

Université de Montréal

**Caractérisation du système d'acquisition de fer codé  
par le locus *iro* chez *Salmonella enterica* sérovar  
Typhi**

par

Marilyne Bouchard

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Microbiologie et Immunologie

Juin 2013

© Marilyne Bouchard, 2013



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation du système d'acquisition de fer codé par le locus *iro* chez  
*Salmonella enterica* sérovar Typhi

Présenté par :  
Marilyne Bouchard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr George Szatmari,  
Président-rapporteur

Dre France Daigle,  
Directrice de recherche

Dr Charles M. Dozois  
Co-directeur de recherche

Dr Mario Jacques,  
Membre du jury



## Résumé

Le fer est un élément essentiel pour les bactéries. Puisqu'elles ne peuvent le synthétiser elles-mêmes, elles utilisent un ou plusieurs systèmes d'acquisition de fer afin de se le procurer dans l'environnement, ou chez l'hôte pour leurs propres métabolismes. Différentes stratégies coexistent chez les bactéries pathogènes dues à la faible concentration de cet élément, autant chez l'hôte que dans l'environnement. *Salmonella enterica* sérovar Typhi (*S. Typhi*) est une entérobactérie Gram négative causant une maladie systémique, soit la fièvre typhoïde, qui est spécifique à l'homme. Les mécanismes de pathogénèse de ce sérovar sont peu connus jusqu'à ce jour, puisque son tropisme pour l'humain empêche l'utilisation d'un modèle animal adéquat. L'objectif de cette recherche est de caractériser le système d'acquisition de fer chez *S. Typhi* encodé par le locus *iro*. Les gènes du locus, *iroBCDEN* ont fait l'objet de plusieurs recherches chez différents pathogènes, notamment *E. coli* et *Salmonella* Typhimurium. Bien qu'un rôle dans la virulence ait été établi pour ce locus chez ces bactéries, très peu d'informations sont disponibles quant au rôle chez *S. Typhi*, qui emprunte plutôt la voie systémique d'infection.

Nous avons évalué le rôle de la synthèse, de l'exportation et de l'importation du sidérophore salmochéline, codé par les gènes *iroBCDEN*. En inactivant le locus puis par la suite les gènes de façon indépendante par échange allélique, il a été possible d'observer leurs implications *in vitro* lors d'infections de cellules humaines. Le rôle dans l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales ainsi que le rôle dans la phagocytose et la survie dans les macrophages ont donc été déterminés. De plus, le

mécanisme de sécrétion par lequel la salmochéline peut traverser la membrane externe est inconnu à ce jour. La pompe à efflux TolC est responsable de la sécrétion de plusieurs molécules, y compris l'entérobactine, un sidérophore analogue à la salmochéline. Par mutagénèse, nous avons effectué un mutant de délétion *tolC* afin de vérifier son implication dans l'interaction avec les cellules épithéliales et les macrophages. Afin de caractériser *in vitro* les mutants, nous avons effectué des courbes de croissance dans différents milieux. La sensibilité au peroxyde d'hydrogène a été vérifiée par la suite, puis dû aux résultats d'infections, la mobilité de la souche  $\Delta tolC$  a été évaluée. Ces différents tests nous ont permis de mieux comprendre l'implication du locus *iro*, de ses composantes et de la pompe à efflux TolC lors de l'interaction avec les cellules cibles d'une infection systémique causée par *Salmonella Typhi*.

**Mots-clés :** *Salmonella enterica* sérovar Typhi, fer, sidérophore, salmochéline

## Abstract

Iron is an essential element for most bacteria. Since they are unable to synthesize it themselves, bacteria have developed systems to acquire iron from the environment or from host, for their own metabolic needs. Different strategies coexist in the same pathogen as a result of the low iron concentration available in the environment and in their host. *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) is a Gram negative enteric bacteria that causes a systemic disease called typhoid fever, which is specific to humans. The pathogenic mechanisms of this serovar remain poorly characterized due to its tropism for humans and the lack of an adequate animal model. The objective of this project is to characterize the iron uptake system encoded by the *iro* locus of *S. Typhi*. The *iroBCDEN* genes of this locus are well known in other pathogens, especially in *E. coli* and *Salmonella Typhimurium*. Even if a role in virulence has been established for this locus in several bacteria, it has not been verified in *S. Typhi*, which importantly uses the systemic route of infection.

We evaluated the role of synthesis, export and import of the salmochelin siderophores coded by the *iroBCDEN* genes. Inactivating the whole locus and each individual gene by allelic exchange, provided a means to observe their effects *in vitro* by infecting human cells. The role in adhesion and invasion of epithelial cells and their role in phagocytosis and survival in macrophages were determined. Moreover, the secretion mechanism by which salmochelin siderophores are able to pass through the external membrane is unknown to date. The TolC efflux pump is responsible for secretion of several molecules, including enterobactin, a siderophore related to

salmochelins. By mutagenesis, we created a *tolC* deletion mutant to verify its implication in interactions with epithelial cells and macrophages. To characterize the mutants *in vitro*, we tested their ability to grow in different media. Sensitivity to hydrogen peroxide was verified for all mutants and due to the infection results for  $\Delta tolC$ , we tested the motility of this mutant. These experiments allowed a better understanding of the implication of the *iro* locus, its components and the efflux pump TolC with human host cells that are targeted during systemic infection caused by *Salmonella* Typhi.

**Keywords** : *Salmonella enterica* serovar Typhi, iron, siderophore, salmochelin



# Table des matières

Résumé .....	v
Abstract .....	vii
Table des matières .....	ix
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures .....	xii
Liste des sigles et abréviations.....	xiv
Introduction.....	1
1. <i>Salmonella</i> .....	1
1.1 Généralités sur <i>Salmonella</i> .....	1
1.2. Nomenclature .....	1
1.3. Caractéristiques.....	3
1.4. Infection localisée : <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	4
2. Infection systémique : <i>Salmonella</i> Typhi.....	6
2.1. Distribution et infectiosité de <i>Salmonella</i> Typhi .....	6
2.2. Infection par S. Typhi.....	9
2.3. Détection et traitement.....	15
3. Le fer .....	18
3.1. Le fer, un élément essentiel.....	18
3.2. Acquisition du fer par les bactéries .....	20
3.3. Utilisation thérapeutique du fer .....	22
4. Les sidérophores .....	24
4.1. Généralités sur les sidérophores .....	24
4.2. Les mécanismes d'utilisation des sidérophores.....	27
4.3. L'entérobactine (L'entérochéline) .....	28
4.4. Les Salmochélines .....	35
Problématique et objectifs .....	42
Matériel et méthodes .....	44
1. Souches et plasmides utilisés.....	44
2. Mutagénèse .....	45

3.	Amplification d'ADN par PCR .....	49
4.	Courbes de croissance .....	50
5.	Test de sensibilité au peroxyde d'hydrogène.....	52
6.	Test d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales humaines INT-407.....	52
7.	Test de phagocytose et de survie dans les macrophages humains THP-1 ....	55
8.	Test de mobilité .....	57
Résultats .....		59
1.	Caractérisation <i>in vitro</i> du locus <i>iro</i> et <i>tolC</i> .....	59
1.1.	Courbes de croissance en milieu riche LB.....	59
1.2.	Courbes de croissance en milieu riche LB avec 2,2'-Dipyridyl .....	60
1.3.	Courbes de croissance en milieu RPMI avec fer .....	62
1.4.	Courbes de croissance en milieu RPMI sans fer .....	63
1.5.	Test de sensibilité au peroxyde d'hydrogène.....	64
2.	Adhésion et invasion de cellules épithéliales humaines INT-407.....	65
2.1.	Adhérence aux cellules épithéliales.....	65
2.2.	Invasion des cellules épithéliales.....	68
3.	Phagocytose et survie dans les macrophages humains THP-1 .....	70
3.1.	Phagocytose par les macrophages humains.....	71
3.2.	Survie dans les macrophages humains .....	74
4.	Test de mobilité .....	77
1.	Courbe de croissance en milieu LB.....	80
2.	Courbe de croissance en milieu LB avec 2,2`-Dipyridyl .....	81
3.	Courbe de croissance en milieu RMPI avec et sans fer .....	82
4.	Stress oxydatif.....	82
5.	Adhésion et invasion de cellules épithéliales .....	83
6.	Phagocytose et survie dans les macrophages .....	86
7.	Mobilité.....	91
Conclusion.....		92

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Description des souches et plasmides utilisés dans cette étude. ....	44
--	----

## Liste des figures

Figure 1 : Distribution géographique mondiale des cas de fièvre typhoïde en 2009. ....	7
Figure 2 : Route d'infection de <i>S. Typhi</i> . ....	10
Figure 3 : Structure des trois larges groupes de sidérophores. ....	25
Figure 4 : L'entérobactine, un triester cyclique de 2,3-dihydroxybenzoylserine (DHBS). ....	29
Figure 5 : Les systèmes d'acquisition de fer par l'entérobactine et les salmochélines. ....	32
Figure 6 : Séquestration de l'entérobactine par le lipocalin 2 (Lcn2). ....	34
Figure 7 : Structure génétique du locus <i>iro</i> . ....	36
Figure 8 : Glycosylation de l'entérobactine par IroB. ....	38
Figure 9 : Représentation du gène <i>iroC</i> tronqué. ....	46
Figure 10 : Exemple de construction d'une souche mutante. ....	46
Figure 11 : Courbes de croissance en milieu riche LB. ....	60
Figure 12 : Courbes de croissance en milieu riche LB avec ajout de 2,2'-Dipyridyl. ....	61
Figure 13 : Courbes de croissance en milieu minimal avec ajout de fer. ....	62
Figure 14 : Courbes de croissance en milieu minimal RPMI. ....	63
Figure 15 : Sensibilité au peroxyde d'hydrogène lors de la réponse au stress oxydatif. ....	65
Figure 16 Représentation de l'adhérence aux cellules épithéliales INT-407 en UFC/ml. ....	66
Figure 17 : Taux d'adhérence aux cellules épithéliales INT-407. ....	67
Figure 18 : Représentation de l'invasion des cellules épithéliales INT-407 en UFC/ml. ....	69
Figure 19 Taux d'invasion des cellules épithéliales INT-407. ....	70
Figure 20 : Représentation de la phagocytose dans les macrophages humains THP-1 en UFC/ml. ....	72
Figure 21 : Taux de phagocytose dans les macrophages THP-1. ....	73

<b>Figure 22 : Représentation de la survie dans les macrophages humains THP-1 en UFC/ml.....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 23 : Taux de survie dans les macrophages THP-1..</b>	<b>76</b>
<b>Figure 24 : Mobilité de la souche mutante <math>\Delta to/C</math>.....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 25 : Représentation de la réponse au stress oxydatif .....</b>	<b>ix</b>

## Liste des sigles et abréviations

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Cm	Chloramphénicol
Crp	<i>Cyclic AMP receptor</i>
CT18	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi souche CT18
D.O.	Densité Optique
DAP	acide DL- $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélique
DHB	2,3-dihydroxybenzoyl
DHBS	2,3-Dihydroxybenzoyl-L-sérine
DHB-Ser	N-(2,3-dihydroxybenzoyl)sérine
DGE	<i>Diglucoyl entérobactine</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
ExPEC	<i>Extraintestinal pathogenic E. coli</i>
Fe <sup>2+</sup>	Fer ferreux
Fe <sup>3+</sup>	Fer ferrique
Gm	Gentamycine
Gtf	Glycosyltransférase
LB	Luria-Bertani
Lcn2	Lipocalin-2
LPS	Lipopolysaccharides
MDR	<i>Multi-drug resistance</i>
MGE	<i>Monoglucoyl entérobactine</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
Nal	Acide Nalidixique
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i> ou lipocalin-2
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

PBS-DOC	PBS-acide déoxycholique
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acétate
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<i>S. bongori</i>	<i>Salmonella bongori</i>
<i>S. Typhi</i>	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhimurium
S1	Salmocheline dimérique
S2	Salmochéline trimérique linéaire
S4	Salmochéline cyclique
SCV	<i>Salmonella Containing Vacuole</i>
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i>
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i>
SST3	Système de sécrétion de type 3
SVF	sérum de veau foetal
SX	Salmochéline monomérique (dihydroxybenzoylsérine-glucose)
TAQ	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TGE	<i>Triglucoyl entérobactine</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TY2	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi souche TY2
UDP	Uridine-5-diphosphoglucose
UFC	Unité Formatrice de Colonie

*“People often say that humans have always eaten animals, as if this is a justification for continuing the practice. According to this logic, we should not try to prevent people from murdering other people, since this has also been done since the earliest of times.”*

*— Isaac Bashevis Singer*



## Remerciements

Pour commencer, j'aimerais remercier ma directrice de recherche France Daigle qui m'a accueilli dans son laboratoire d'abord comme stagiaire. Évidemment, c'est impossible de seulement rester 4 mois dans ce laboratoire où l'ambiance et les gens rendent le travail si agréable. Merci pour tes précieux conseils et ton écoute. Tu fais beaucoup attention à nous et ça me fait de la peine de quitter l'équipe.

Je tiens à remercier Jean-Mathieu pour son aide précieuse et sa générosité. Pour ta patience envers ma *playlist* du vendredi et les fois où j'ai mélangé le café et le chocolat, je n'ai pas le choix de te remercier! Tu es une personne positive et souriante qui me fait beaucoup rire, surtout ne change pas. Merci à Sébastien qui est toujours prêt à m'aider et à me donner de bons conseils. Je ne crois pas connaître quelqu'un d'aussi généreux que toi. J'ai aimé parler restos et musique avec toi et te rendre fou avec deux groupes de musique dont-on-ne-doit-pas-prononcer-le-nom. Merci à Christine tout simplement d'égayer toutes mes journées, car elles ont toutes commencé par ton « ALLO » enjoué et enthousiaste. Travailler à tes côtés a été très agréable et ton sourire est contagieux. Merci à Jessica, avec qui j'ai partagé ma passion pour le café, les sucreries et les animaux. Tu es une bonne personne. Merci à Olivier d'avoir apporté un peu de fantaisie dans le laboratoire, les gens entours de toi ne s'ennuieront jamais en ta présence!

Merci Tristan de m'avoir aidé, très tôt le matin ou tard le soir. Je suis chanceuse de t'avoir à mes côtés, autant comme ami qu'amoureux. Ta positivité est inspirante et te mènera loin. Tu es une personne qui gagne à être connu et qui fait

très attention aux gens proches de toi. Merci d'avoir été mon partenaire de fontaine à chaque fois que ma bouteille d'eau était vide. Toi et Maxime m'avez fait beaucoup rire et votre belle chimie est unique!

Je souhaite remercier ma sœur, Carolynne et mes parents, Suzie et François. Je vous ai tellement cassé la tête avec le fer que vous auriez pu présenter mon projet lors des séminaires. Merci de vos encouragements et de m'avoir soutenu. Caro tu es remplie de charisme et je ne m'en fais pas du tout pour toi. Bien que la microbiologie soit seulement passagère dans tes études, au moins quelqu'un comprend que je radote à propos des sidérophores. Merci beaucoup à vous trois, je vous aime énormément.

J'aimerais finalement remercier les membres du jury d'examen de ce mémoire Dr. George Szatmari, Dr. Charles Dozois et Dr. Mario Jacques. Vos connaissances, votre expertise et vos recommandations seront très importantes à mes yeux.

# Introduction

## 1. *Salmonella*

### 1.1 Généralités sur *Salmonella*

Le genre *Salmonella* a été découvert en 1884 après avoir été isolé d'un intestin de porc par le bactériologiste américain Daniel Elmer Salmon (1, 2). Quelques années plus tard, dans les années 1890, le nom *Salmonella* fut attribué au microorganisme en l'honneur du chercheur. Ce bacille à paroi Gram négatif fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* (3). On retrouve la plupart des salmonelles dans le tractus intestinal des animaux qu'elles infectent. Le genre *Salmonella* partage un bon nombre de caractéristiques communes avec l'entérobactérie la plus étudiée et la plus connue, soit *Escherichia coli* (4). *Salmonella* aurait évolué en tant que pathogène intracellulaire après s'être éloignée de l'ancêtre commun qu'elle partageait avec *E. coli* il y a de cela environ 100 à 150 millions d'années (5). L'ADN génomique de ces deux entérobactéries partage environ 80% d'homologie, représentant un certain avantage en recherche.

### 1.2. Nomenclature

La nomenclature des salmonelles a beaucoup changé et évolué depuis le début de sa classification. Ce fut tout d'abord à l'aide des symptômes rencontrés

chez l'hôte lors d'une infection puis par la suite par l'endroit où les souches ont été découvertes que la classification se basait. Suite à de longues années où un consensus ne pouvait se faire, la classification « Kauffman and White » a été établie. Ce système classe le genre *Salmonella* en plus de 2 600 différents sérovars en se basant sur les antigènes exprimés à la surface de la bactérie (3). Trois antigènes divisent les sérovars, soit l'antigène O, H et Vi, qui représentent respectivement les structures de lipopolysaccharides (LPS), les flagelles et la capsule d'exopolysaccharides (6). Bien que la classification se base sur le sérotypage des souches, les termes «sérotype » et « sérovar » étaient tous deux utilisés selon le code de la Nomenclature Bactérienne établie par le « Judicial Commission of the International Committee on the Systematics of Prokaryotes » (1). À ce jour, seulement le terme « sérovar » est utilisé.

Le genre *Salmonella* se divise en deux espèces bien distinctes, soit *S. bongori* et *S. enterica*. C'est surtout l'îlot de pathogénicité 2 (SPI-2) qui sépare ces deux espèces et les rend si divergentes. Lors de cette divergence, une grande quantité d'ADN a été acquise par des transferts de gènes horizontaux par des plasmides ou des phages (7). Ces transferts de gènes ont un rôle important dans la diversité des salmonelles (8). Une des deux espèces, *Salmonella bongori*, regroupe 22 sérovars (1) étant typiquement des bactéries commensales des invertébrés au sang-froid (9), alors que *S. enterica* est divisée en 6 sous-espèces qui représentent plus de 2520 sérovars (1). L'une de ses sous-espèces, *Salmonella enterica enterica*, est la plus fréquente et rassemble la majorité des souches qui causent des infections chez l'homme.

### 1.3. Caractéristiques

Les salmonelles sont des bactéries principalement prototrophes car elles peuvent synthétiser la majorité des composés organiques nécessaires à leur croissance (3). Elles doivent donc se procurer des nutriments du milieu environnant. Ses besoins nutritifs sont assez simples (10). Les métaux requis chez *Salmonella* sont le zinc, un élément important pour la formation de cofacteurs, le fer afin de supporter la croissance et la survie, ainsi que le manganèse, nécessaire pour les mécanismes de virulence de la bactérie (11). Le genre *Salmonella* est un anaérobie facultatif possédant la capacité de fermenter le glucose, mais est incapable de fermenter le sucrose ou le lactose. Ce sont des bactéries considérées neutrophiles puisqu'elles poussent à un pH optimal entre 6 et 7, mais elles ont la capacité de croître entre des pH allant de 4 à 9 (12). Elles sont aussi mésophiles, car la température de croissance optimale est à 37°C, mais elles tolèrent des variations de température allant de 7 à 48°C (12).

*S. enterica* se divise en trois catégories selon l'hôte chez lequel la maladie est causée. La bactérie peut infecter un hôte spécifique, elle peut être adaptée à un hôte, mais être en mesure d'infecter d'autres types d'organismes ou alors elle peut tout simplement infecter de façon générale plusieurs hôtes. Dans le dernier cas, la maladie causée par le pathogène varie énormément d'un hôte à l'autre (12). La sous-espèce *S. enterica enterica* est responsable de 99% des maladies à salmonelles, nommées salmonelloses, chez les animaux à sang chaud (5). Les salmonelloses sont des infections qui excluent les sérovars Typhi et Paratyphi qui causent la fièvre

typhoïde, une infection systémique létale. Selon le sérovar, deux types de maladies sont causées; une maladie localisée résultant en une gastroentérite ou une maladie systémique connue sous le nom de fièvre typhoïde.

