (Fields *et al.*, 1986), and since very little information regarding the involvement of *S. Typhi* SPI-2 T3SS in this process is available, the role of the *S. Typhi* SPI-2 T3SS inside human macrophages was investigated. Mutants corresponding to specific components of the secretion system were tested for intracellular survival, including a translocon mutant (*sseB*), an apparatus mutant (*ssaR*) and a transcriptional regulator mutant (*ssrB*), the last of these being required for expression of SPI-2 genes. These SPI-2 mutants were previously shown to be defective in intracellular replication of *S. Typhimurium* (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998). Moreover, any mutations in *SseB* lead to structural alterations that abolish translocon function, resulting in replication defects in macrophages (Hölzer & Hensel, 2010). *SseB* was not secreted in the *ssaR* and *ssrB* mutants, confirming that the SPI-2 T3SS is not functional (Fig. 1). Surprisingly, mutations in either *sseB* (translocon), *ssaR* (basal component) or *ssrB* (regulator), all of which abrogate SPI-2 T3SS function or expression, did not affect *S. Typhi* uptake and survival in human cells. Similar results were obtained during competition assays, when the entire SPI-2 T3SS (Δ *ssaU-ssrB*) was deleted (Fig. 7), or when macrophages derived from human monocytic cells were used (Fig. 6), confirming that intracellular survival of *S. Typhi* inside human macrophages is independent of the SPI-2 T3SS. The number of intracellular bacteria corresponding to the *sseB* SPI-2 mutant increased inside macrophages with a pattern

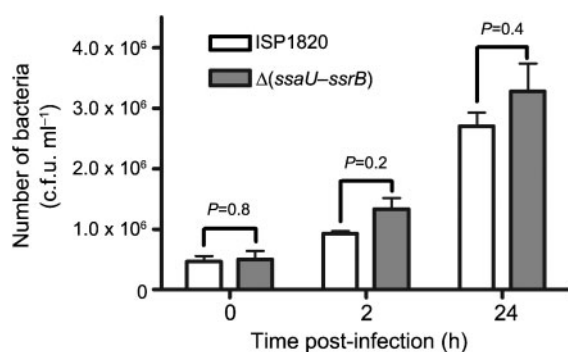


Fig. 7. Effect of complete deletion of the SPI-2 T3SS locus in *S. Typhi* during interactions with human macrophages. THP-1 macrophages were infected with the wild-type (ISP1820) and its isogenic mutant harbouring a complete deletion of the SPI-2 T3SS (*ssaU-ssrB*) and intracellular bacteria were determined at different times after infection. Data presented are the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. *P*-values are indicated.

similar to that of the wild-type strain (Fig. 3). Despite not demonstrating a key role for intracellular survival, the SPI-2 genes of *S. Typhi* are highly induced inside human macrophages (Faucher *et al.*, 2006), suggesting that the difference may not be at the transcriptional level.

Moreover, no defect in survival was observed for an *sseB* SPI-2 mutant of *S. Typhi* strain Ty2, suggesting that the absence of a phenotype for an SPI-2 mutation in *S. Typhi* was not strain-specific (Fig. 4). However, a *phoP* mutant of *S. Typhi* known to be involved in intracellular replication of *S. Typhimurium* (Groisman *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989) was defective in this model, as was an *sseB* mutant of *S. Typhimurium* (Fig. 4).