#### **1.4. Infection localisée : *Salmonella* Typhimurium**

L'étendue de la distribution du sérovar *S. Typhimurium* est au niveau mondial. Bien qu'il cause une gastroentérite, ce n'est pas une maladie de type voyageur. C'est plutôt en Amérique du Nord et en Europe que les cas sont plus courants (3). Au Canada, *S. Typhimurium* est le sérovar le plus fréquemment rencontré dans les cas de salmonelloses et à chaque année aux États-Unis, 2 à 3 millions de cas surviennent (3). Ce type de salmonellose infecte surtout les jeunes enfants et les nourrissons. Ce sérovar infecte les humains, mais les animaux servent de réservoir, ce qui multiplie les façons de contracter cette maladie.

On retrouve trois modes de transmissions. Tout d'abord, un contact direct avec l'animal infecté, par exemple un animal de compagnie, induit la maladie. Il est aussi possible de contracter la maladie par un contact indirect, par exemple l'ingestion de nourriture qui a été contaminée, ou alors par l'intermédiaire d'un vecteur (3). L'incubation dure environ de 12 à 36 heures, mais peut varier de 6 à 72 heures selon l'hôte (1). Des signes de la maladie apparaissent, tels des douleurs abdominales, des vomissements, de la fièvre, de la diarrhée et parfois même du sang dans les selles (13). Ces symptômes persistent de 3 à 5 jours puis la bactérie est normalement éliminée par le système immunitaire sans prise d'antibiotiques. Néanmoins, bien que

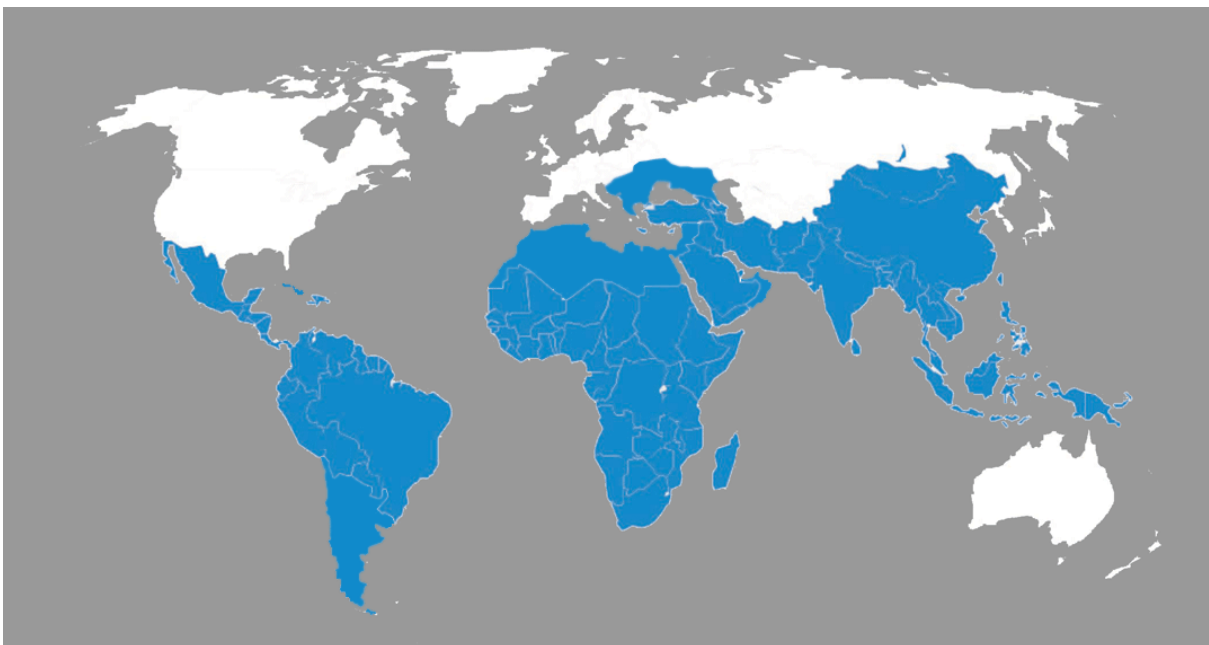
la bactérie ne puisse normalement pénétrer l'épithélium intestinal, des hôtes affaiblis ou immunosupprimés permettent ce passage (14). Ces bactéries sont alors en mesure de produire une maladie systémique similaire à la fièvre typhoïde. Lorsque des complications surviennent, la prise d'antibiotiques est nécessaire.

## **2. Infection systémique : *Salmonella* Typhi**

### **2.1. Distribution et infectiosité de *Salmonella* Typhi**

Contrairement aux salmonelloses, ce sérovar se retrouve majoritairement dans les pays en voie de développement. On le retrouve en grande partie dans le sous-continent Indien, en Asie du Sud Est et en Afrique (3) (Figure 1). *Salmonella* Typhi se différencie aussi par rapport aux salmonelloses du fait que c'est plutôt une infection contractée lors de voyages dans ces pays endémiques. En effet, cette maladie est assez sporadique dans les pays développés, puisque la source provient des voyageurs qui sont revenus de leur périple. Sur 100 000 voyageurs, on retrouve de 3 à 30 cas de fièvre typhoïde (15). Mondialement, 22 millions de nouveaux cas de fièvre typhoïde émergent par année avec environ 200 000 morts (16).





**Figure 1 : Distribution géographique mondiale des cas de fièvre typhoïde en 2009.** Les zones bleues sont des zones endémiques de la maladie. (2009, WHO)

Comme la plupart des maladies rencontrées dans les pays en voie de développement, la fièvre typhoïde est associée à une pauvre hygiène et un manque d'installations sanitaires importants (3). Dans les régions endémiques, la bactérie se contracte par l'eau et la nourriture contaminée (17). Cette contamination provient d'une transmission orale fécale (18), donc à partir de l'eau et des aliments qui ont été souillés par les selles d'une personne infectée. La propagation orale fécale de la bactérie est un problème important, car la contamination se fait aussi par des porteurs asymptomatiques et de patients qui ont survécu à la fièvre typhoïde, mais qui sécrètent encore le pathogène dans leurs selles (18).

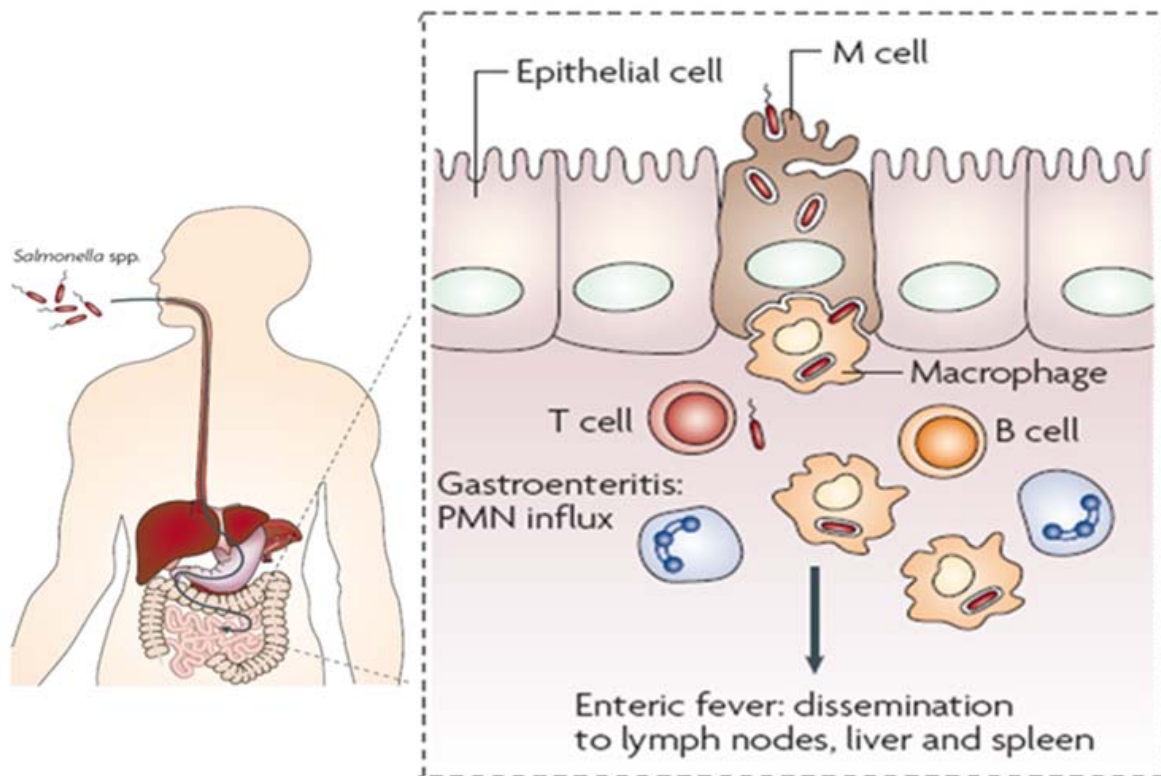
Bien que la propagation soit une complication importante, la bactérie ne possède aucun réservoir animal. Ce sérovar n'infecte que les humains et ne colonise

pas les animaux, donc c'est seulement une transmission d'humain à humain (3). Cette incapacité de zoonose est un grand avantage pour l'humain, mais un obstacle redoutable pour la recherche. Cette adaptation stricte à l'humain comme seul hôte limite énormément l'étude de la bactérie, car aucun modèle animal n'est capable de reproduire la maladie systémique induite par *Salmonella* Typhi. Notre savoir sur la virulence de ce sérovar provient en grande partie des études faites avec *S. Typhimurium* chez la souris (19). Les génomes des deux sérovares, *S. Typhi* et *S. Typhimurium*, possèdent plus de 90% d'homologie (20, 21). De ce fait, *S. Typhimurium* a été longtemps utilisé afin de reproduire une infection systémique dans un modèle de souris possédant une mutation dans la protéine Nramp1, rendant la souris très susceptible (21). C'est grâce à ce modèle murin que la pathogenèse de *Salmonella* Typhi a pu être en grande partie élucidée. Néanmoins, l'interaction entre le pathogène et son propre hôte est critique afin de bien comprendre cette maladie infectieuse. C'est pourquoi les recherches se consacrent encore à trouver un modèle approprié pour procéder à des infections in vivo (22). Le séquençage du génome complet de *Salmonella* Typhi CT18 a été terminé en 2011 et est disponible sur Internet ([http://www.sanger.ac.uk/Projets/S\\_Typhi/](http://www.sanger.ac.uk/Projets/S_Typhi/)). Cette réalisation a été bien utile à l'avancement de la recherche sur ce pathogène.

## **2.2. Infection par *S. Typhi***

### **2.2.1. Ingestion**

Tel que mentionné précédemment, la maladie est acquise par une transmission orale fécale. C'est donc par l'ingestion d'eau ou de nourriture souillée par des selles contaminées que *S. Typhi* infecte son seul hôte, l'humain (Figure 2). Afin d'initier une infection, il est nécessaire que l'hôte ingère une quantité de bactéries allant de  $10^5$  à  $10^{10}$  (23). Le système digestif est en soi une défense non spécifique contre les pathogènes, car son acidité peut éliminer une bonne partie d'entre eux. Néanmoins, *S. Typhi* possède des systèmes de tolérance à l'acidité, lui permettant de résister au pH acide de l'estomac (24). La quantité de pathogènes est toutefois réduite lors de son passage dans le système digestif, mais les bactéries sont tout de même en mesure d'atteindre les muqueuses intestinales de leur hôte (25).



**Figure 2 : Route d'infection de *S. Typhi*.** Le pathogène survit au pH acide de l'estomac et se retrouve dans l'intestin de son hôte. La bactérie traverse la barrière épithéliale préférentiellement par les cellules M afin de se retrouver dans la *lamina propria*. La phagocytose par les macrophages puis la survie intracellulaire dans ceux-ci permettent à la bactérie pathogène de disséminer et de causer une maladie systémique. Avec permission (19).

### 2.2.2. Attachement et invasion

L'adhésion de *S. Typhi* aux cellules épithéliales de l'intestin de l'hôte est l'événement initial pour l'établissement de l'infection. Différentes situations peuvent

se produire à cette étape selon le tropisme du tissu lors de la colonisation (3). De façon préférentielle, *S. Typhi* interagit avec les cellules M des plaques de Peyer de l'intestin. Cette porte d'entrée permet aux bactéries de traverser la barrière épithéliale par la pinocytose, un processus similaire à la phagocytose (26). Cette interaction avec les cellules M permet cependant aux bactéries d'être transportées aux cellules lymphoïdes T et B (19).

Certaines études supportent la théorie selon laquelle les bactéries pourraient être phagocytées par des cellules CD-18 positives (27). Quelques-unes de ces cellules immunitaires (monocytes, macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles) infectées contiennent des *Salmonella* et les transportent vers différents sites systémiques via le sang et la lymphe (28). Contrairement à l'entrée par les cellules M, cette voie permet à *S. Typhi* de ne pas se faire repérer par le système immunitaire. Ainsi, les bactéries peuvent se disséminer sans induire de réponse inflammatoire importante.

La bactérie *S. Typhi* peut aussi provoquer son entrée dans les cellules épithéliales de l'intestin. Elle facilite son entrée en injectant des effecteurs à l'intérieur de la cellule à l'aide de son système de sécrétion de type 3 nommé SST3-1. Parmi ces effecteurs, SopE, SopE2, SopB, SipA et SipC sont critiques et permettent de manipuler le cytosquelette de la cellule hôte. Le système de sécrétion de type 3 consiste en une aiguille moléculaire dont ses effecteurs injectés vont interagir avec l'actine du cytosquelette de la membrane de la cellule épithéliale de l'hôte (29). La membrane de la cellule épithéliale de l'hôte subit alors une ondulation, ce qui permet à la bactérie d'être englobée et internalisée dans la cellule. Ces différentes façons

d'entrée permettent à *S. Typhi* d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales de l'intestin afin de se retrouver dans la *lamina propria*. Ce passage à travers la barrière épithéliale de l'intestin est une étape essentielle à l'infection, puisque *S. Typhi* doit se disséminer dans le corps de l'hôte pour créer une maladie systémique.

La bactérie possède la capacité d'évader le système immunitaire afin de ne pas générer une réponse inflammatoire qui serait en mesure de l'éliminer. Lorsque l'invasion se produit par les cellules M des plaques de Peyer ou par endocytose forcée, les LPS et la flagelline, normalement très antigéniques, sont dissimulés par la production de la capsule (27). Ainsi, les *Toll-like receptors* (TLRs) de l'hôte responsables de la production de cytokines ne reconnaissent pas la présence de cette bactérie. À ce stade, cette tactique procure des avantages à *S. Typhi* pour traverser vers la *lamina propria* de façon inaperçue et de ne pas déclencher de diarrhée chez l'hôte. Cette évasion permet alors en partie à la bactérie de disséminer.

### **2.2.3. Dissémination et survie**

Lorsque les bactéries ont traversé l'épithélium intestinal, une quantité énorme de phagocytes les engouffrent. Ceux-ci transportent les bactéries dans le sang et la lymphe vers les sites majeurs de colonisation systémique, soit la rate et le foie (22). À cette étape, des bactéries sont présentes dans le sang de l'hôte, déclenchant une bactériémie (23). Ceci crée un influx de cellules de l'immunité innée vers la rate et le foie pour générer une réaction inflammatoire.

Afin de se disséminer vers les sites majeurs de colonisation systémique, les bactéries doivent se multiplier dans les macrophages. Tel que mentionné précédemment, *S. Typhi* est une bactérie intracellulaire facultative. C'est donc à son avantage d'être phagocytée par les macrophages et d'y résider. Afin de ne pas se faire digérer par les cellules phagocytaires, les bactéries intracellulaires s'y associent intimement. Il n'y a pas de fusion du phagolysosome, une fonction importante de la virulence de *Salmonella* lui permettant de ne pas être digérée par les macrophages (19). Elles résident ainsi dans la vacuole du phagocyte nommée « *Salmonella*-containing vacuole" (SVC) où elles peuvent survivre et se répliquer (30). L'interaction entre *S. Typhi* et la cellule phagocytaire à ce niveau est centrale pour la progression de la maladie. Cette vacuole est modifiée par la bactérie à l'aide d'effecteurs, comme SpoB, modifiant la signalisation cellulaire du macrophage et devient alors une niche pour la survie et la réplication des bactéries résidentes (31). *S. Typhi* peut donc modifier à son avantage une des composantes les plus importantes du mécanisme de défense contre *Salmonella* chez l'humain (22).

Cette multiplication intracellulaire intense des salmonelles dure entre 12 et 24 heures (1). Après cette période de multiplication intensive, on observe chez les cellules phagocytaires de larges vacuoles remplies de bactéries (32). Les bactéries peuvent alors atteindre les organes lymphoïdes secondaires, provoquer une bactériémie et atteindre certains organes dont les salmonelles possèdent un tropisme particulier (33).

#### 2.2.4. Symptômes

Bien que *Salmonella* soit reconnue pour la gastroentérite qu'elle provoque chez l'humain, la diarrhée chez *S. Typhi* est un symptôme peu significatif qui se développe que chez un tiers des patients (3). La fièvre typhoïde se caractérise surtout par une forte fièvre où la température peut grimper jusqu'à 40°C. Le temps entre la contamination et l'apparition des premiers symptômes s'étale entre 5 et 21 jours. Les symptômes de la fièvre typhoïde ne sont pas spécifiques et cela rend le diagnostic assez difficile. On observe des douleurs abdominales pendant plusieurs jours, des maux de tête, une forte toux, des taches roses peuvent apparaître sur la peau et pour 5 à 10% des personnes atteintes, et on note de la confusion et des psychoses (2). Des cas de saignements gastriques sont observés chez 15% des patients souffrant d'une perforation intestinale et une céphalopathie survient. Ces événements surviennent surtout lorsque la personne atteinte est malade depuis une douzaine de semaines sans aucun traitement. Dans ces cas, la maladie peut mener à la mort du patient (17).

Environ 1 à 5% des personnes atteintes de la fièvre typhoïde ayant été traitées par antibiotiques deviendront des porteurs asymptomatiques pour plus d'un an (18). Cet état est problématique, car ces porteurs ont la capacité de contaminer l'eau ou la nourriture par l'entremise de leurs selles contenant *S. Typhi* (34). À ce jour, les porteurs asymptomatiques sont le seul réservoir connu de la bactérie *S. Typhi*. La bactérie persiste chez l'hôte sous la forme de biofilm (35). Sous cette forme, aucun symptôme ne se manifeste et la bactérie peut ainsi rester dans la vésicule biliaire de l'hôte sans se faire reconnaître et des quantités importantes de bactéries sont



libérées dans l'urine et les selles (36). Cette situation peut persister des années sans que le porteur sache qu'il contamine d'autres personnes (37). La seule façon d'éliminer totalement *S. Typhi*, est d'éliminer son seul réservoir et donc de traiter les porteurs asymptomatiques, dont l'identification relève de l'impossibilité jusqu'à maintenant.

### **2.3. Détection et traitement**

Un porteur de la bactérie *S. Typhi* la sécrète par ses selles. La détection peut se faire par isolement de la bactérie des selles, mais ce n'est pas le moyen le plus efficace, puisque celles-ci contiennent environ 10 milliards de bactéries par gramme (38). Avec cette technique, on obtient des résultats positifs d'environ 60% pour les enfants et seulement 25% pour les adultes. Puisque c'est une infection systémique, elle peut être isolée du sang, de la moelle épinière ou d'autres sites extra-intestinaux durant la période aiguë (18). Le diagnostic par les cultures de sang est le moyen le plus utilisé et les résultats positifs sont de 60 à 80% (39).

#### **2.3.1. Traitement aux antibiotiques**

La fièvre typhoïde se traite par les antibiotiques et une bonne réhydratation, afin de balancer les électrolytes du corps. C'est en 1948 que le premier antibiotique, le chloramphénicol, fut utilisé pour combattre cette bactérie. Toutefois, comme plusieurs autres bactéries, *S. Typhi* a pu acquérir des plasmides contenant une

résistance au chloramphénicol, rendant le traitement inefficace quelques années plus tard, dans les années 1970 (40). Il était alors nécessaire de trouver un autre antibiotique pour éliminer la bactérie chez les malades. Peu de temps après la découverte de cette résistance, l'ampicilline a remplacé le chloramphénicol dans le traitement de la fièvre typhoïde (3). Dans les années 1980, une forte émergence de résistance à plusieurs antibiotiques a rendu le chloramphénicol, l'ampicilline, le triméthoprim, la streptomycine, les sulfamides et la tétracycline inefficaces contre l'infection (41). Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard que les fluoroquinolones deviennent un traitement de choix contre *S. Typhi* (3).

Cela fait maintenant une vingtaine d'années que le traitement aux fluoroquinolones est utilisé et évidemment de plus en plus de mécanismes de résistance sont décrits (18). Dans la majorité des cas d'infection, il est nécessaire de combiner des antibiotiques afin de traiter les patients. Cette bactérie a pour seul réservoir l'humain et se transmet de façon orale fécale, donc il serait possible de contrôler sa propagation. Des améliorations dans les installations sanitaires, une meilleure hygiène, l'éducation sur la santé et les vaccins sont toutes des moyens qui sont prioritaires afin de contrôler cet agent pathogène. *S. Typhi* évolue constamment et de nouveaux mécanismes de résistance apparaissent contre les traitements utilisés, il est donc essentiel de prendre les précautions nécessaires.

### **2.3.2. Vaccins**

L'immunisation par un vaccin permet de prévenir l'infection lors du contact par la suite avec le pathogène en question. Il existe trois types de vaccins contre *S.*

Typhi. Le premier consiste en l'injection de l'antigène Vi qui est préparé à l'aide du polysaccharide capsulaire de la souche TY2. Ce vaccin a un taux de succès d'environ 93% chez les gens en bonne santé et s'avère moins efficace chez les enfants. Néanmoins, puisque cette maladie est surtout présente dans les pays en développement, elle procure une protection d'environ 55% chez les individus en moins bonne santé (42, 43). Ce vaccin s'avère donc efficace pour les voyageurs, mais très peu pour les habitants des pays endémiques qui sont les plus touchés et priorisés par la vaccination. De plus, l'injection est à renouveler tous les deux ans, rendant l'immunisation dans les pays pauvres encore plus problématique.

Le deuxième vaccin sur le marché est la souche de *S. Typhi* TY21a atténuée, administrée oralement. Ici encore, la distribution du vaccin dans les pays endémiques n'est pas envisageable. Ce vaccin sous forme de capsule orale doit être réfrigéré et la prise de 4 doses répartie sur 8 jours est nécessaire (43). La réfrigération et la discipline de prise de la capsule ne permettent pas l'immunisation des pays en voie de développement, car c'est un vaccin qui demande une certaine discipline. Il n'offre que 51% de protection chez les individus en moins bonne santé et 50 à 80% chez les gens en bonne santé, mais offre une protection de 7 ans (26).

Le dernier type de vaccin contre la bactérie *S. Typhi* est un vaccin combiné. Le polysaccharide de la capsule Vi est modifié et conjugué avec l'endotoxine A non toxique de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Cette endotoxine est un adjuvant qui renforce la réaction inflammatoire. Cette combinaison procure 90% d'efficacité, mais ce vaccin n'est pas encore commercial (3). Le besoin d'un vaccin efficace et facile à administrer est de plus en plus essentiel.

## **3. Le fer**

### **3.1. Le fer, un élément essentiel**

Le corps humain contient près de 5 grammes de fer (44), un élément essentiel pour l'organisme. Ce minéral est d'une importance telle que la plupart des organismes ont évolué de manière à posséder des enzymes fer-dépendantes. Ces enzymes ont des rôles dans plusieurs fonctions essentielles, par exemple le transport et stockage de l'oxygène, ainsi que la réplication de l'ADN (45). Dans les années 1940, les études de Waring et Workman ont démontré que cet élément est requis non seulement pour les vertébrés, mais pour un nombre important de microorganismes (46). Tout comme pour l'humain, ils l'utilisent pour des fonctions essentielles et vitales. Chez ces microorganismes, le fer intervient dans une multitude de mécanismes, tels la croissance, le métabolisme d'ADN, le transport d'électron, la réponse au stress oxydatif, la régulation de gènes et l'interaction avec l'hôte (47). De plus, maints enzymes requièrent la présence de fer pour leurs activités métaboliques ayant un rôle important chez la cellule. Ces enzymes incluent la déshydrogénase succinique, la ribonucléotide réductase, la peroxydase, la catalase et les cytochromes (48).

Néanmoins, le niveau de fer disponible chez un hôte ou dans l'environnement est très limité et donc peu accessible pour les microorganismes. Le niveau de fer libre dans un environnement aérobie est sous le minimum nécessaire pour toute fonction métabolique. Le fer possède deux électrons de valence stables et une gamme

extrêmement large de potentiels d'oxydation-réduction (49). La variation de son potentiel de réduction et son état selon son ligand et l'environnement génèrent d'importants changements dans ses propriétés chimiques. Cet élément se retrouve sous deux formes ioniques avec des propriétés très différentes. En présence d'oxygène, le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) forme des radicaux libres qui sont toxiques pour la cellule.

Plusieurs obstacles sont rencontrés par les microorganismes afin de combler leur besoin en fer. Tout d'abord, dans un environnement en présence d'oxygène, à un pH neutre, la concentration de fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) libre est d'environ  $10^{-18}$  M, puisqu'il forme des hydroxydes insolubles (50). Dans les années 1940, Shade et Caroline ont découvert l'existence de protéines liant le fer (51). En plus d'être en quantité minime à la base, l'hôte possède des protéines liant le fer, réduisant sa disponibilité à environ  $10^{-24}$  M. Cette concentration de fer extrêmement limitée dans le sérum de l'hôte est considérée bactériostatique (4) et rend la compétition d'acquisition un facteur crucial lors de l'interaction du pathogène avec son hôte (52). Le peu de fer présent dans le sérum de l'hôte est lié à différentes molécules qui possèdent une forte affinité pour cet élément. La transferrine et la lactoferrine sont des glycoprotéines qui, lors d'une infection par un pathogène, voient leurs niveaux augmentés dans le sang (53).

Le sang est une source abondante de fer, car l'hémoglobine extracellulaire et l'hème sont utilisés par plusieurs bactéries. Cependant, cette source est aussi limitée. En effet, lors de la réponse immunitaire, l'hémoglobine et l'hème sont rapidement séquestrés par deux protéines présentes dans le sérum humain, soit l'haptoglobine et

l'hémopexine (54), empêchant toute utilisation par les bactéries. On observe une diminution accrue de la présence de fer lors d'une infection, résultant d'une redistribution de celui-ci, ce qui le rend indisponible (54). Ce phénomène s'observe surtout durant la fièvre. En plus d'être en faible quantité et d'être séquestré par des molécules de l'hôte, le fer peut être aussi maintenu en réserve dans la cellule. La ferritine est une protéine permettant de stocker le fer et est largement répandue, car la plupart des organismes l'utilisent, ainsi que certaines plantes (phytoferritine) et microorganismes (bactérioferritine) (55).

### **3.2. Acquisition du fer par les bactéries**

Les agents pathogènes ont la capacité d'acquérir les nutriments dont ils ont besoin dans les tissus de l'hôte excepté un seul, le fer (56). Il représente un grand défi lors de l'établissement d'une infection, car il est non seulement présent en très faible quantité, mais aussi séquestré par les protéines de l'hôte. Le pathogène entre donc en compétition avec l'hôte et les autres microorganismes environnant pour obtenir une quantité suffisante de fer, soit une concentration cytoplasmique d'au moins  $10^{-6}$  M pour croître (50). Les microorganismes ont donc évolué afin de dépouiller l'hôte de son fer à leurs dépens. Bien qu'il soit très rare, le fer ferreux en milieu anaérobie ou à pH acide est celui qui est directement utilisable pour les fonctions du microorganisme. Sous cette forme ionique, il ne requiert pas de chélateur ou de ligand pour le solubiliser et le transporter à l'intérieur de la cellule. Le fer ferreux entre simplement par diffusion de manière énergie-dépendante (57).

Toutefois, les bactéries pathogènes ne peuvent pas compter sur cette source et c'est pourquoi les systèmes d'acquisition de fer font partie des réponses adaptatives les plus importantes pour la pathogenèse d'une bactérie. Différents mécanismes considérés comme des facteurs de virulence ont été découverts à ce jour afin de solubiliser et de capturer cet élément.

Chez l'hôte, le sang est une source de fer pour les microorganismes qui ont la capacité d'utiliser les globules rouges. Les globules rouges représentent la source potentielle de fer la plus abondante pour les bactéries chez un hôte vertébré (46). Certaines bactéries possèdent des hémolysines, des enzymes capables de détruire les érythrocytes. Ces enzymes permettent de libérer le fer complexé à l'hémoglobine (54). L'hème est ensuite transporté à l'intérieur de la bactérie par un système de transport. Étonnamment, puisqu'elle infecte les humains et les animaux, *Salmonella* ne possède aucun système de transport pour l'hème, une source plus qu'abondante de fer.

D'autres systèmes de transport sont utilisés par les bactéries. Certaines souches d'*Escherichia coli* utilisent le système de transport « *Ferric Dicitrate Transport System* », où le fer peut se lier au citrate et ainsi utiliser sa voie d'entrée dans la cellule (58). Il est aussi possible pour certaines bactéries d'utiliser le système « *Ferric Ion-binding Protein* » dans lequel le transport du fer se fait par les récepteurs des transferrines et lactoferrines bactériennes liées au fer (59). Finalement, on retrouve les sidérophores, des chélateurs de fer qui sont sécrétés dans le milieu externe pour aller chercher le fer ferrique, puis sont reconnus par des récepteurs spécifiques à la membrane de la bactérie pour être internalisés dans la cellule. Ces

sidérophores jouent un rôle important, notamment pour la virulence extra-intestinale (60). Il existe une multitude de systèmes de transport et de récepteurs afin d'acquérir le fer selon les espèces. Toutefois, le fer peut être extrêmement toxique pour les cellules et son import doit être régulé rigoureusement par la bactérie. En trop grande quantité, le fer peut former des réactifs oxygénés potentiellement létaux pour la bactérie.

### **3.3. Utilisation thérapeutique du fer**

La compétition entre la bactérie pathogène et son hôte pour la quête du fer est l'un des facteurs les plus importants pour l'établissement d'une infection bactérienne. La lactoferrine et la transferrine sont des protéines de l'hôte essentielles lors de la réponse immunitaire innée contre une infection microbienne, afin de produire une hypoferrémie (61). Plusieurs études se sont donc dirigées vers le fer en tant qu'élément essentiel pour la plupart des bactéries pathogènes, ce qui conférerait une protection.

En 1984, le chercheur Weinberg apporte l'hypothèse que la diminution du fer par le corps lui-même est une réponse face aux pathogènes et aux tumeurs (62). Suite à ces propos, la séquestration de cet élément fut considérée comme étant une approche antibactérienne potentielle. Le fer a été éliminé de l'hôte selon différentes approches expérimentales. Il a été démontré que la privation de suppléments de fer par l'hôte lors d'une diète spéciale empêche la croissance et l'invasion des tissus et assure une certaine protection (63). Toutefois, les cellules humaines ont aussi besoin



de fer pour effectuer leurs fonctions métaboliques. Cette carence alimentaire pourrait alors être tout aussi néfaste pour l'hôte avec le temps.

Cependant, ce n'est pas seulement l'indisponibilité de cet élément pour le microorganisme qui est importante, mais aussi la trop grande disponibilité de celui-ci. En effet, plusieurs études confirment qu'une surcharge de fer, créée par l'injection de fer exogène augmente la susceptibilité aux infections bactériennes (11). Cette association démontrée entre une forte quantité de fer chez l'hôte et l'augmentation des risques d'une bactériémie a été établie avec *Vibrio vulnificus* (64), *Yersinia enterocolitica* (65), *Salmonella* (66) et *E. coli* (67). L'utilisation des sidérophores pourrait alors être une bonne option afin de limiter le fer et diminuer les risques d'infection. De plus, ces chélateurs de fer sont de plus en plus envisagés pour traiter certaines maladies humaines, telle la sidérose, une intoxication au fer. Donc, l'absence de fer est létale pour les pathogènes, alors que la surcharge de l'élément est risquée pour l'hôte puisqu'elle confère un grand avantage pour les bactéries pathogènes lors d'une infection.

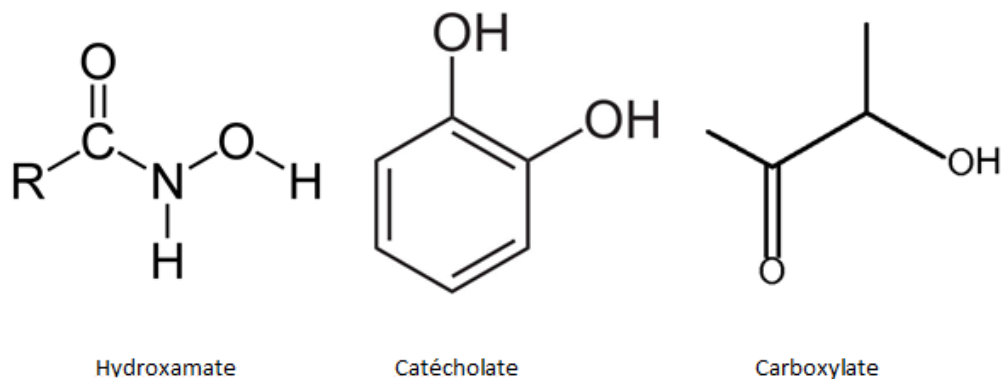
## 4. Les sidérophores

### 4.1. Généralités sur les sidérophores

Le fer est limitant pour la plupart des bactéries, que ce soit dans l'environnement ou chez un hôte. Plusieurs microorganismes ont la capacité d'arracher le fer  $\text{Fe}^{3+}$  aux molécules qui le séquestrent, à l'aide de molécules nommées sidérophores. Un sidérophore est un chélateur de fer sécrété dans le milieu par un microorganisme lorsque les conditions sont pauvres en fer, soit en carence, afin d'assurer la croissance de celui-ci (63). Cette association entre la croissance bactérienne et les sidérophores a été relevée en 1912 par Tworth et Ingram lors d'une étude portant sur un facteur de croissance associé à la cellule chez *Mycobacterium* (68). Toutefois, ce n'est que dans les années 1950 que les sidérophores ont été pour la première fois isolés et caractérisés structurellement, en tant que métabolites produits, sécrétés et assimilés par les bactéries pour faire compétition aux protéines de l'hôte pour l'acquisition du fer ferrique (42). Les sidérophores sont aussi utilisés dans l'environnement, où ils ont la capacité de solubiliser le fer à partir de complexes minéraux afin de l'utiliser pour croître (54).

À ce jour, quelques centaines de sidérophores ont été identifiés et caractérisés (69). On retrouve trois larges groupes de sidérophores (Figure 3), soit les catécholates, les hydroxamates et les carboxylates donneurs d'oxygène contribuant à la très haute affinité pour le fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  (63), distingués entre eux par la structure chimique de la forte liaison avec le fer. Le groupe des catécholates renferme

l'entérobactine, le sidérophore le plus étudié et connu, et les salmochélines. Ceux-ci sont utilisés majoritairement par *E. coli* et *Salmonella*. Chez *E. coli*, on retrouve aussi un sidérophore du groupe des hydroxamates, l'aérobactine (70). Le dernier groupe de sidérophore, soit les carboxylates, renferme la rhizofférine (71) qui est sécrétée par *Rhizopus microsporus*. Ces trois groupes de chélateurs de fer ont tous en commun le fait qu'ils soient des donneurs forts et la capacité de changer le fer ferrique en fer ferreux thermodynamiquement stable (72). La force avec laquelle le sidérophore lie le fer confère une grande stabilité et sa constante de dissociation lui permet d'arracher le fer lié aux protéines de l'hôte tel que vu précédemment. Néanmoins, cette forte affinité n'est pas suffisante pour enlever le fer de l'hème (55) et d'autres systèmes sont requis pour y arriver.



**Figure 3 : Structure des trois larges groupes de sidérophores.**

La production de sidérophores est rigoureusement régulée, car ce n'est qu'en conditions de carence en fer qu'ils sont produits puis sécrétés pour s'accaparer

le fer présent dans le milieu. De plus, cet élément essentiel est également toxique pour les bactéries lorsqu'il se trouve en trop grande quantité intracellulaire, donc il est primordial de bloquer l'acquisition de fer lorsqu'il n'est plus limitant. L'acquisition de fer par l'entremise des sidérophores lors de l'établissement d'une infection est beaucoup étudiée et s'est avérée être reliée à la virulence. Ce n'est qu'à certaines étapes de l'infection que les bactéries pathogènes auront recours à ce système afin de survivre. Par exemple, l'infection débute dans l'intestin, où le fer est nécessaire pour la croissance de *Salmonella*. La production de sidérophores dépend essentiellement de la diète alimentaire de l'hôte, laquelle renferme une grande variété de fer disponible appartenant à différentes sources (63). Chez les souches pathogènes d'*E. coli* extraintestinales, les systèmes de sidérophores ont été identifiés comme étant des facteurs contribuant à la virulence lors de l'infection, au niveau de l'adhérence et de l'invasion des cellules épithéliales de l'intestin (73-75). En situation de bactériémie, où les bactéries sont présentes dans la circulation sanguine, celles-ci produisent des sidérophores afin d'entrer en compétition avec la transferrine, ce qui contribue à la virulence du pathogène (49). La guerre pour le fer tant convoité ne se joue pas seulement entre l'hôte et les bactéries pathogènes, mais également entre microorganismes. Chez l'humain, l'intestin héberge plus de 100 000 milliards de bactéries, ce qui a poussé les bactéries pathogènes de l'humain à évoluer en conséquence. Certaines bactéries ne produisent qu'un type de sidérophore, alors que d'autres en sécrètent différents types afin de coloniser plusieurs environnements. La plupart des bactéries entériques synthétisent non seulement les récepteurs pour leurs propres sidérophores sécrétés dans le milieu, mais aussi d'autres récepteurs qui

reconnaissent des sidérophores qui sont produits et sécrétés par d'autres microorganismes (46). Cette tactique d'obtention de sidérophores exogènes leur confère un grand avantage, car ils n'ont pas besoin des gènes, de la machinerie et la dépense d'énergie que requiert la synthèse de sidérophores.

## **4.2. Les mécanismes d'utilisation des sidérophores**

Peu importe le microorganisme, les sidérophores opèrent selon le même mécanisme pour capturer le fer environnant. La production, l'export et l'import sont régulés en fonction de la quantité de fer intracellulaire du pathogène. Toutes les composantes de ce système ne sont exprimées qu'en situation de carence en fer. La molécule est tout d'abord synthétisée par le pathogène et requiert une excellente flexibilité afin d'envelopper le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La forme chimique du  $\text{Fe}^{3+}$  possède 5 électrons de valence et son ligand sécrété par le pathogène doit donner 12 électrons afin d'atteindre un état thermodynamique stable (68) et se lier ensemble en un complexe fer-sidérophore. Tous les types de sidérophores doivent donc détenir la propriété de bons donneurs d'électrons afin d'être des ligands compétents.

Chez les bactéries Gram +, le sidérophore est exporté directement du cytoplasme au milieu externe par un système d'export afin de capturer le fer de l'hôte, alors que chez les bactéries Gram -, le sidérophore doit franchir deux membranes pour atteindre le fer environnant. Dans la plupart des cas, le sidérophore passe du cytoplasme au périplasme par un système d'export lui permettant de franchir la membrane interne, puis par un autre système d'export pour passer la membrane

externe. Lorsque le sidérophore est sécrété, il part à la recherche de fer ferrique pour l'arracher des molécules de l'hôte qui le séquestre.