As bacterial growth conditions and opsonization affect uptake and have a significant influence on bacterial survival, replication and virulence gene expression in *S. Typhimurium* (Hensel *et al.*, 1997, 1998; Drecktrah *et al.*, 2006), we investigated the influence of growth condition on *S. Typhi* survival in macrophages. Growth to late exponential phase under low aeration promotes SPI-1 expression and T3SS-mediated invasion of *S. Typhimurium* (Lee *et al.*, 1992), while aerated stationary phase bacterial cultures or opsonization promote phagocytosis and low cytotoxicity (Hensel *et al.*, 1998; Lundberg *et al.*, 1999; Drecktrah *et al.*, 2006). Aerated stationary phase or opsonized bacteria are then usually used to study the effect of SPI-2 mutants, as the replication defect of *S. Typhimurium* is overemphasized (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998; see also Fig. 5). Under all of these conditions, *S. Typhi* survived and no differences were observed between the wild-type strain and the *sseB* SPI-2 mutant (Fig. 5). Moreover, there was no significant difference observed in the uptake levels of *S. Typhi* between the different growth conditions or with or without opsonization. The presence of the Vi capsule, specific to *S. Typhi*, may be responsible for the lack of difference in bacterial uptake under different growth conditions. Interestingly, an increase in the number of bacteria recovered 24 h post-infection (ratio at 24 h:2 h >1) was only observed when *S. Typhi* was grown to late exponential phase. It will be interesting to investigate further the mechanisms of entry in macrophages of *S. Typhi*, as they may be related to its survival.

Activated macrophages play a central role in host defence and have been shown to increase phagocytic and killing activities. Survival of *S. Typhi* in human macrophages primed with IFN- γ was greatly reduced, but no significant difference was observed between the wild-type and the SPI-2 mutant. Similarly, no differences between the wild-type and the SPI-2 mutant were observed during survival in whole human blood (data not shown) or in invasion and survival of human epithelial cells (data not shown). It is possible that SPI-2 effectors may be translocated by the SPI-1 T3SS when the SPI-2 T3SS is mutated, but a double SPI-1 (*invA*)/SPI-2 (*ssaR*) mutant in *S. Typhi* survives and replicates to a level similar to that of the isogenic wild-type strain in THP-1 macrophages (data not shown). Thus, in

contrast with *S. Typhimurium*, the SPI-2 T3SS of *S. Typhi* is not critical for intracellular survival in human macrophages.

S. Typhimurium and *S. Typhi* are closely related serovars, sharing 90 % of their DNA (McClelland *et al.*, 2001). There are no major genomic differences between the SPI-2 T3SS of *S. Typhimurium* and *S. Typhi* that may explain these phenotypic differences (Sabbagh *et al.*, 2010). Phylogenetic analyses suggest a probable difference in functionality between these serovars, as variations in translocon genes *sseC* and *sseD* and in effectors *sseF* and *sifA* were observed (Eswarappa *et al.*, 2008). The major difference between these serovars seems to be in the diversity of the effector contents, which may contribute to host adaptation. Many SPI-2 effectors characterized in *S. Typhimurium* are missing in *S. Typhi* (*sseI*, *gogB*, *spvB*, *spvC*, *sseK1*, *sseK2* and *sseK3*) or are pseudogenes (*sopD2* and *sseJ*). Several of these effectors mediate long-term systemic infection in mice (Lawley *et al.*, 2006; McLaughlin *et al.*, 2009; Ruiz-Albert *et al.*, 2002). As some effectors are not present in *S. Typhi*, this emphasizes that there are differences in the virulence mechanisms responsible for systemic disease caused by *S. Typhimurium* in susceptible mice compared with those dictating systemic disease caused by *S. Typhi* in humans. The majority of the studies on maturation and trafficking of *S. Typhimurium* effectors were performed with epithelial cells, and when macrophages were used, they were usually of murine origin. Thus, it is premature to determine or hypothesise whether the absence of a survival defect is related to a difference in the cell type and/or the host source or to a genetic difference between *S. Typhi* and *S. Typhimurium*.