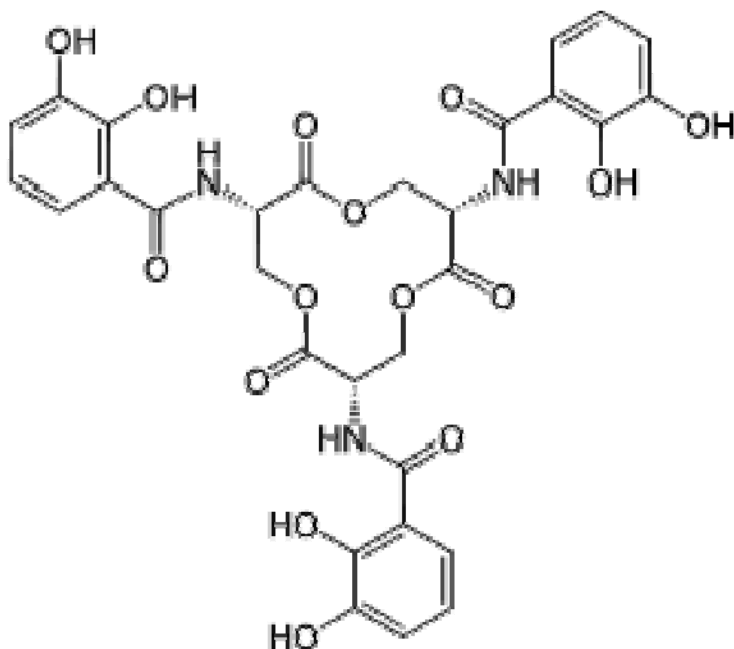
Pour qu'il y ait attachement entre le fer et le sidérophore, celui-ci entoure le  $Fe^{3+}$  de façon à ce que le fer soit au centre d'un système d'octaèdres avec 6 atomes d'oxygènes au sommet (3). Bien que le sidérophore possède une énorme affinité pour le fer ferrique, l'échange de ligand doit procéder rapidement. Le complexe doit alors être internalisé par la bactérie afin qu'elle puisse utiliser le fer nécessaire au fonctionnement de la cellule. Un récepteur spécifique au complexe se trouve sur la membrane externe afin d'importer celui-ci. Ces récepteurs énergie-dépendants (76) sont physiquement similaires aux porines, des protéines formant des canaux pour laisser passer les petites molécules à travers la membrane, mais ils sont moins hydrophobes que la majorité des protéines membranaires (77).

Le complexe maintenant situé dans le périplasme, ou déjà dans le cytoplasme chez les bactéries Gram +, doit être importé par un système d'import dans le cytoplasme. À ce niveau, le ligand perd son affinité pour le fer ferrique afin d'être recyclé et utilisé à nouveau pour combler les besoins en fer du pathogène. Le fer n'étant plus mobilisé par le sidérophore, il peut alors être utilisé dans les nombreuses fonctions dont sa présence est nécessaire.

### **4.3. L'entérobactine (L'entérochéline)**

Les sidérophores font le sujet de bien des recherches, car le fer est un élément essentiel dont plusieurs se penchent sur son rôle clé lors de l'établissement d'une

infection. L'entérobactine, aussi nommé l'enterochéline, est un des sidérophores les mieux étudiés et connus, puisqu'il est utilisé entre autres par *E. coli*. C'est le sidérophore ayant la constante d'affinité pour le fer la plus élevée (78) ce qui en fait le plus fort des composés et il est trouvé chez une grande partie des d'entérobactéries, y compris *Salmonella* (79). L'entérobactine est un triester cyclique de 2,3-dihydroxybenzoylserine (DHBS) (80) (Figure 4) faisant partie du groupe des catécholates.



**Figure 4 : L'entérobactine, un triester cyclique de 2,3-dihydroxybenzoylserine (DHBS). Avec permission (81).**

Le système de l'entérobactine est codé par un groupe de 15 gènes, *entABCDEFHS*, *fepABCDEG* et *fes*, tous requis pour la biosynthèse de

l'entérobactine et son transport et utilisation (80). Tout le système est régulé rigoureusement par Fur (63), qui répond selon la quantité de fer intracellulaire présent. Les gènes du système d'acquisition sont exprimés seulement en situation de carence en fer. Fur est un facteur de transcription négatif, c'est-à-dire qu'il réprime la transcription de certaines gènes cibles lorsque la quantité en fer est abondante.

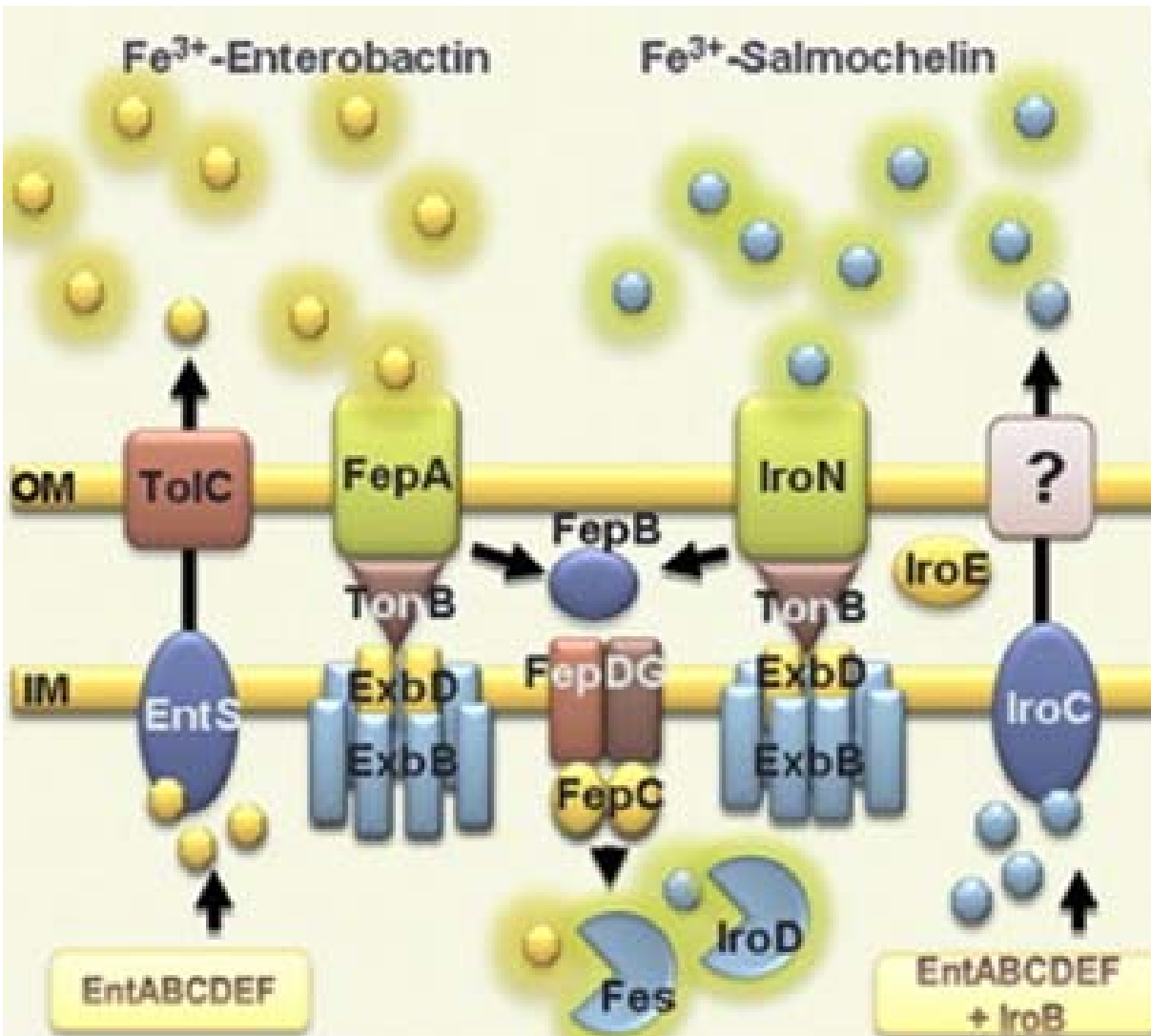
La biosynthèse de l'entérobactine se produit dans le cytoplasme et requiert 6 des 15 gènes, soit *entA* à *entF*. Lorsqu'il est synthétisé, le sidérophore est sécrété majoritairement dans le périplasme par EntS, une protéine transmembranaire codée par le gène *entS* (Figure 5). Dans certains cas, l'entérobactine passe plutôt par IroC, qui normalement exporte un autre sidérophore au périplasme, les salmochélines (61). IroC est un transporteur ABC, c'est-à-dire une protéine transmembranaire ayant comme rôle le transport unidirectionnel d'une multitude de molécules non spécifiques. Ce transport de part et d'autre de la membrane exige un apport en ATP pour fournir le mécanisme en énergie (82). Afin de rejoindre le milieu externe, l'entérobactine est sécrétée du périplasme par la pompe à efflux TolC (28). Cette protéine tunnel n'est pas spécifique au sidérophore et possède de nombreuses fonctions dans la cellule. Elle joue notamment un rôle important dans les systèmes de résistance aux antibiotiques multiples et dans la sécrétion de toxines (83). Il a été démontré en 2005 que cette protéine tunnel de la membrane externe est nécessaire pour l'export de l'entérobactine dans le milieu externe (28). Chez *S. Typhimurium*, un mutant de délétion du gène *tolC* pousse beaucoup moins vite que la souche sauvage. *In vitro*, le mutant *tolC* adhère difficilement aux cellules épithéliales, démontrant son rôle clé lors de l'adhésion dans l'intestin de l'hôte (29). De plus, TolC est important pour



l'adhésion, l'invasion et la survie dans les cellules eucaryotes et est 4 log plus susceptible que la souche sauvage au sérum humain (29). Il a été démontré que la délétion de *tolC* interfère également avec d'autres systèmes d'export nécessaire lors d'une infection (84). Lors de la survie intracellulaire de *S. Typhimurium* dans la vacuole du macrophage, la bactérie requiert la sécrétion d'effecteurs afin de combattre l'environnement hostile dans lequel elle doit survivre et se multiplier. TolC joue un rôle dans cette défense contre l'hôte et sa délétion conduit à une importante susceptibilité et la survie se voit diminuée considérablement (29).

Une fois que l'entérobactine est sécrétée par TolC, elle scrute l'hôte afin de lui voler son fer. Le sidérophore lie le  $\text{Fe}^{3+}$  et forme un complexe qui sera reconnu par le récepteur spécifique à celui-ci. Le complexe est reconnu par le récepteur extramembranaire FepA qui est Ton-B dépendant (85). FepA fonctionne en association avec le complexe protéique TonB-ExbB-ExbD qui lui fournit l'énergie nécessaire (63), car sans ce système le complexe ne peut être internalisé dans le périplasme. Ce système utilise l'énergie disponible à la membrane cytoplasmique de la bactérie. Le complexe TonB-ExbB-ExbD exploite la force proton motrice puisque ExbB-ExbD est le canal de protons qui se trouve dans la membrane interne et TonB interagit avec le récepteur (4). Par la suite, FepB sert de navette au complexe afin d'atteindre le cytoplasme par une perméase cytoplasmique située dans la membrane interne de la bactérie. Cette perméase se compose des protéines codées par *fepC*, *fepD* et *fepG* (3). Dans le cytoplasme, le fer est retiré de son ligand par Fes, qui agit en hydrolysant le complexe. Le fer est alors libre dans le cytoplasme et les produits

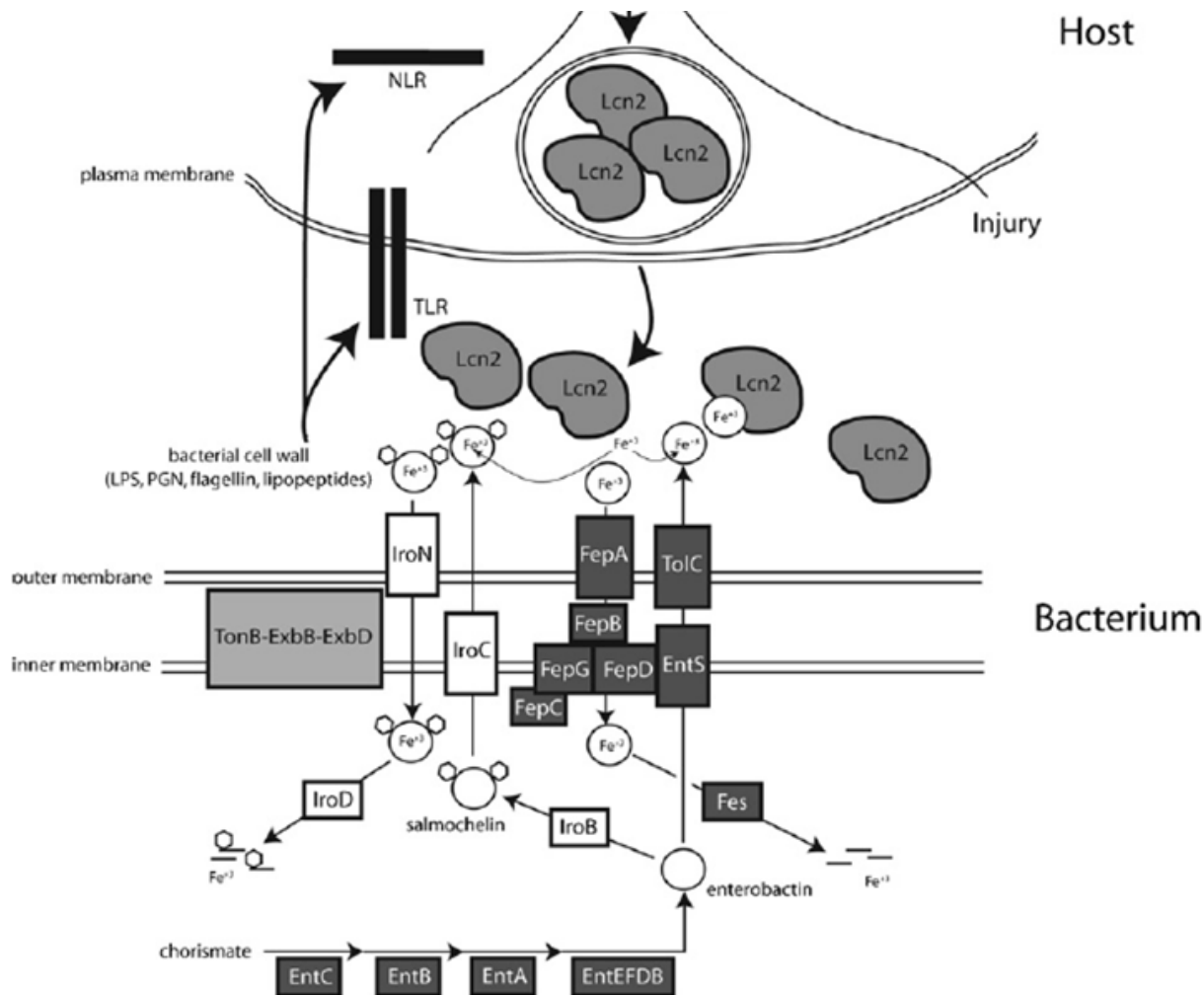
de dégradation de l'entérobactine (trimères, dimères, et monomères) pourront possiblement servir à chélater le fer de nouveau (79, 80).



**Figure 5 :** Les systèmes d'acquisition de fer par l'entérobactine et les salmochélines. L'entérobactine est synthétisée pas les gènes *entABCDEF* puis sécrété au périplasma par EntS. Du périplasma au milieu externe, l'entérobactine est sécrété par TolC et le complexe entérobactine-Fe<sup>3+</sup> est internalisé par FepA. Fes permet la séparation du complexe afin de libérer le fer ferrique pour utilisation future par la bactérie. Avec permission (86).

Le système immunitaire et les pathogènes sont en continuelle évolution. De nouvelles capacités acquises par un microorganisme seront contrecarrées par un mécanisme de notre système immunitaire. Les mammifères ont évolué de sorte à bloquer l'acquisition du fer par les sidérophores lors de la réponse immune innée (87). L'entérobactine représente le sidérophore le plus efficace pour séquestrer le fer chez son hôte, mais en situation d'infection il est dans l'incapacité de faire compétition avec les protéines de l'hôte pour le fer. En effet, il est totalement inhibé par l'albumine sérique (83) et lie fortement une protéine du système immunitaire inné. Cette protéine est le lipocalin 2 (NGAL, Lcn2 ou sidéocalin) (52, 83), une composante des granules des neutrophiles régulée positivement lors d'une infection (Figure 6).

Un autre facteur n'étant favorable à ce sidérophore est sa forte hydrophobicité qui empêche la molécule de traverser les couches bilipidiques des membranes (50). Cette séquestration de l'entérobactine par le lipocalin et son hydrophobicité le rend étonnamment inefficace pour la croissance des bactéries chez l'hôte pendant l'infection (50). Des recherches récentes ont démontré que cette protéine du système immunitaire inné contribue à l'effet bactériostatique lorsque le pathogène possède ce sidérophore pour acquérir le fer (50). De plus, des anticorps anti-entérobactine ont été découverts chez l'humain (11). Son rôle dans la pathogénicité a donc été longuement questionné dû à ses nombreuses failles.



**Figure 6 : Séquestration de l'entérobactine par le lipocalin 2 (Lcn2), une molécule du système immunitaire inné. Les salmochélines, grâce à la glycosylation par IroB évade cette défense de l'hôte. Avec permission (87).**

Les bactéries possédant l'entérobactine ont donc évolué pour posséder différentes variantes de sidérophores afin de combattre cette inefficacité. Certaines souches d'*E. coli* par exemple possèdent l'aérobactine et la salmochéline toutes deux considérées comme des facteurs de virulence, puisqu'elles ne sont pas liées par l'albumine sérique ou par le lipocalin (63, 83) Les systèmes de ces deux sidérophores

sont requis dans le modèle d'infection chez le poulet pour une virulence complète (52). Ces sidérophores peuvent donc acquérir le fer efficacement et contribuer à la progression de l'infection chez l'hôte.

## 4.4. Les Salmochélines

### 4.4.1. Généralités

*Salmonella* Typhi possède deux sidérophores, soit l'entérobactine et son analogue la salmochéline (88). Tous les sérovars à l'exception de *S. bongori* produisent ce sidérophore dérivé de l'entérobactine, ainsi que certaines souches d'*E. coli* extraintestinales (ExPEC) (52, 89). Les salmochélines font partie des nombreux facteurs de virulence de *Salmonella enterica*, car ces molécules lui permettent d'acquérir le fer lors d'une infection chez l'humain, sans être reconnue par le système immunitaire. Les salmochélines sont l'entérobactine  $\beta$ -C-glycosylée à la position 5 des résidus 2,3-dihydroxybenzoyl (63). Cette glycosylation lui confère plusieurs avantages par rapport au composé de base, tel un rôle plus important dans le processus de la pathogénicité de *S. Typhi* et une diminution de l'hydrophobicité. Sa présence restaure donc l'habilité de *Salmonella* à scruter l'hôte pour obtenir le fer lors d'une infection.

Les salmochélines sont codées par le locus *iro* ou les gènes *iroBCDEN* qui sont transcrits qu'en conditions de carence en fer (52). Le locus n'est pas un opéron puisqu'il est constitué du groupe de gènes *iroBCDE* et du gène *iroN* qui est divergent

(Figure 7). Ce fut *iroBC* les premiers gènes du locus à être découverts. Ils ont été identifiés chez *S. Typhi* lors d'une expérience visant à trouver les gènes régulés par Fur, un régulateur en réponse de la quantité de fer (90). Le locus *iro* fut désigné initialement comme étant un système régulant le pH et le fer chez *S. Typhimurium* (80). Des années plus tard, il a été établi qu'il code pour les gènes responsables pour la synthèse, transport et utilisation des salmochélines. Ce locus est trouvé chez plusieurs souches pathogéniques d'entérobactéries afin d'évader la séquestration de l'entérobactine par le système immunitaire (87). Puisque la salmochéline est un dérivé glycosylé de l'entérobactine et qu'elle en a besoin comme substrat, il va de soi que le locus *iro* est retrouvé seulement dans les souches ayant les gènes *entABCDEF*. L'expression des gènes *iroBCN* est augmentée de 2 à 9 fois dans le tractus urinaire d'une souris, comparativement à un milieu riche (LB) et les gènes *entABCDEF* étaient aussi exprimés en même temps, supportant la coordination des deux systèmes qui fonctionnent en tandem (50).

*iroA* locus



**Figure 7 : Structure génétique du locus *iro*.** Suivant l'ordre, IroB est responsable de la glycosylation de l'entérobactine afin d'obtenir la salmochéline. Ensuite, IroC sécrète la salmochéline du cytoplasme au périplasme. IroD et IroE hydrolysent la salmochéline afin qu'elle puisse relâcher le fer puis linéarisent les salmochélines en

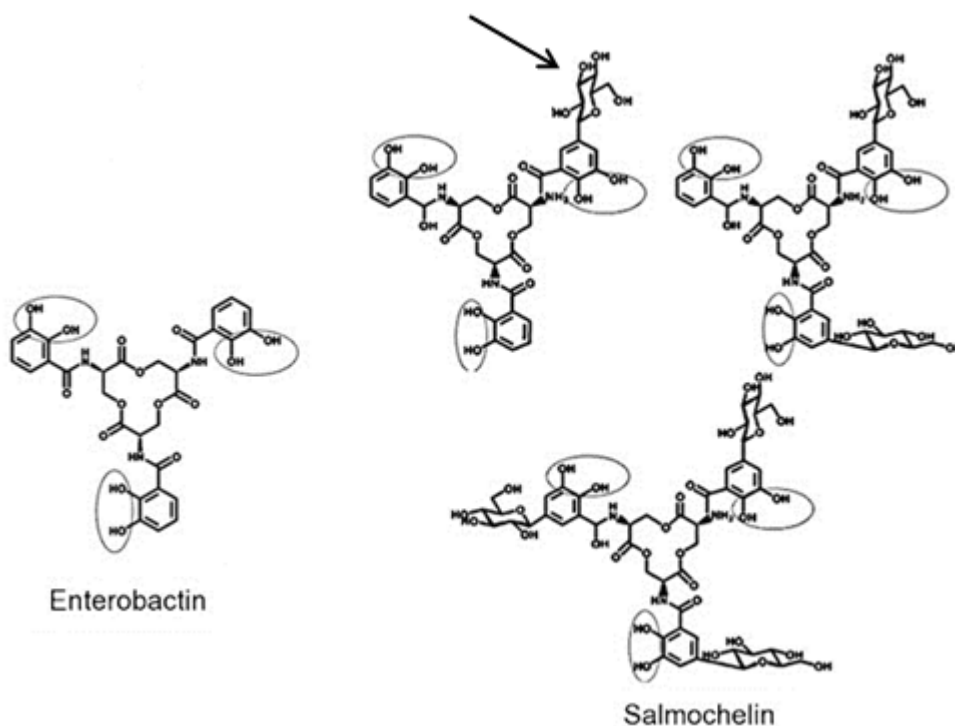
différentes variantes. IroN est le récepteur de la membrane externe responsable de l'import des complexes salmochéline-fer. Avec permission (91)

Le groupe de gènes codant les salmochélines a beaucoup été étudié notamment chez *E. coli* et *S. Typhimurium* en lien avec la virulence. Chez des souris atteintes de la maladie systémique de *Salmonella*, la virulence est nettement diminuée lorsque la souche injectée est déficiente dans la synthèse ou la sécrétion de ces sidérophores (61). Chez *E. coli*, la complémentation du locus *iro* permet le regain total de la virulence chez le mutant (52), mais il a été observé que l'absence d'*iroC*, *iroDE* ou *iroN* empêche la restauration de la virulence, suggérant qu'ils sont nécessaires. De l'autre côté, le rôle des salmochélines dans la pathogénicité a été démontré en introduisant le locus *iro* chez une souche non pathogène d'*E. coli*, dont la virulence chez les souris a augmenté significativement (87).

#### **4.4.2. Gènes $\Delta$ *iroBCDEN* ou locus *iro***

Tel que mentionné précédemment, le locus *iro* est dépendant de son substrat l'entérobactine. Dans le cytoplasme du pathogène, une glycosyltransférase de la famille des Gtf codée par le gène *iroB* (92) convertit l'entérobactine synthétisé par son propre mécanisme en entérobactines mono-, di- et triglycosylés (MGE, DGE et TGE) (79) (Figure 8). La glycosyltransférase agit en transférant un, deux ou trois glucoses de l'uridine-5-diphosphoglucose (UDP-Glc) au carbone 5 de l'anneau 2,3-dihydroxybenzoylserine(DHBS) (50). Ces glucoses sont distribués par l'enzyme, car

la molécule monoglycosyl est construite puis convertit en diglycosyl qui sert de substrat au triglycosyl (80). Ces molécules avec un ou plusieurs glucoses ajoutés sont différents types de salmochélines et seulement l'activité d'IroB est nécessaire et suffisante pour la production de ces sidérophores (63).



**Figure 8 : Glycosylation de l'entérobactine par IroB** afin d'obtenir les salmochélines. La flèche indique une des molécules de glucose ajoutée par la glucosyltransférase IroB. Adapté de (86).

Les salmochélines nouvellement synthétisées doivent alors traverser du cytoplasme au périplasma. Le gène *iroC* encode un transporteur de la famille « *ATP binding cassette* » (ABC) qui permet le passage de la molécule (92). Bien qu'il ait un



rôle de transporteur des salmochélines, IroC possède une très haute homologie avec le système d'export lié à la résistance des antibiotiques chez les eucaryotes (MDR) (52). À l'inverse, il n'est que légèrement homologue au système de transport bactérien de protéines (ABC) retrouvé dans la membrane interne pour l'export des sidérophores (61).

L'entérobactine est sécrétée du périplasme au milieu externe par un système d'export non spécifique codé par le gène *to/C* qui permet l'export d'antibiotiques et de nombreuses molécules. À ce jour, le système par lequel les salmochélines traverse la membrane externe de la bactérie n'a pas été déterminé (28). La sécrétion de ces sidérophores est un mécanisme spécifique en considérant la taille de ces molécules, glycosylés.

Lorsque les salmochélines sont sécrétée dans le milieu externe, elles peuvent séquestrer le fer de l'environnement ou de l'hôte. Lorsqu'elle a capturé et lié le  $Fe^{3+}$ , le complexe salmochéline-fer retourne à la bactérie pour être internalisé. Le récepteur responsable de l'import au périplasme est codé par le gène *iroN*, qui code pour un récepteur qui est aussi capable d'importer son analogue non glycosylé, l'entérobactine (74). Le récepteur IroN ressemble énormément au récepteur de l'entérobactine, FepA, autant au niveau fonctionnel que de l'homologie de séquences (3). Récemment, on a observé un rôle d'IroN lors de la virulence, notamment pour l'invasion des cellules épithéliales de l'intestin chez les *E. coli* extraintestinales *in vitro* (52). Néanmoins, cette contribution dans l'invasion ne semble pas avoir de lien avec l'adhérence aux cellules, puisqu'aucune augmentation n'a été observée. IroN agit alors probablement directement sur la capture du pathogène par les cellules

épithéliales de l'hôte (73). Ce récepteur semble aussi avoir un deuxième rôle lors de l'infection, car il sert de facteur d'internalisation (93). Toutefois, d'autres études ont démontré que chez *S. Typhimurium* l'absence de *fepA* et *iroN*, codant les récepteurs de l'entérobactine et des salmochélines, ne réduit pas la virulence de la bactérie. Par contre, une souche mutante  $\Delta cir :fepA :iroN$ , où *cir* est un récepteur permettant l'import des formes linéaires de sidérophores catécholates (entérobactine et salmochélines), était atténuée chez un modèle de souris (94). Le récepteur IroN est un antigène exposé à la surface bactérienne (92). Puisqu'il est exposé dans la membrane externe, sa localisation permet au système immunitaire de produire des anticorps contre le récepteur du complexe sidérophore-fer à la membrane externe. Ces anticorps ont été détectés dans le sérum de patients étant en rétablissement de la fièvre typhoïde (69).

Dans le périplasme, le complexe fer-sidérophore est séparé afin que la bactérie puisse utiliser le fer saisi par la salmochéline. Le processus par lequel le sidérophore prend relâche pourrait impliquer l'hydrolase périplasmique IroE (52) qui permet la diminution de l'affinité du ligand pour le fer ferrique (50). Cette diminution se produit lorsqu'IroE catalyse la monohydrolyse du sidérophore et rend hydrophile la molécule hydrolysée tout en perdant son affinité pour le fer (50). Tout comme IroD, IroE semble dégrader la salmochéline cyclique (S4) en salmochéline trimérique linéaire (S2)(95). Par contre, un rôle précis pour IroE n'est pas encore établi dans le cycle des salmochélines. IroE possède une certaine similarité avec les hydrolases (69) et possède un signal de séquence pour l'export des protéines pour le recyclage des différentes formes linéaires de salmochélines. Le gène *iroE* n'est pas

requis pour la virulence chez une souche d'*E. coli* pathogène extra-intestinale, puisque la complémentation par *iroBCDN*, en absence d'*iroE*, rétablit complètement la capacité de coloniser et de causer des dommages aux tissus intestinaux (52).

Afin de dégrader les salmochélines dans le cytoplasme, c'est l'estérase cytoplasmique codée par *iroD* qui clive ces molécules. La salmochéline cyclique (S4) est clivée par IroD afin d'obtenir la forme trimérique linéaire (S2) puis la forme dimérique (S1) et finalement le monomère dihydroxybenzoylserine (SX) et dihydroxybenzoylserine C-glycosylée (acide pacifarinique) (95). Le rôle d'IroD est encore controversé, car il possède une faible similarité de séquence avec Fes (85), l'estérase cytoplasmique de l'entérobactine et joueraï probablement un rôle dans la biosynthèse de la salmochéline autant que dans le dégradation après son importation dans la cellule de la bactérie (3). Ce rôle pour la biosynthèse plutôt que le clivage est supporté par l'observation de l'élimination de la synthèse de ce sidérophore dans une souche où IroBC ou IroD sont délétés (3).

## Problématique et objectifs

La fièvre typhoïde est une maladie systémique létale dont le nombre de cas est accablant. Dans le monde, les cas de décès s'élèvent à environ 200 000 par année (96). Bien qu'il y ait différents types de vaccins sur le marché, ils ne sont pas adéquats. De plus, la constante évolution de la virulence du pathogène complique énormément le traitement. En effet, *S. Typhi* développe d'année en année de nouveaux mécanismes de résistance, rendant l'utilisation d'antibiotiques moins efficace pour traiter les patients atteints de la maladie. Cette situation rend essentiel l'approfondissement des mécanismes afin de trouver de nouvelles cibles, soit pour de nouveaux vaccins, traitements ou stratégies thérapeutiques.

Dans notre laboratoire, nous travaillons sur les facteurs de virulence utilisés par *S. Typhi* lors de l'établissement d'une infection systémique. Ce sont des composantes essentielles au pathogène qui sont utilisées à différentes étapes de l'infection selon la cellule de l'hôte rencontrée. Nos recherches ciblent principalement deux types de cellules importantes pour l'établissement de l'infection chez l'humain, les cellules épithéliales et les macrophages. La salmochéline, un système est codé par le locus *iro*, occupe un rôle important dans la pathogenèse de la bactérie, puisqu'elle permet l'acquisition de fer sans être reconnue par le système immunitaire (87). Il a été démontré que la délétion du locus diminue la virulence de la souche mutante par rapport à la souche sauvage, chez d'autres entérobactéries.

Puisque la littérature par rapport aux gènes *iroBCDEN* ne se rapporte pas nécessairement à une bactérie utilisant une voie systémique d'infection et que ce

locus attribut un pouvoir pathogène à *S. Typhi*, nous nous y sommes intéressé. Notre hypothèse est que le locus *iro* est impliqué dans la virulence, notamment au niveau des cellules épithéliales et des macrophages. Afin de vérifier cette hypothèse, plusieurs objectifs ont été fixés. Tout d'abord, il faudra observer l'effet de la mutation de délétion du locus lors d'infections *in vitro*. Par la suite, si l'on obtient un phénotype, il faudra muter chaque gène du locus afin de vérifier le rôle de chacun lors de ces mêmes infections. Puisque le mécanisme selon lequel la salmochéline est sécrétée dans le milieu externe est inconnu à ce jour, le dernier objectif est d'observer l'effet de la mutation *tolC* lors d'infections de cellules humaines.

Ces différents objectifs seront atteints en supprimant le locus *iro*, les gènes *iroBCDEN* individuellement, puis *tolC* à l'aide de la méthode de mutagenèse par échange allélique. Lorsque ces mutants de délétion ont été obtenus, ils ont été cultivés dans différentes conditions de croissance, avec ou sans fer. L'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales ont été vérifiées, ainsi que la phagocytose et la survie intracellulaire dans les macrophages, par des infections de cellules humaines *in vitro*. Puisque différents phénotypes ont été obtenus, ces mêmes souches mutantes ont été soumises à un test de stress oxydatif généré par le peroxyde d'hydrogène. La souche  $\Delta tolC$  a été aussi soumise à un test de mobilité. Les résultats sont présentés au chapitre 4 et laissent place à de grandes perspectives quant au système d'acquisition de fer et son rôle lors de l'établissement d'une infection chez *Salmonella Typhi*.

# Matériel et méthodes

## 1. Souches et plasmides utilisés

Les souches et plasmides utilisés tout au long du projet sont répertoriés dans le **Tableau 1**. La souche *S. Typhi*  $\chi$ 3744 n'a pas été séquencée jusqu'à maintenant, donc les amorces en annexes ont été construites à partir de la souche *S. Typhi* CT18. Sauf indication contraire, les souches ont été cultivées de routine sur gélose Luria-Bertani (gélose LB) ou en milieu liquide LB à 37°C avec ou sans agitation. Lorsque mentionné, les milieux étaient supplémentés avec des antibiotiques ou suppléments selon les concentrations suivantes : chloramphénicol (Cm) 34  $\mu$ g/ml, acide DL- $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélique (DAP) 50  $\mu$ g/ml et FeCl<sub>3</sub> 50  $\mu$ M.

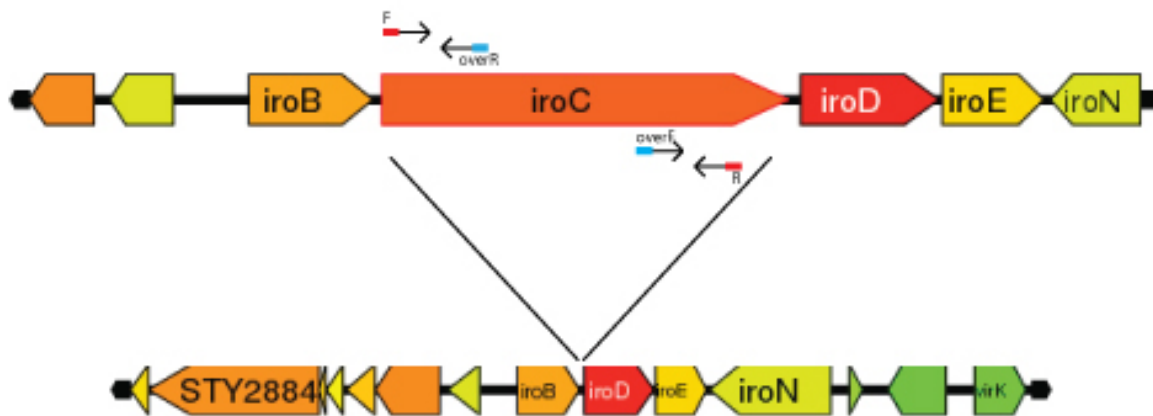
**Tableau 1 : Description des souches et plasmides utilisés dans cette étude.**

Souches	Génotype	Utilisation	Référence
<b>Souches d'<i>Escherichia coli</i></b>			
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir	<i>supE hsdR 17 recA 1 endA 1 gyr 96 thi -1 relA 1 <math>\lambda</math>pir</i>	Transformation	Invitrogen
<i>E. coli</i> $\chi$ 7213	Sm10 $\lambda$ pir <i>asd thi thr leu tonA lacY supE recA RP4 2-Te ::Mu[<math>\lambda</math>pir] <math>\Delta</math>asdA4</i>	Conjugaison	Kaniga 1998
<b>Souches de <i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi</b>			
<i>S. Typhi</i> $\chi$ 3744	Sauvage		Hone 1991
DEF580	3744 $\Delta$ <i>iro</i>		Cette étude
DEF774	3744 $\Delta$ <i>iroB</i>		Cette étude
DEF906	3744 $\Delta$ <i>iroC</i>		Cette étude
DEF903	3744 $\Delta$ <i>iroD</i>		Cette étude
DEF838	3744 $\Delta$ <i>iroN</i>		Cette étude
DEF772	3744 $\Delta$ <i>tolC</i>		Cette étude
<b>Plasmides</b>			
pMEG375	<i>sac RB mob RP4 ori R6K, Cm<sup>r</sup> Ap<sup>r</sup></i>	Résistance Cm, Ap	Megan Health
pSIF192	7213pMEG $\Delta$ <i>iro</i>		Cette étude
pSIF290	7213pMEG $\Delta$ <i>iroB</i>		Cette étude
pSIF353	7213pMEG $\Delta$ <i>iroC</i>		Cette étude
pSIF360	7213pMEG $\Delta$ <i>iroD</i>		Cette étude
pSIF332	7213pMEG $\Delta$ <i>iroN</i>		Cette étude
pSIF359	7213pMEG $\Delta$ <i>tolC</i>		Cette étude

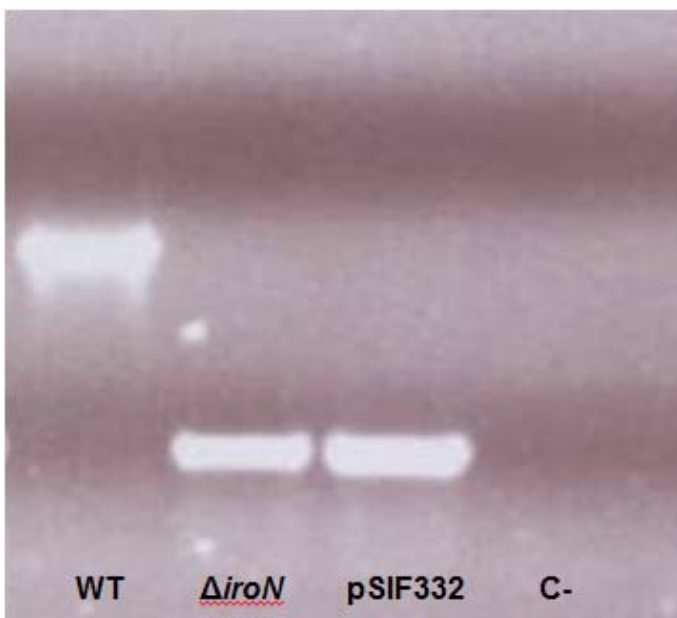
## 2. Mutagénèse

Ce projet de maîtrise porte sur la caractérisation du locus *iro* chez *Salmonella* Typhi. Afin de le caractériser, il faut muter le locus en entier ainsi que chaque gène individuellement, soit *iroB*, *iroC*, *iroD*, *iroE*, *iroN* et *tolC*. Pour créer les mutations, nous avons procédé par un échange allélique non-polaire, qui permet d'enlever l'opéron ou le gène sans décaler le cadre de lecture et ainsi ne pas modifier l'expression des autres gènes environnants en les gardant intacts. Le mutant de délétion  $\Delta iroE$  n'a pu être créé lors de ce projet.

Avec les amorces qui ont été construites à partir du génome de la souche *S.* Typhi CT18, il sera possible d'exciser le gène cible, indiqué à la Figure 9 représentant le gène *iroC* avec les amorces utilisées pour la mutagénèse. Le produit de l'amplification (*Taq DNA Polymerase*, QIAGEN) de deux fragments situés aux extrémités du gène cible permet d'obtenir le gène tronqué. Le premier fragment en 5' est obtenu avec la paire d'amorces, F et overR, dont l'extrémité rouge de l'amorce F contient le site de digestion pour l'enzyme de restriction BamHI. Le deuxième fragment en 3' est obtenu avec la paire d'amorces, over F et R, dont l'extrémité rouge de l'amorce R contient le site de digestion pour l'enzyme XbaI. Les extrémités bleues des amorces over R et over F représentent neuf nucléotides permettant l'hybridation entre les deux amorces par chevauchement. Cette hybridation permet l'amplification par PCR des deux fragments avec les amorces F et R pour obtenir le gène tronqué.



**Figure 9 : Représentation du gène *iroC* tronqué.** Les flèches représentent les amorces utilisées pour la délétion du gène. Les extrémités rouges permettent la digestion par des enzymes de digestion et les extrémités bleues permettent l'hybridation par chevauchement.



**Figure 10 : Exemple de construction d'une souche mutante.** La souche pSIF332 est le plasmide 7213pMEG $\Delta iroN$  utilisé comme contrôle positif.