It is thus possible that the host plays an essential role and may be able to discriminate between these serovars. Indeed, mutations in homologous genes that attenuate *S. Typhimurium* in mice have given different results for *S. Typhi* when administered to humans as a potential vaccine (Garmory *et al.*, 2002). Moreover, differences in survival in human macrophages between the two serovars were previously observed, with a higher rate of survival for *S. Typhi* (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994; Ishibashi & Arai, 1995; Schwan *et al.*, 2000), similar to what we observed here. This may be because *S. Typhi* is less cytotoxic for human cells (Schwan *et al.*, 2000; Fig. 3 and data not shown). *S. Typhi* increases rapidly and no lag phase is observed in THP-1 macrophages (Figs 2, 3 and 7). Differential survival between these serovars was also detected in susceptible mice, where *S. Typhi* was rapidly eliminated (Xu *et al.*, 2009). The use of *S. Typhimurium* in mice as a surrogate for *S. Typhi* in humans has many real advantages but may also be misleading.

As SPI-2 is present in *S. Typhi*, it is unlikely that there is no evolutionary advantage in carrying it. It could be used during infection of other cell types, such as dendritic or natural killer cells. The SPI-2 T3SS may be critical when the bacteria are in a specific human niche with high

immunological cell content, such as the spleen. The SPI-2 T3SS may be required to modulate the host immune system to establish long-term asymptomatic infection, which will not necessarily translate into defects in intracellular survival. Further investigation is needed to clarify the role of the *S. Typhi* SPI-2 T3SS in human cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to R. Romieu-Mourez for primary human macrophage preparations and C. Lepage for technical assistance. We thank C. M. Dozois, S. P. Faucher and the members of the Daigle laboratory for critical reading of this manuscript. This research was supported by the Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) grant number 251114-06. C.G.F. and S.C.S. were supported by a scholarship from the NSERC.

REFERENCES

- Alpuche-Aranda, C. M., Racoosin, E., Swanson, J. & Miller, S. (1994). *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* **179**, 601–608.
- Baron-Bodo, V., Doceur, P., Lefebvre, M., Labroquère, K., Defaye, C., Cambouris, C., Prigent, D., Salcedo, M., Boyer, A. & Nardin, A. (2005). Anti-tumor properties of human-activated macrophages produced in large scale for clinical application. *Immunobiology* **210**, 267–277.
- Basso, H., Rharbaoui, F., Staendner, L. H., Medina, E., Garcia-Del Portillo, F. & Guzman, C. A. (2002). Characterization of a novel intracellularly activated gene from *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* **70**, 5404–5411.
- Beuzón, C. R., Salcedo, S. & Holden, D. (2002). Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *sifA* mutant strain in the cytosol of different host cell lines. *Microbiology* **148**, 2705–2715.
- Brumell, J. H., Rosenberger, C., Gotto, G., Marcus, S. & Finlay, B. (2001). *SifA* permits survival and replication of *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Cell Microbiol* **3**, 75–84.
- Chakravorty, D., Rohde, M., Jäger, L., Deiwick, J. & Hensel, M. (2005). Formation of a novel surface structure encoded by *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *EMBO J* **24**, 2043–2052.
- Chan, K., Kim, C. C. & Falkow, S. (2005). Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect Immun* **73**, 5438–5449.
- Cheminay, C., Möhlenbrink, A. & Hensel, M. (2005). Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* **174**, 2892–2899.
- Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M. & Falkow, S. (1998). Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* **30**, 175–188.
- Coombes, B. K., Brown, N., Valdez, Y., Brumell, J. & Finlay, B. (2004). Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* **279**, 49804–49815.
- Coombes, B. K., Lowden, M., Bishop, J., Wickham, M., Brown, N., Duong, N., Osborne, S., Gal-Mor, O. & Finlay, B. (2007). SseL is a *Salmonella*-specific translocated effector integrated into the SsrB-controlled *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Infect Immun* **75**, 574–580.