Le produit de PCR obtenu et purifié (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) qui correspond au gène tronqué est introduit dans le vecteur suicide, pMEG375 (Tableau 1). Ce vecteur permet la conjugaison, une contre-sélection et est résistant à l'antibiotique chloramphénicol. Pour permettre l'introduction du gène tronqué dans le plasmide, le produit PCR et le plasmide sont digérés par les enzymes de restriction BamHI et XbaI du *New England Biolabs* (NEB) pendant deux heures à 37°C. Après avoir purifié les deux fragments d'ADN, soit l'insert et le vecteur digérés, on procède à la ligation. Cette étape permet de joindre les extrémités digérées par les enzymes de restriction et ainsi former le plasmide « pMEG375 : gène tronqué » en catalysant la formation de liens phosphodiester entre l'extrémité 5' phosphate et 3' hydroxyle. L'insert et le vecteur sont incubés avec la ligase T4 provenant du phage T4 (NEB) pendant environ 18 heures à 16°C.

Le plasmide est alors introduit dans des cellules compétentes d'*E. coli* (DH5α  $\lambda$ pir) par transformation. On utilise cette souche car elle possède la protéine Pir permettant la réplication du vecteur suicide pMEG375 qui nécessite cette protéine à son origine de réplication. Dans un tube contenant la souche DH5α  $\lambda$ pir, on ajoute le produit de ligation obtenue précédemment. On laisse le tube contenant le vecteur avec le gène tronqué et la souche DH5α  $\lambda$ pir 30 minutes sur glace, puis on crée un choc thermique en incubant le tube à 42°C pour 90 secondes. Ce choc permet aux cellules compétentes de laisser entrer l'ADN. On remet le tube sur glace pendant 2 minutes afin qu'elles refroidissent et par la suite on ajoute du milieu LB. Afin que la bactérie se réplique et qu'elle puisse exprimer le gène de résistance à l'antibiotique chloramphénicol contenu dans le plasmide, on transfère le tout dans une éprouvette

qu'on laisse sous agitation à 37°C pendant une heure et demie. Cette résistance au chloramphénicol est nécessaire puisque l'on inocule les géloses contenant du chloramphénicol avec le bouillon de la transformation pour sélectionner les cellules transformées contenant la résistance, donc le plasmide.

Lorsque le transformant contient bien le vecteur avec le gène tronqué, que l'on a vérifié par PCR, on l'isole l'ADN plasmidique et on procède à une deuxième transformation. Cette deuxième transformation requiert la souche *E. coli*  $\chi$ 7213, car elle contient le système de conjugaison nécessaire afin que le plasmide suicide s'intègre dans la souche *S. Typhi*. Cette souche possède aussi une mutation dans le gène *asd* et requiert donc la présence d'acide DL- $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélique (DAP) pour sa croissance. Le protocole reste alors le même que précédemment, sauf la nécessité d'ajouter du DAP pour la croissance.

Lorsque la souche donneuse *E. coli* ( $\chi$ 7213) contient le plasmide « pMEG : gène tronqué », on l'a fait pousser, ainsi que la souche receveuse, *S. Typhi* ( $\chi$ 3744), pendant environ 18 heures sous agitation à 37°C dans un bouillon LB contenant les sélections nécessaires (DAP et CM pour  $\chi$ 7213). Les cultures des souches donneuses et receveuses sont concentrées par centrifugation. Au centre d'une gélose LB DAP, a été déposé 400  $\mu$ l de la souche donneuse, soit *E. coli*  $\chi$ 7213, et par-dessus 100  $\mu$ l de la souche receveuse, *S. Typhi*  $\chi$ 3744. La gélose de conjugaison est incubée 4 à 6 heures à 37°C. Suite à l'incubation, on ajoute du LB sur la gélose puis on racle celle-ci afin de ramasser le plus de conjuguants possible. Le mélange est ensuite dilué jusqu'à la dilution  $10^{-3}$  puis chacune des dilutions sont étalées sur gélose LB-CM, que l'on incube pendant environ 18 heures à 37°C. Cela permet tout

d'abord l'élimination de la souche donneuse *E. coli* ( $\chi$ 7213) qui requiert le DAP pour pousser, ainsi que la sélection des colonies de *S. Typhi* contenant le plasmide intégré (première recombinaison) dans leur génome puisqu'elles seront donc résistantes au chloramphénicol.

Quelques-unes des colonies obtenues lors de la conjugaison sont repiquées et ensuite poussées dans 5 ml de LB pendant 4 à 6 heures sans sélection, puisque seul le gène tronqué nous intéresse et non le vecteur en entier. Cette étape sert à ce qu'il y ait réarrangement allélique (deuxième recombinaison), pour que le gène tronqué porté par le plasmide remplace le gène sauvage. La bactérie doit donc perdre le vecteur pMEG375 et garder seulement le gène tronqué. Après les 4 à 6 heures d'incubation, 100  $\mu$ l du bouillon est étalé sur géloses sucrose sans sel afin de s'assurer que les bactéries perdent le vecteur. Les géloses sucrose sans sel permettent une contre-sélection par le sucrose qui est toxique pour la croissance du vecteur, car celui-ci contient le gène *sacB*. La double recombinaison est vérifiée par amplification du gène cible par PCR (voir section suivante) pour confirmer si celui-ci est resté sauvage ou s'il est délété. Ainsi, la souche *S. Typhi*  $\chi$ 3744 est mutante pour le gène cible à muter.

### **3. Amplification d'ADN par PCR**

Une amplification d'ADN par PCR est une réaction en chaîne par polymérase servant à amplifier un fragment d'ADN en faible quantité afin d'en obtenir un grand nombre. C'est à partir d'amorces spécifiques d'une vingtaine de nucléotides que les

fragments sont amplifiés selon les instructions du protocole de Feldan. Chaque cycle de transition de température permet la dénaturation de l'ADN, l'hybridation par appariement des amorces puis l'élongation par la polymérase. Ceci se répète 25 fois au cours de la réaction de PCR. La dénaturation se fait à 95°C, l'hybridation entre 54 et 60°C selon la température d'hybridation propre aux amorces utilisées et l'élongation se fait à 72°C.

#### **4. Courbes de croissance**

La courbe de croissance en milieu liquide riche (LB) avec et sans 2,2'-Dipyridyl permet d'analyser la croissance de la souche mutante en comparaison à la souche sauvage. Le 2,2'-Dipyridyl est un chélateur de fer, c'est-à-dire qu'il lie le fer contenu dans le milieu et le retire de la solution. À partir d'une gélose inoculée avec la souche à testée, on prend deux à trois colonies que l'on ajoute à un bouillon de 5 ml de LB que l'on laisse sous agitation pendant environ 18 heures à 37°C, les tubes sont centrifugés et resuspendus dans un nouveau milieu LB et LB avec 2,2'-Dipyridyl afin de laver les cellules. De ce tube, une dilution de 1/100 dans un puit de 198 µl de LB et LB avec 2,2'-Dipyridyl est effectuée et représente le temps 0.

À chaque 15 minutes, la densité optique est mesurée par spectrométrie afin d'obtenir une courbe allant de 0 à 16 ou 24 heures. Tout au long de l'expérience, les tubes sont sous agitation à 37°C et trois réplicats techniques sont utilisés pour chacune des souches.

La mesure de la densité optique est obtenue avec un spectrophotomètre calibré préalablement à 600 nm selon la densité optique du milieu utilisé non inoculé. La plaque contenant les puits de 200 µl est introduite dans le lecteur optique et reste sous agitation à 37°C tout au long de la prise de données. L'appareil utilisé est un *Bioscreen C Automated Microbiology Growth Curve Analysis System (Growth Curves USA)* dont la plaque contient 100 puits de 200µl chaque.

La courbe de croissance en milieu *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) permet d'analyser la croissance de la souche mutante par rapport à la souche sauvage dans un milieu défini avec et sans fer. Puisque le locus *iro* code pour un système d'acquisition de fer, il est important de vérifier s'il y a un défaut de croissance *in vitro* chez la souche mutante. À partir d'une gélose inoculée avec la souche à tester, on prend deux à trois colonies que l'on ajoute à un bouillon de 5 ml de LB que l'on laisse sous agitation pendant environ 18 heures à 37°C. Afin de nettoyer les cellules, les tubes sont centrifugés et les bactéries sont resuspendues dans un nouveau milieu RPMI. De ce tube, une dilution de 1/100 dans un puit de 198 µl de RPMI et RPMI avec FeCl<sub>3</sub> 50 µM est effectuée et représente le temps 0. À chaque 15 minutes, la densité optique est mesurée par spectrométrie afin d'obtenir une courbe allant de 0 à 18 heures. Tout au long de l'expérience, les tubes sont sous agitation à 37°C et trois réplicats techniques sont utilisés pour chacune des souches. Puisque nous voulons un milieu sans fer, des tubes en plastiques sont utilisés pour chacune des étapes mentionnées précédemment.

## 5. Test de sensibilité au peroxyde d'hydrogène

Le test de sensibilité au peroxyde d'hydrogène permet de vérifier l'effet d'un stress induit par un radical libre sur une souche mutante en comparaison avec la souche sauvage. À partir d'une gélose inoculée avec la souche mutante, on prend deux à trois colonies que l'on ajoute à un bouillon de 5 ml de LB que l'on laisse sous agitation pendant environ 18 heures à 37°C. Sur une gélose, 2 ml du bouillon est étalé également sur la superficie puis l'excédent est retiré afin d'avoir un tapis complet de bactéries. Au centre de la gélose inoculée, un disque contenant 10 µl de peroxyde d'hydrogène à 3% est déposé. La gélose est ensuite incubée à 37°C pendant environ 18 heures et on y observe un diamètre d'inhibition autour du disque. Ce diamètre représente la sensibilité de la souche au peroxyde d'hydrogène que l'on compare avec la souche sauvage.

## 6. Test d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales humaines INT-407

L'observation de l'interaction des souches mutantes avec des cellules épithéliales permet d'étudier l'une des premières étapes d'une infection à *Salmonella* Typhi. Cette expérience permet de comparer l'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales de l'intestin d'une souche mutante en comparaison à la souche sauvage. Environ 24 heures avant l'infection, les cellules épithéliales humaines INT-407 sont mises en culture à 37°C. dans du milieu *Eagle's minimal essential medium* (EMEM) que l'on complète avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur et 25 nM de N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES) que l'on maintient sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. À partir de cette culture de cellules,

une concentration de  $2 \times 10^5$  cellules par puits est calculée pour obtenir une plaque de 24 puits. Cette plaque est incubée environ 24 heures avant l'infection. À partir d'une gélose inoculée avec la souche à tester, on prend deux à trois colonies que l'on ajoute à un bouillon de 5 ml de LB-NaCl 0,3 M que l'on laisse sans agitation pendant environ 18 heures à 37°C. Le but est d'obtenir une D.O. d'environ 0,6 à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui représente la fin de la phase de croissance logarithmique.

Une heure avant l'infection, les cellules en suspension, telles que les cellules mortes ou déficientes pour l'adhérence, sont éliminées par lavages afin de maximiser l'expérience. Les 24 puits sont lavés avec 1 ml de tampon phosphate (*Phosphate buffered saline* : PBS) (chlorure de sodium à 8 g/L, phosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) à 0,2 g/L, phosphate d'ammonium à 2,17 g/L et chlorure de potassium à 0,2 g/L à pH 7,4) maintenu à une température de 37°C afin de ne pas déstabiliser les cellules épithéliales. On ajoute ensuite 1 ml d'EMEM complété et la plaque de 24 puits est remise à 37°C pendant 1 heure, jusqu'à l'étape de l'inoculation de bactéries.

La multiplicité d'infection (MOI) utilisée est de 20 :1 pour une quantité de  $2 \times 10^5$  cellules par puits. La mesure de la densité optique des bouillons inoculés la veille permet de calculer la quantité en  $\mu\text{l}$  de ces bouillons à ajouter dans chaque puits selon chacune des souches. Le décompte des unités formatrices de colonies (UFC) permet de confirmer la quantité de bactéries qui a été inoculée dans chaque puits. Des dilutions allant de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  sont étalées sur géloses pour le décompte.

Après l'heure d'incubation avec le milieu EMEM frais, les cellules épithéliales sont infectées. Afin de synchroniser l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales, la plaque de 24 puits est centrifugée 5 minutes à 800 g. Par la suite, la plaque est incubée à 37°C pendant 90 minutes sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. L'adhérence est déterminée après 90 minutes d'incubation à 37°C (T90), puis les bactéries sont récoltées. Pour ce faire, les cellules sont lavées avec 1 ml de PBS maintenu à une température de 37°C afin de ne pas déstabiliser les cellules. Trois à quatre lavages sont nécessaires afin d'éliminer toutes bactéries n'ayant pas adhérentes aux cellules épithéliales. Les puits du T90 étant lavés, les cellules sont par la suite lysées avec un détergent, du PBS supplémenté d'acide déoxycholique à 0,1% (PBS-DOC). Le PBS-DOC fait éclater les cellules eucaryotes seulement. Les bactéries ayant adhéré aux cellules épithéliales humaines de chaque puits sont alors récoltées dans un microtube de 1 ml. Pour calculer l'UFC du T90, des dilutions allant de 10<sup>-2</sup> à 10<sup>-4</sup> des microtubes de 1 ml sont étalées sur géloses pour le décompte.

Les puits représentant l'invasion (T180) sont lavés une seule fois au PBS puis remplis de EMEM supplémenté de l'antibiotique gentamicine à 100 µg/ml afin d'éliminer les bactéries extracellulaires et d'empêcher les bactéries n'ayant pas adhéré aux cellules au T90 de le faire par la suite. Les puits sont incubés à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub> pendant 90 autres minutes. Après les 180 minutes totales d'incubations des puits servant à l'invasion des cellules, on procède au lavage et à la récolte comme pour l'adhérence. Pour calculer l'UFC du T180, des dilutions allant de 10<sup>-2</sup> à 10<sup>-4</sup> des microtubes de 1 ml sont étalées sur géloses pour le décompte. L'UFC des souches mutantes aux temps T90 et T180 est ensuite comparé



à la souche sauvage afin d'observer un phénotype lors de l'adhésion et de l'invasion des cellules épithéliales humaines INT-407. Les résultats sont présentés en UFC et en taux par rapport à la souche sauvage normalisée à 100%.

### **7. Test de phagocytose et de survie dans les macrophages humains THP-1**

Lors d'une infection à *S. Typhi*, la bactérie interagit d'abord avec les cellules épithéliales de l'intestin, puis traverse la barrière intestinale. La prochaine étape importante de l'infection est l'interaction avec les macrophages, puisque c'est une bactérie pathogène intracellulaire. Cette expérience permet d'observer l'interaction à deux niveaux, soit la phagocytose de la bactérie par le macrophage, puis la survie dans celui-ci, en comparaison avec la souche sauvage.

Environ 48 heures avant l'infection, les monocytes humains THP-1 (ATCC #TIB-202) sont mis en culture à 37° dans du milieu RPMI que l'on complète avec 10% de SVF inactivé à la chaleur, 0,1 mM d'acides aminées non-essentiels et 1 mM de sodium pyruvate, le tout maintenu sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. À partir de cette culture de cellules, une quantité de 5 x 10<sup>5</sup> cellules par puits est calculée pour obtenir une plaque de 24 puits. Cette plaque est incubée 48 heures avant l'infection afin qu'ils se différencient en macrophages à l'aide du phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) que l'on ajoute. À partir d'une gélose inoculée avec la souche à tester, on prend deux à trois colonies que l'on ajoute à un bouillon de 5 ml de LB que l'on laisse sans agitation pendant environ 18 heures à 37°C. Le but est d'obtenir une

D.O. d'environ 0,6 à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui représente la fin de la phase de croissance logarithmique.

La MOI utilisée pour l'infection de macrophages est de 10 :1 pour une quantité de  $5 \times 10^5$  cellules par puits. La mesure de la densité optique des bouillons inoculés la veille permet de calculer la quantité en  $\mu\text{l}$  de ces bouillons à ajouter dans chaque puits selon chacune des souches. Le décompte des unités formatrices de colonies (UFC) permet de confirmer la quantité de bactéries qui a été inoculée dans chaque puits. Des dilutions allant de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  sont étalées sur géloses pour le décompte.

Afin de synchroniser la phagocytose des bactéries inoculées à chaque puits, la plaque est centrifugée 5 minutes à 800 g. Par la suite, la plaque est incubée à 37°C pendant 20 minutes sous une atmosphère de 5% de  $\text{CO}_2$ . La phagocytose est déterminée après 20 minutes d'incubation à 37°C (T0), puis les bactéries sont récoltées. Pour ce faire, les cellules sont lavées avec 1 ml de PBS maintenu à une température de 37°C afin de ne pas déstabiliser les cellules. Trois à quatre lavages sont nécessaires afin d'éliminer toutes bactéries n'ayant pas été phagocytées par les macrophages humains. Les puits du T0 étant lavés, les cellules sont par la suite lysées avec le détergent PBS-DOC pour faire éclater les cellules eucaryotes seulement. Les bactéries ayant été phagocytées par les macrophages humains de chaque puits sont alors récoltées dans un microtube de 1 ml. Pour calculer l'UFC du T0, des dilutions allant de  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  des microtubes de 1 ml sont étalées sur géloses pour le décompte.

Les puits représentant la survie (T24) sont lavés une seule fois puis remplis de RPMI supplémenté de l'antibiotique gentamicine à 50 µg/ml afin d'empêcher les bactéries n'ayant pas été phagocytées de l'être par la suite. Les puits sont incubés à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures. Après les 24 heures d'incubation des puits servant à la survie intracellulaire, on procède au lavage et à la récolte comme pour la phagocytose. Pour calculer l'UFC du T24, des dilutions allant de 10<sup>-2</sup> à 10<sup>-4</sup> des microtubes de 1 ml sont étalées sur géloses pour le décompte. L'UFC des souches mutantes aux temps T0 et T24 est ensuite comparé à la souche sauvage afin d'observer un phénotype lors de la phagocytose et de la survie dans les macrophages humains THP-1. Les résultats sont présentés en UFC et en taux par rapport à la souche sauvage normalisée à 100%.

## **8. Test de mobilité**

Le test de mobilité permet d'observer la capacité d'une souche mutante à se déplacer en comparaison avec la souche sauvage. À partir d'une gélose inoculée de la souche mutante, on prend deux à trois colonies que l'on ajoute à un bouillon de 5 ml de LB que l'on laisse sous agitation pendant environ 18 heures à 37°C. De ce bouillon, 6 µl est piqué à environ 2-3 mm de profondeur dans une gélose de 25 ml de LB à 0,3% d'agar, donc plus malléable, permettant la mobilité des bactéries. Les souches mutante et sauvage sont piquées sur la même gélose, mais aux extrémités, afin d'obtenir les mêmes conditions et qu'elles soient le plus éloignées l'une de l'autre. La gélose est ensuite incubée à 37°C pendant environ 18 heures et on y

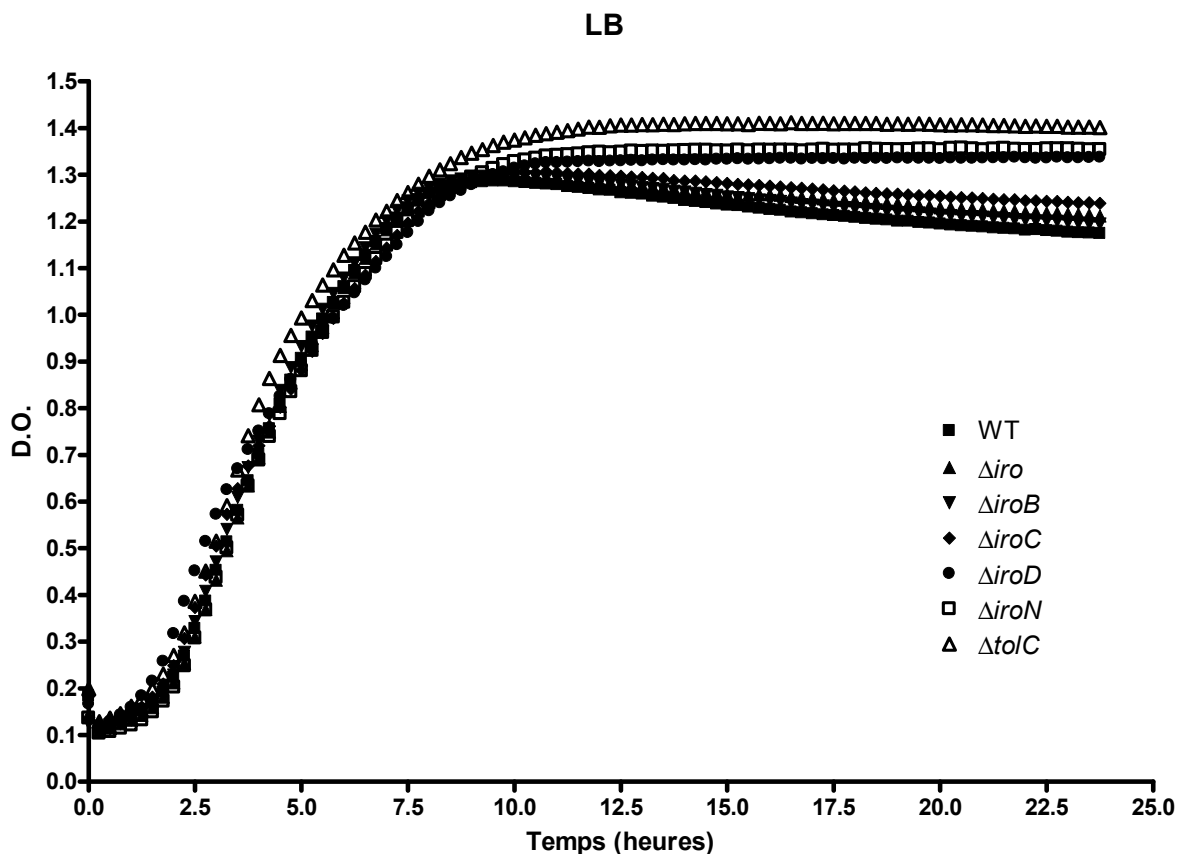
observe une croissance bactérienne autour de l'inoculum. Le diamètre représente la distance de migration des souches et on peut ainsi mesurer la capacité de mobilité en comparaison à la souche sauvage.