- Daigle, F., Graham, J. E. & Curtiss, R., III (2001). Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol Microbiol* **41**, 1211–1222.
- Drecktrah, D., Knodler, L. A., Ireland, R. & Steele-Mortimer, O. (2006). The mechanism of *Salmonella* entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic* **7**, 39–51.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. & Hinton, J. C. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**, 103–118.
- Eswarappa, S. M., Janice, J., Nagarajan, A. G., Balasundaram, S. V., Karnam, G., Dixit, N. M. & Chakravorty, D. (2008). Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*. *PLoS ONE* **3**, e3829.
- Faucher, S. P., Porwollik, S., Dozois, C. M., McClelland, M. & Daigle, F. (2006). Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1906–1911.
- Faucher, S. P., Forest, C., Béland, M. & Daigle, F. (2009). A novel PhoP-regulated locus encoding the cytolysin ClyA and the secreted invasin TaiA of *Salmonella enterica* serovar Typhi is involved in virulence. *Microbiology* **155**, 477–488.
- Fields, P. I., Swanson, R., Haidaris, C. & Heffron, F. (1986). Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5189–5193.
- Galán, J. E. & Curtiss, R., III (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6383–6387.
- Garmory, H. S., Brown, K. & Titball, R. (2002). *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 339–353.
- Garvis, S. G., Beuzón, C. & Holden, D. (2001). A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages. *Cell Microbiol* **3**, 731–744.
- Goubau, D., Romieu-Mourez, R., Solis, M., Hernandez, E., Mespl ede, T., Lin, R., Leaman, D. & Hiscott, J. (2009). Transcriptional re-programming of primary macrophages reveals distinct apoptotic and anti-tumoral functions of IRF-3 and IRF-7. *Eur J Immunol* **39**, 527–540.
- Groisman, E. A., Chiao, E., Lipps, C. & Heffron, F. (1989). *Salmonella typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7077–7081.
- Gulig, P. A. & Curtiss, R., III (1987). Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **55**, 2891–2901.
- Halici, S., Zenk, S., Jantsch, J. & Hensel, M. (2008). Functional analysis of the *Salmonella* pathogenicity island 2-mediated inhibition of antigen presentation in dendritic cells. *Infect Immun* **76**, 4924–4933.
- Haraga, A., Ohlson, M. & Miller, S. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**, 53–66.
- Helaine, S., Thompson, J., Watson, K., Liu, M., Boyle, C. & Holden, D. (2010). Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3746–3751.
- Hensel, M., Shea, J., Bäumler, A., Gleeson, C., Blattner, F. & Holden, D. (1997). Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **179**, 1105–1111.
- Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F. C. & Holden, D. W. (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* **30**, 163–174.
- H olzer, S. U. & Hensel, M. (2010). Functional dissection of translocan proteins of the *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system. *BMC Microbiol* **10**, 104.
- Hone, D. M., Harris, A., Chatfield, S., Dougan, G. & Levine, M. (1991). Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* **9**, 810–816.
- Ishibashi, Y. & Arai, T. (1995). *Salmonella typhi* does not inhibit phagosome-lysosome fusion in human monocyte-derived macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **12**, 55–61.
- Kaniga, K., Compton, M. S., Curtiss, R., III & Sundaram, P. (1998). Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* **66**, 5599–5606.
- Kuhle, V. & Hensel, M. (2002). SseF and SseG are translocated effectors of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 that modulate aggregation of endosomal compartments. *Cell Microbiol* **4**, 813–824.
- Kuhle, V. & Hensel, M. (2004). Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2812–2826.
- Lawley, T. D., Chan, K., Thompson, L. J., Kim, C. C., Govoni, G. R. & Monack, D. M. (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* **2**, e11.
- Lee, C. A., Jones, B. D. & Falkow, S. (1992). Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1847–1851.
- Leung, K. Y. & Finlay, B. (1991). Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11470–11474.
- Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., von Gabain, A. & Baccarini, M. (1999). Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* **181**, 3433–3437.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M. & other authors (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852–856.
- McLaughlin, L. M., Govoni, G., Gerke, C., Gopinath, S., Peng, K., Laidlaw, G., Chien, Y. H., Jeong, H. W., Li, Z. & other authors (2009). The *Salmonella* SPI2 effector SseI mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration. *PLoS Pathog* **5**, e1000671.
- Miller, S. I., Kukral, A. & Mekalanos, J. (1989). A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5054–5058.
- Monack, D. M., Detweiler, C. & Falkow, S. (2001). *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine protease caspase-1. *Cell Microbiol* **3**, 825–837.
- Muotiala, A. & Mäkelä, P. (1993). Role of gamma interferon in late stages of murine salmonellosis. *Infect Immun* **61**, 4248–4253.
- Nikolaus, T., Deiwick, J., Rappl, C., Freeman, J., Schröder, W., Miller, S. & Hensel, M. (2001). SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 and function as a translocan. *J Bacteriol* **183**, 6036–6045.
- Ochman, H., Soncini, F., Solomon, F. & Groisman, E. (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7800–7804.