# Résultats

## 1. Caractérisation *in vitro* du locus *iro* et *toIC*

### 1.1. Courbes de croissance en milieu riche LB

La souche de *S. Typhi*  $\Delta iro$  est dépourvue du locus *iro* codant pour le système entier d'acquisition de fer par la salmochéline. La délétion des gènes *iroN*, *iroC* et *toIC* a affectée la croissance sur gélose LB, alors une courbe de croissance a été réalisée pour chaque mutant afin de vérifier si la croissance en bouillon LB a été affectée. Les résultats obtenus (Figure 11) indiquent qu'aucune souche mutante ne possède un défaut de croissance en milieu riche LB.

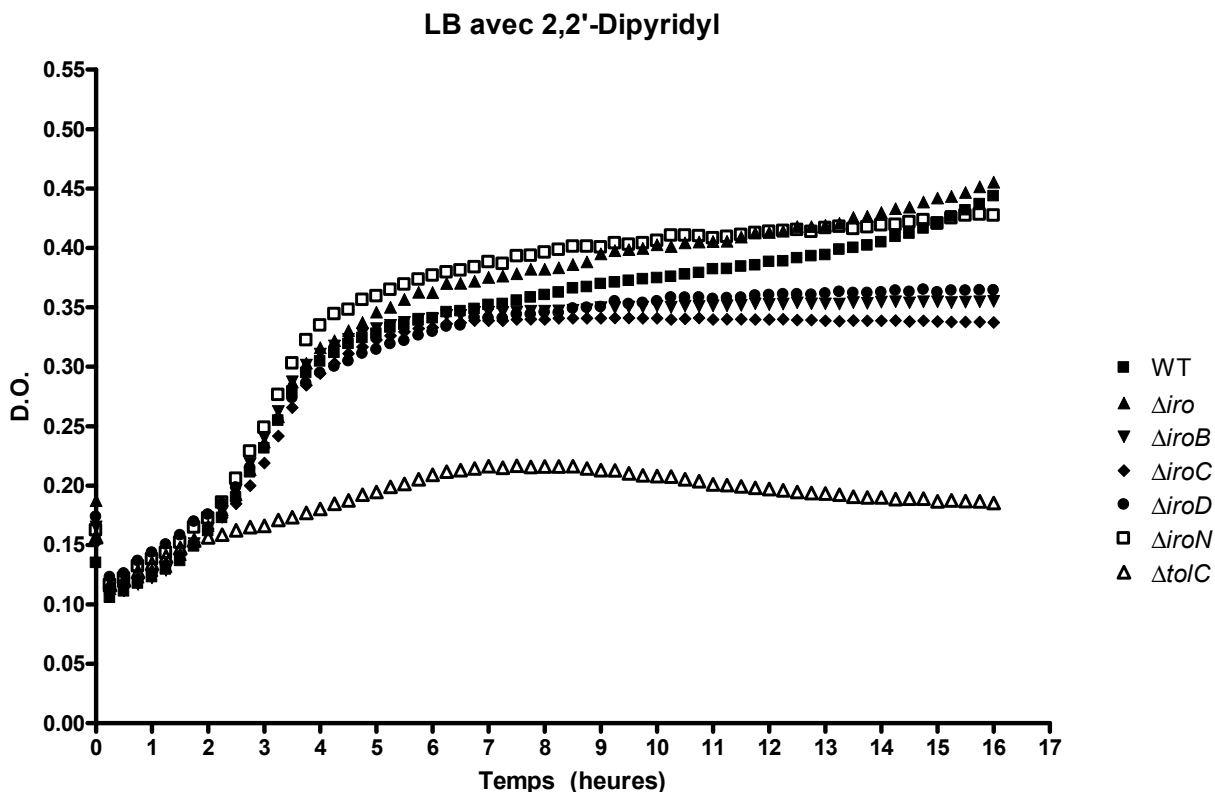


**Figure 11 : Courbes de croissance en milieu riche LB.** Les densités optiques de chaque souche furent prises à un intervalle de 15 minutes pendant 24h. Chaque courbe représente une moyenne de trois réplicats techniques.

## 1.2. Courbes de croissance en milieu riche LB avec 2,2'-Dipyridyl

Afin de comparer la croissance en milieu riche et en milieu riche dépourvue de fer, une courbe de croissance en milieu LB avec 2,2'-Dipyridyl a été effectuée pour chaque souche. Le 2,2'-Dipyridyl est un fort chélateur de fer permettant la

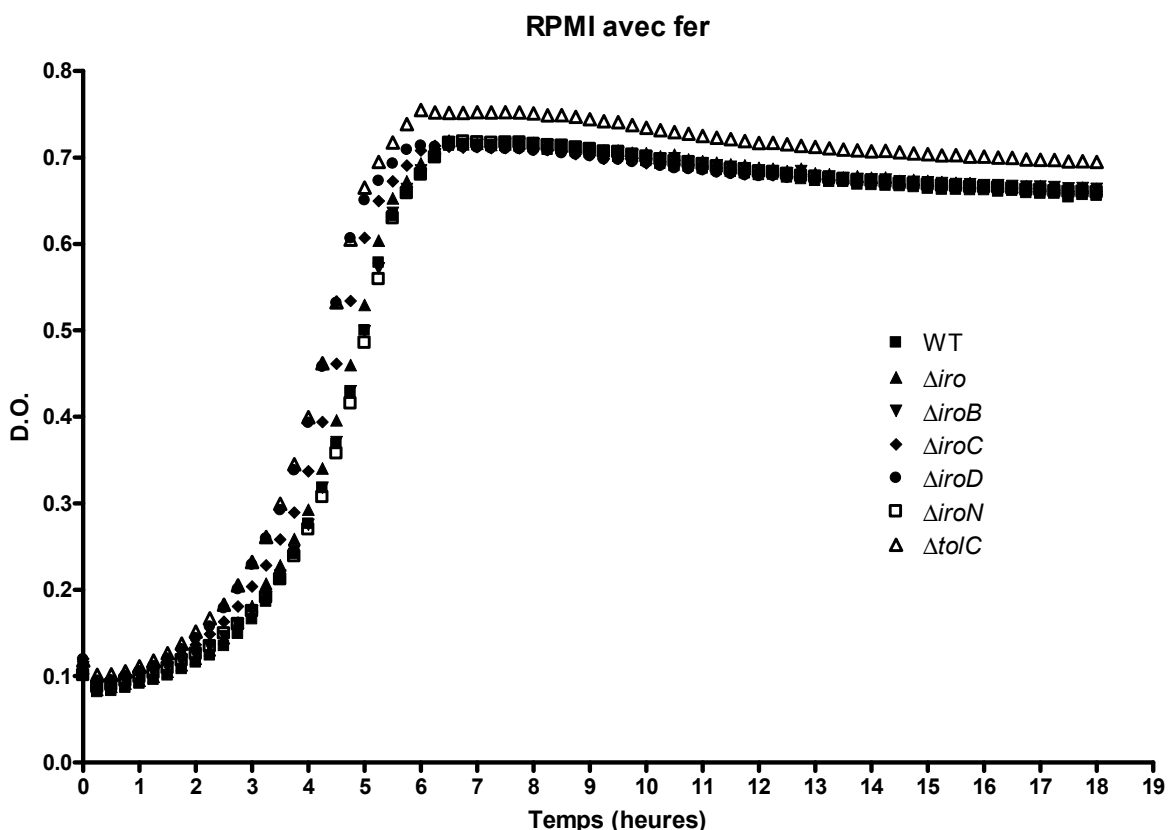
séquestration de l'élément dans le milieu. Les résultats obtenus (Figure 12) indiquent qu'aucune souche mutée dans les gènes du locus *iro* ne possède un défaut de croissance en milieu riche sans fer. Toutefois, la délétion du gène *tolC* entraîne une diminution de la croissance dans ces conditions.



**Figure 12 : Courbes de croissance en milieu riche LB avec ajout de 2,2'-Dipyridyl.** Les densités optiques de chaque souche furent prises à un intervalle de 15 minutes pendant 16h. Chaque courbe représente une moyenne de trois réplicats techniques.

### 1.3. Courbes de croissance en milieu RPMI avec fer

L'expression de sidérophores est induite uniquement en condition de carence en fer. Puisque le système d'acquisition de fer est étroitement régulé selon la présence de fer, une courbe de croissance en milieu RPMI avec l'ajout de  $\text{Fe}^{3+}$  a été réalisée pour chaque mutant. Les résultats présentés (Figure 11) indiquent qu'aucune des souches mutantes n'est affectée par la présence de fer dans le milieu.

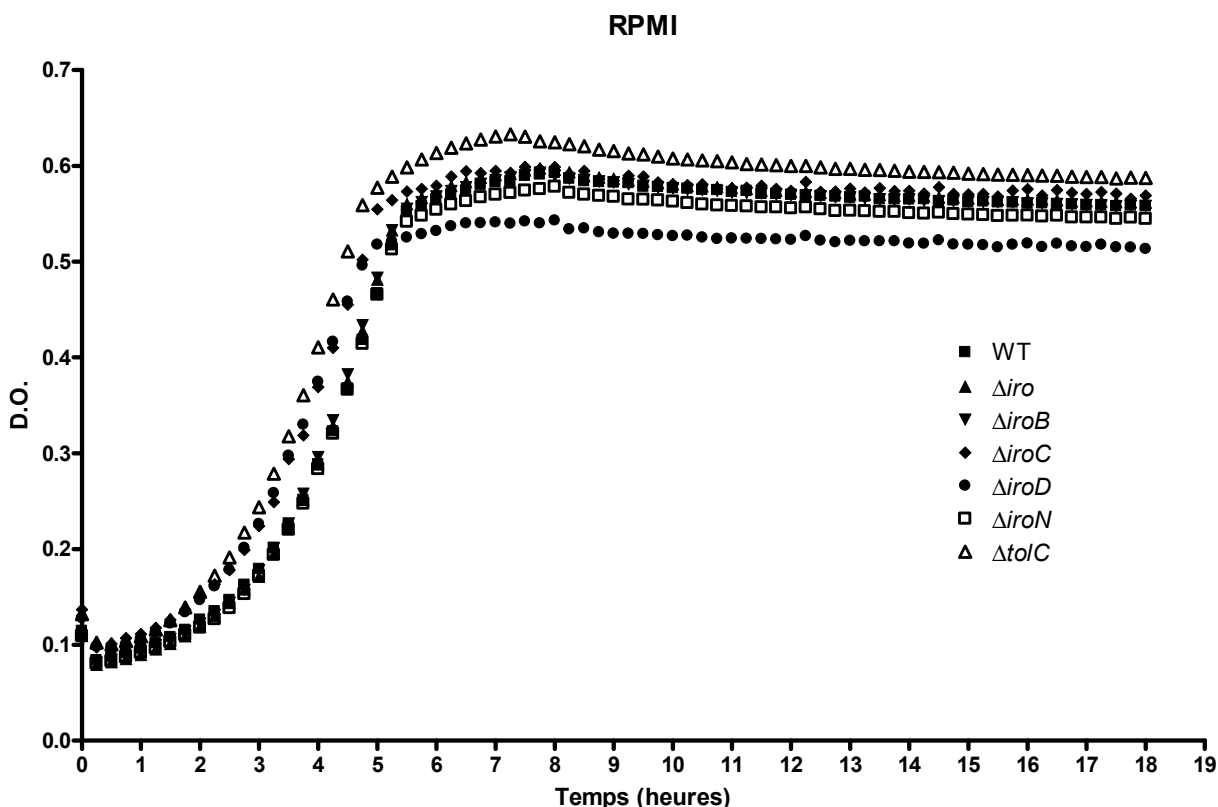


**Figure 13 :** Courbes de croissance en milieu minimal avec ajout de fer. Les densités optiques de chaque souche furent prises à un intervalle de 15 minutes pendant 18h. Chaque courbe représente une moyenne de trois réplicats techniques.



#### 1.4. Courbes de croissance en milieu RPMI sans fer

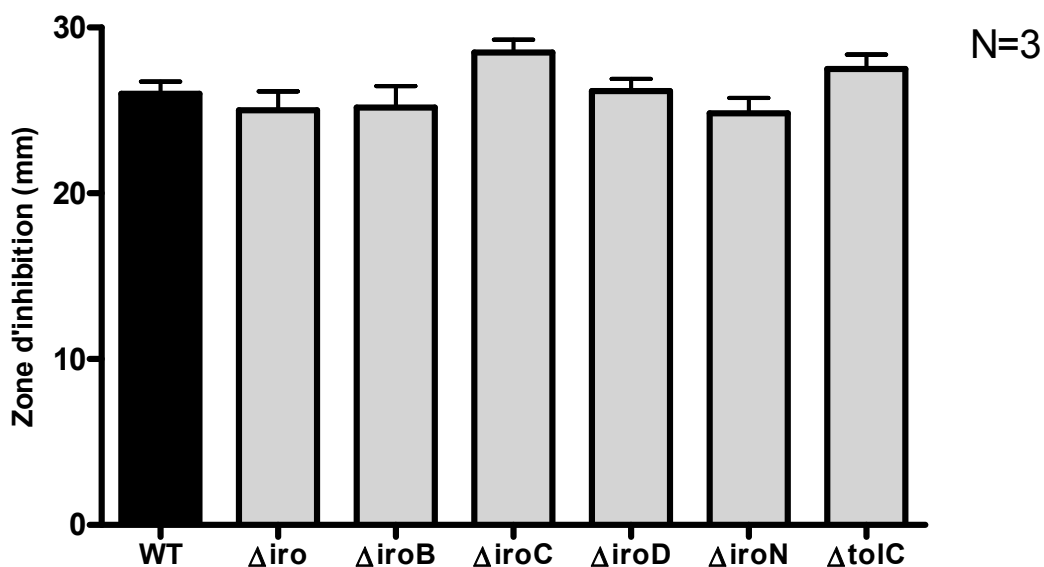
Les sidérophores sont synthétisés lorsque le milieu est pauvre en fer afin d'aller le capturer. Une courbe de croissance en milieu RPMI sans  $\text{Fe}^{3+}$  a été réalisée pour chaque mutant du système d'acquisition de fer afin de vérifier si la croissance est affectée par ces mutations. Les résultats présentés (Figure 12) indiquent qu'aucune des souches mutantes n'est affectée par l'absence de fer dans le milieu.



**Figure 14 : Courbes de croissance en milieu minimal RPMI.** Les densités optiques de chaque souche furent prises à un intervalle de 15 minutes pendant 18h. Chaque courbe représente une moyenne de trois réplicats techniques.

### 1.5. Test de sensibilité au peroxyde d'hydrogène

Le stress oxydatif est une réaction de la cellule à un radical libre toxique, comme le peroxyde d'hydrogène. Les microorganismes aérobies sont souvent exposés à ces agents toxiques, mais ils possèdent un système complexe de détoxification permettant de bloquer l'agression dû au stress. Afin de vérifier si une des mutations du système d'acquisition de fer affecte la réponse au stress oxydatif, un test de sensibilité au peroxyde d'hydrogène a été effectué pour chaque souche mutante. La zone d'inhibition représente le diamètre autour du peroxyde d'hydrogène (Figure 25 ANNEXE) qui s'est formé où les souches n'ont pas réussi à croître. Les résultats présentés (Figure 15) permettent de conclure que la délétion du locus *iro* ainsi que de chacune de ses composantes n'affecte pas la réponse au stress oxydatif induit par le réactif oxygéné. La zone d'inhibition est similaire à celle de la souche sauvage pour toutes les souches mutantes.



**Figure 15 : Sensibilité au peroxyde d'hydrogène lors de la réponse au stress oxydatif.** La zone d'inhibition a été mesurée autour du disque contenant le peroxyde d'hydrogène après 18 heures d'incubation. Chaque bande représente une moyenne de trois réplicats techniques.

## **2. Adhésion et invasion de cellules épithéliales humaines**

### **INT-407**

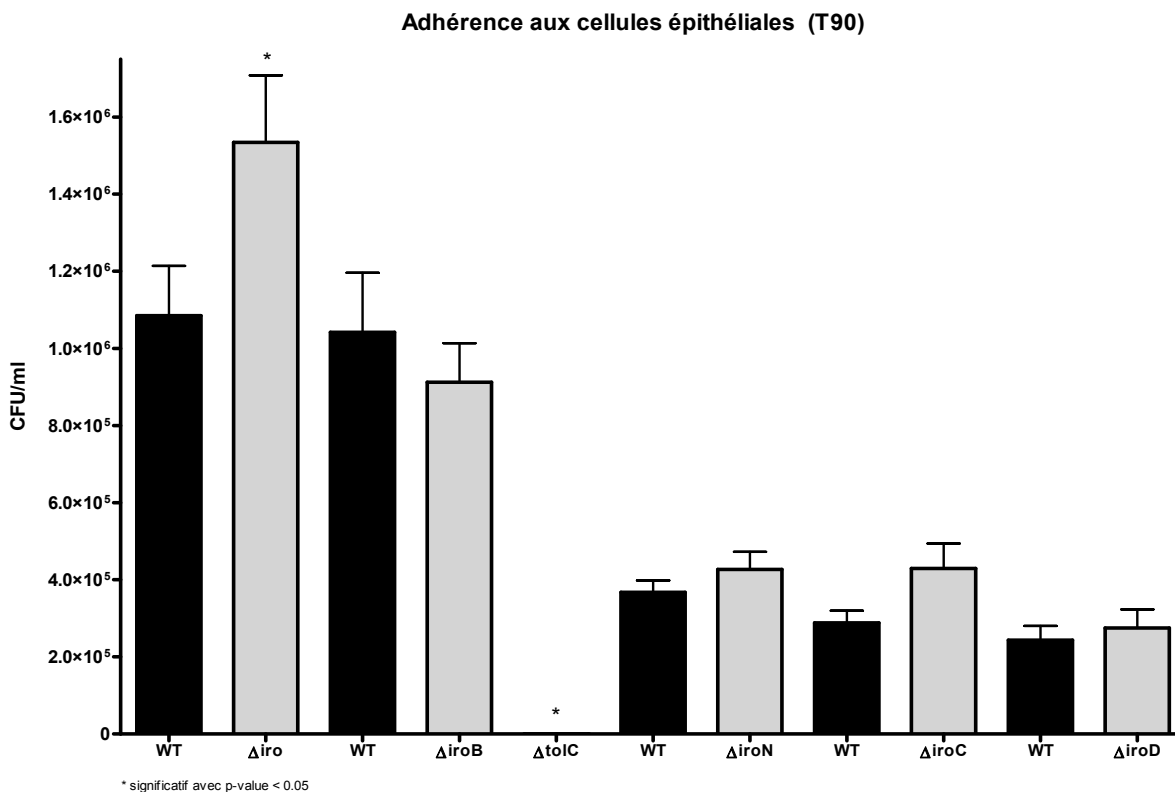
L'adhérence aux cellules épithéliales humaines INT-407 ainsi que l'invasion permet d'observer les premières étapes de l'infection par *Salmonella* Typhi. Dans l'intestin, les bactéries adhèrent aux cellules épithéliales afin de passer la barrière par endocytose. *In vitro*, on observe ces deux événements par l'infection de cellules épithéliales afin de déterminer l'importance de chaque composante du système d'acquisition de fer.