- Paesold, G., Guiney, D., Eckmann, L. & Kagnoff, M. (2002).** Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* **4**, 771–781.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K. L., Bentley, S. D. & other authors (2001).** Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848–852.
- Pfeifer, C. G., Marcus, S., Steele-Mortimer, O., Knodler, L. & Finlay, B. (1999).** *Salmonella typhimurium* virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. *Infect Immun* **67**, 5690–5698.
- Romieu-Mourez, R., Solis, M., Nardin, A., Goubau, D., Baron-Bodo, V., Lin, R., Massie, B., Salcedo, M. & Hiscott, J. (2006).** Distinct roles for IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in the activation of antitumor properties of human macrophages. *Cancer Res* **66**, 10576–10585.
- Rosenberg, S. A., Spiess, P. & Kleiner, D. (2002).** Antitumor effects in mice of the intravenous injection of attenuated *Salmonella typhimurium*. *J Immunother* **25**, 218–225.
- Ruiz-Albert, J., Yu, X., Beuzón, C., Blakey, A., Galyov, E. & Holden, D. (2002).** Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Mol Microbiol* **44**, 645–661.
- Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., Leclerc, J. M. & Daigle, F. (2010).** So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 1–13.
- Santiviago, C. A., Reynolds, M., Porwollik, S., Choi, S., Long, F., Andrews-Polymenis, H. & McClelland, M. (2009).** Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLoS Pathog* **5**, e1000477.
- Schwan, W. R., Huang, X. Z., Hu, L. & Kopecko, D. J. (2000).** Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun* **68**, 1005–1013.
- Segura, I., Casadesús, J. & Ramos-Morales, F. (2004).** Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *J Microbiol Methods* **56**, 83–91.
- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C. & Holden, D. W. (1996).** Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2593–2597.
- Shea, J. E., Beuzon, C., Gleeson, C., Mundy, R. & Holden, D. (1999).** Influence of the *Salmonella typhimurium* pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. *Infect Immun* **67**, 213–219.
- Srinivasan, J., Tinge, S., Wright, R., Herr, J. & Curtiss, R., III (1995).** Oral immunization with attenuated *Salmonella* expressing human sperm antigen induces antibodies in serum and the reproductive tract. *Biol Reprod* **53**, 462–471.
- Tobar, J. A., Carreño, L., Bueno, S., González, P., Mora, J., Quezada, S. & Kalgis, A. (2006).** Virulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium evades adaptive immunity by preventing dendritic cells from activating T cells. *Infect Immun* **74**, 6438–6448.
- Uchiya, K., Groisman, E. & Nikai, T. (2004).** Involvement of *Salmonella* pathogenicity island 2 in the up-regulation of interleukin-10 expression in macrophages: role of protein kinase A signal pathway. *Infect Immun* **72**, 1964–1973.
- Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1997).** Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* **277**, 2007–2011.
- Waterman, S. R. & Holden, D. (2003).** Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* **5**, 501–511.
- Xu, T., Maloy, S. & McGuire, K. (2009).** Macrophages influence *Salmonella* host-specificity in vivo. *Microb Pathog* **47**, 212–222.
- Yu, X. J., Liu, M. & Holden, D. (2004).** SsaM and SpiC interact and regulate secretion of *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system effectors and translocators. *Mol Microbiol* **54**, 604–619.

Edited by: P. H. Everest