#### **2.1. Adhérence aux cellules épithéliales**

L'interaction avec les cellules épithéliales commence par l'adhésion à celles-ci. Cette première étape correspond au nombre de bactéries qui se sont associées aux cellules après 90 minutes d'interaction (T90). L'analyse permet de comparer la capacité de chaque mutant à adhérer aux cellules comparativement à la souche sauvage, afin de déterminer si cette étape de l'infection est affectée par les mutations.

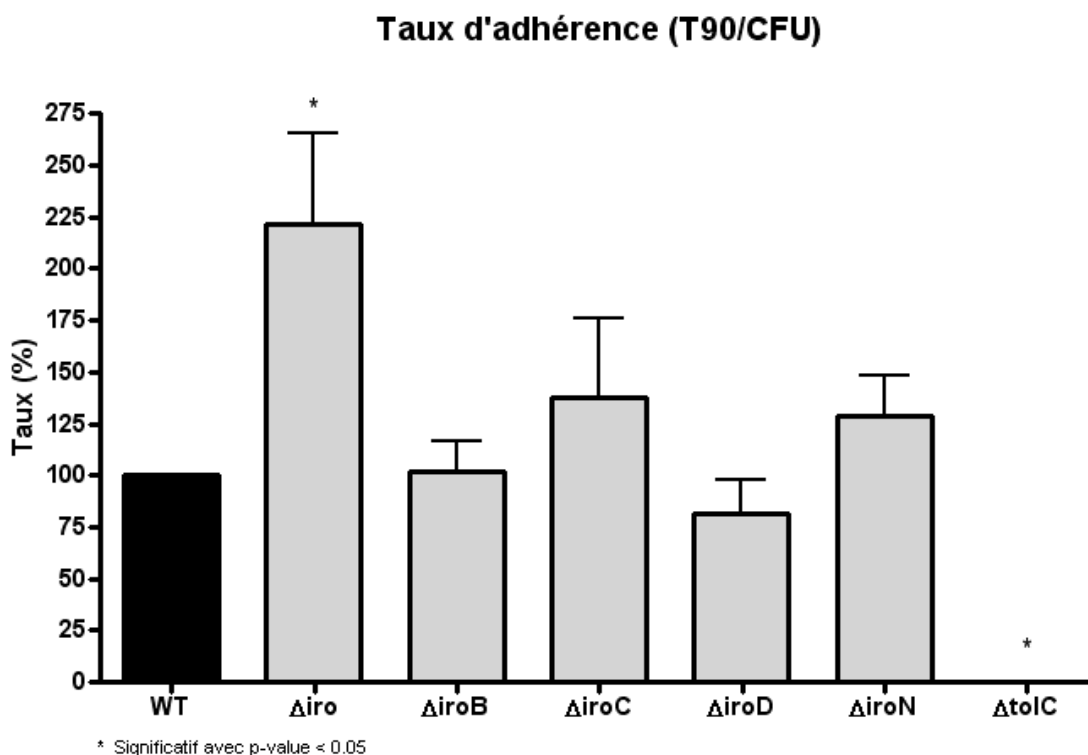
Les résultats démontrent que certaines délétions affectent la capacité d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales (Figure 16). La délétion du locus *iro* ( $\Delta iro$ ) augmente significativement la capacité d'adhésion face à la souche sauvage,

mais cette différence est très mince. Lorsque chacune des composantes du système d'acquisition de fer est mutée individuellement, aucune différence n'est observée. Un fort phénotype est observé chez la souche  $\Delta to/C$ , où une absence totale d'adhésion est obtenue.



**Figure 16 Représentation de l'adhérence aux cellules épithéliales INT-407 en UFC/ml.** Les données présentées sont le nombre d'unité de colonies formé par millilitre  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au minimum 3 expériences en duplicatas. Chaque souche mutante a été testé en parallèle avec la souche sauvage (WT) et sont représentées en paires. L'UFC/ml est déterminé par le nombre de bactéries qui ont adhérees aux cellules à 90 minutes. Les résultats ont été soumis au T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

Le taux d'adhérence de chaque mutant pour le système d'acquisition de fer ont été déterminés (Figure 17). On obtient les mêmes conclusions que précédemment en UFC. La souche mutante  $\Delta iro$  adhère plus facilement aux cellules épithéliales humaines, alors que  $\Delta toIC$  n'adhère point par rapport à la souche sauvage.

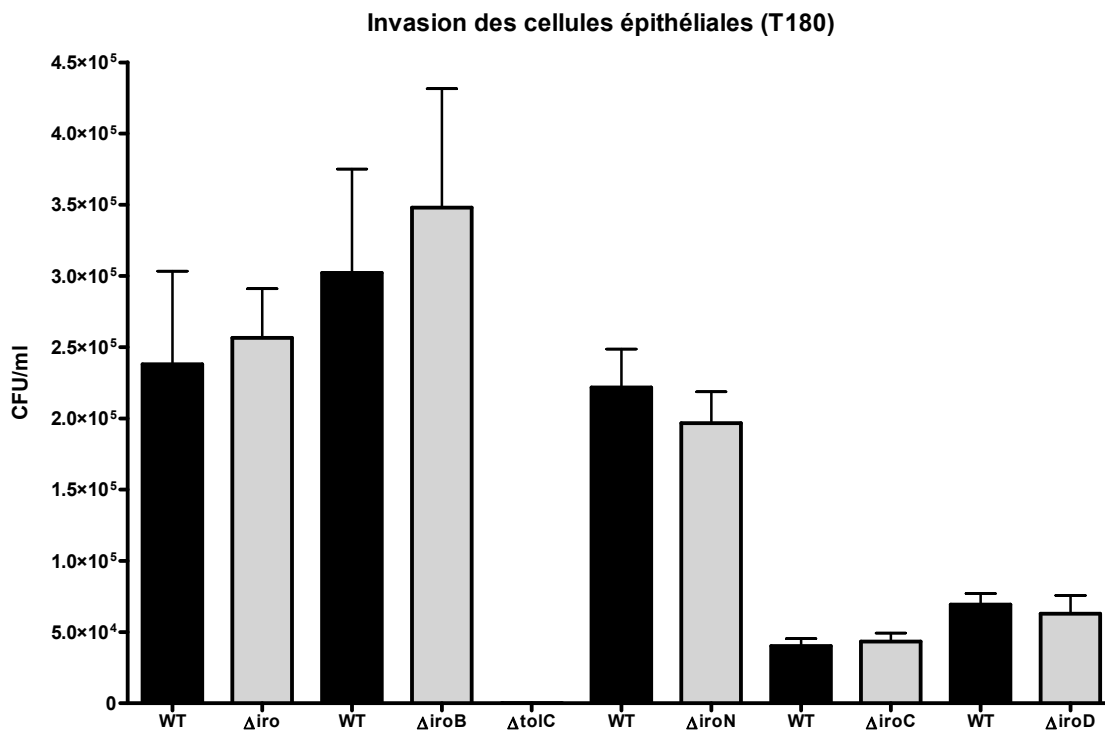


**Figure 17 : Taux d'adhérence aux cellules épithéliales INT-407.** Les données présentées sont le taux  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au minimum 3 expériences en duplicatas. Le taux est obtenu en comparant le nombre de bactéries qui ont adhéré après 90 minutes avec le nombre de bactéries ayant été inoculé initialement dans les puits. Les résultats ont été soumis au T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

## 2.2. Invasion des cellules épithéliales

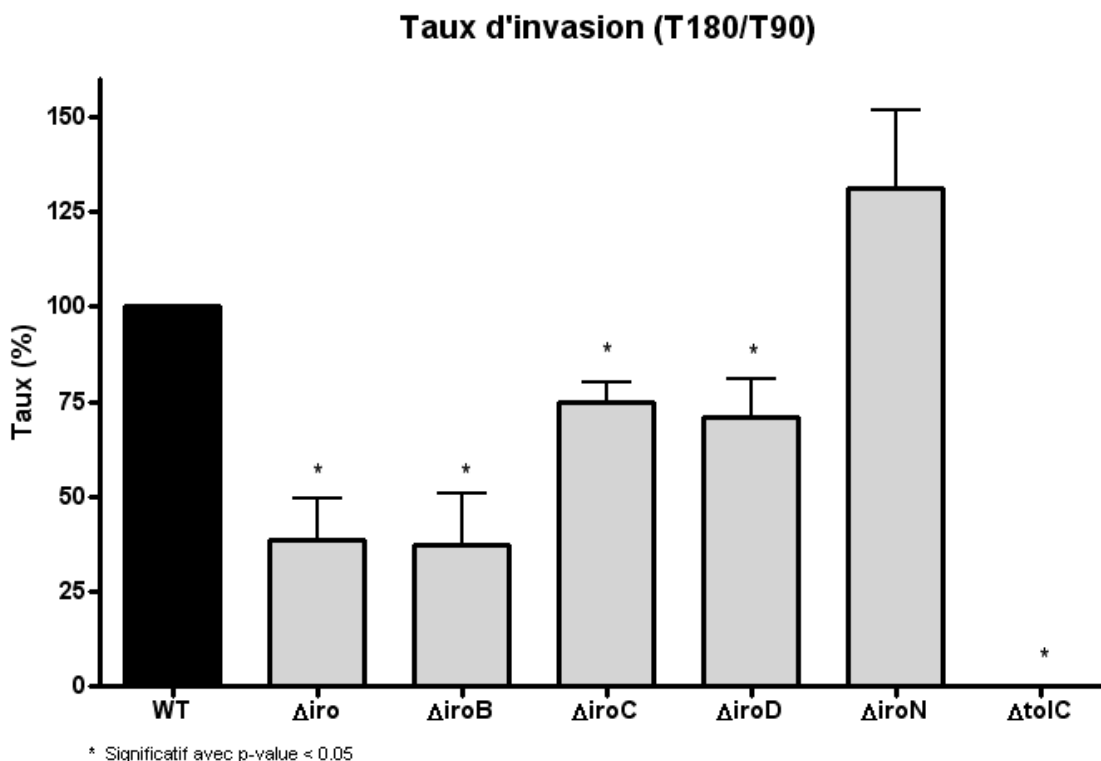
L'invasion des cellules par les bactéries est l'étape suivant l'adhésion lors de l'infection. C'est après 180 minutes (T180) que les bactéries vont réussir à s'infiltrer dans les cellules non-phagocytaires afin de passer la barrière épithéliale de l'intestin. L'analyse permet de comparer la capacité de chaque mutant d'invasion des cellules comparativement à la souche sauvage, afin de déterminer si cette étape de l'infection est affectée par les mutations.

Suite à l'analyse des données d'invasion (Figure 18), aucune différence entre les souches mutantes et la souche sauvage n'est mesurée pour le locus *iro* et ses composantes. Toutefois, comme pour l'adhésion, une absence totale de la capacité d'invasion des cellules est observable lorsque *tolC* est délété.



**Figure 18 : Représentation de l'invasion des cellules épithéliales INT-407 en UFC/ml.** Les données présentées sont le nombre d'unités de colonies formé par millilitre  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au minimum 3 expériences en duplicatas. Chaque souche mutante a été testée en parallèle avec la souche sauvage (WT) et est représentée en paires. L'UFC/ml est déterminé par le nombre de bactéries intracellulaires à 180 minutes. Les résultats ont été soumis au T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

Les résultats illustrés en taux (Figure 19) démontrent une diminution de la capacité d'invasion des cellules épithéliales chez les souches  $\Delta iro$ ,  $\Delta iroB$ ,  $\Delta iroC$  et  $\Delta iroD$ . Le nombre de bactéries ayant envahi les cellules par rapport au nombre ayant adhéré et donc inférieur à la souche sauvage, sauf pour  $\Delta iroN$ . La délétion de  $\Delta tolC$  donne, comme en UFC, une absence totale de l'invasion des cellules.



**Figure 19 Taux d'invasion des cellules épithéliales INT-407.** Les données présentées sont le taux  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au minimum 3 expériences en duplicatas. Le taux est obtenu en comparant le nombre de bactéries intracellulaires après 180 minutes avec le nombre de bactéries ayant adhéré après 90 minutes. Les résultats ont été soumis au T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

### 3. Phagocytose et survie dans les macrophages humains THP-1

*Salmonella* Typhi est une bactérie intracellulaire facultative. Lors de l'infection, les bactéries traversent la barrière intestinale et sont phagocytées par les macrophages. Après la phagocytose, les bactéries se multiplient dans les macrophages et disséminent vers le foie et la rate. *In vitro*, l'infection de macrophages humains indique la capacité des bactéries à se faire phagocyter ainsi

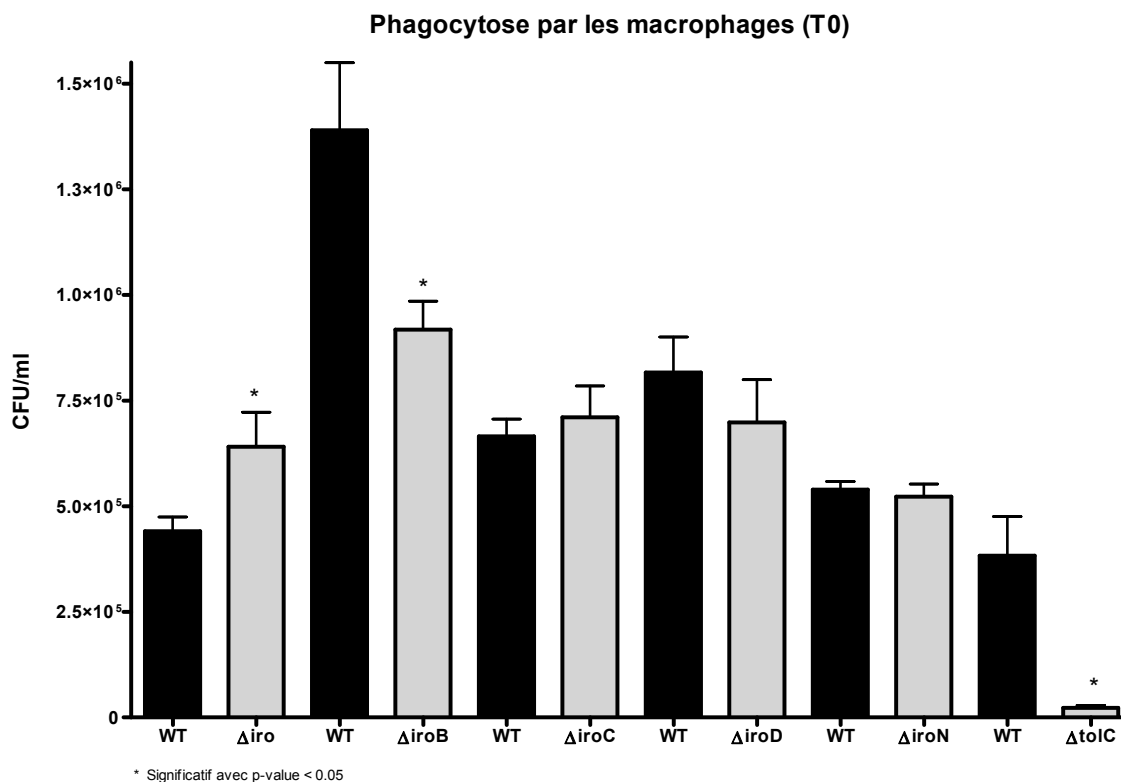


que la survie intracellulaire, ce qui est important pour la virulence. Les souches mutantes sont comparées à la souche sauvage afin d'évaluer leur capacité de phagocytose et de survie.

### **3.1. Phagocytose par les macrophages humains**

La phagocytose des bactéries par les macrophages est une étape clé de la pathogenèse chez *S. Typhi*. Les résultats présentés en UFC et en taux correspondent au nombre de bactéries qui ont été phagocytées après 20 minutes (T0) d'interaction avec les cellules phagocytaires.

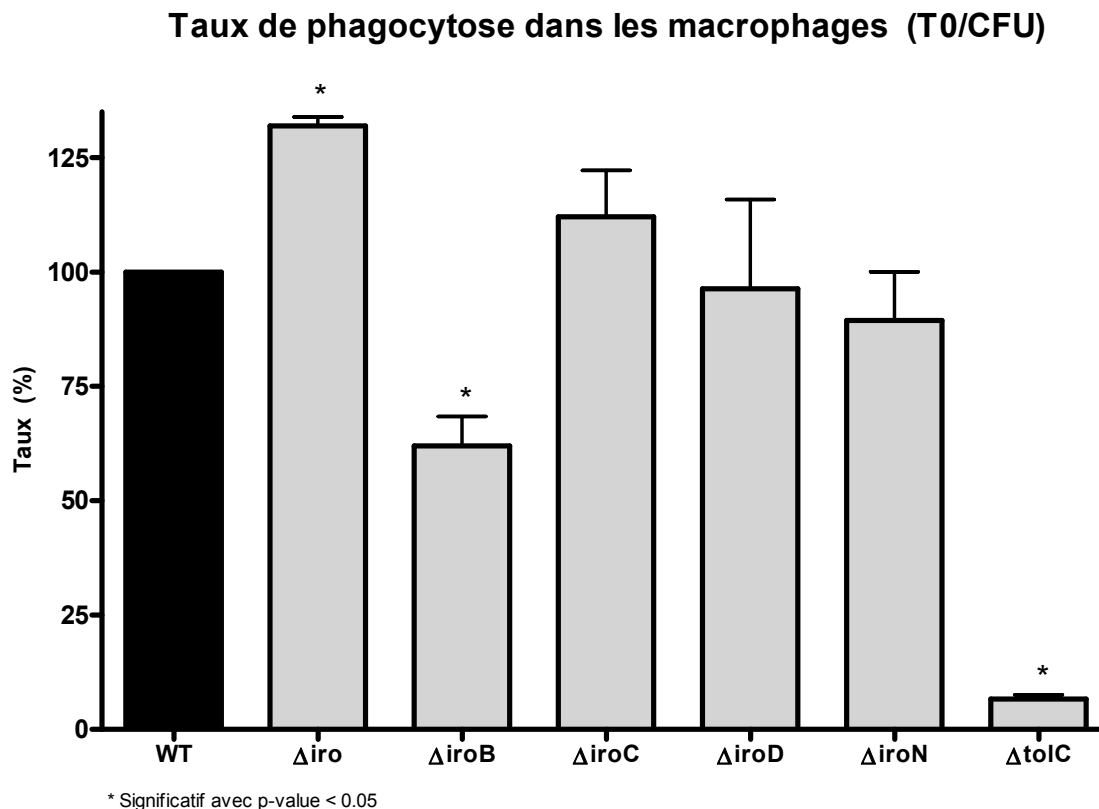
Les résultats obtenus (Figure 20) indiquent que le mutant  $\Delta iro$ , dont tout le système d'acquisition de fer est absent, a une augmentation significative de la capacité à être phagocyté par rapport à la souche sauvage. On observe le contraire pour la souche mutante  $\Delta iroB$  qui est moins facilement phagocytée par les macrophages. C'est également le cas de  $\Delta toIC$  qui est à peine phagocyté.



**Figure 20 : Représentation de la phagocytose dans les macrophages humains THP-1 en UFC/ml.** Les données présentées sont le nombre d'unités de colonies formé par millilitre  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au minimum 3 expériences en duplicatas. Le UFC/ml est déterminé par le nombre de bactéries intracellulaires à 20 minutes. Les résultats ont été soumis au T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

Le taux de phagocytose de chaque mutant pour le système d'acquisition de fer ont été déterminés (Figure 21). On obtient les mêmes conclusions que précédemment en UFC. La souche mutante *Δiro* est plus facilement phagocytée par

les macrophages humains, alors que  $\Delta iroB$  et  $\Delta toIC$  sont beaucoup moins phagocytés par rapport à la souche sauvage.

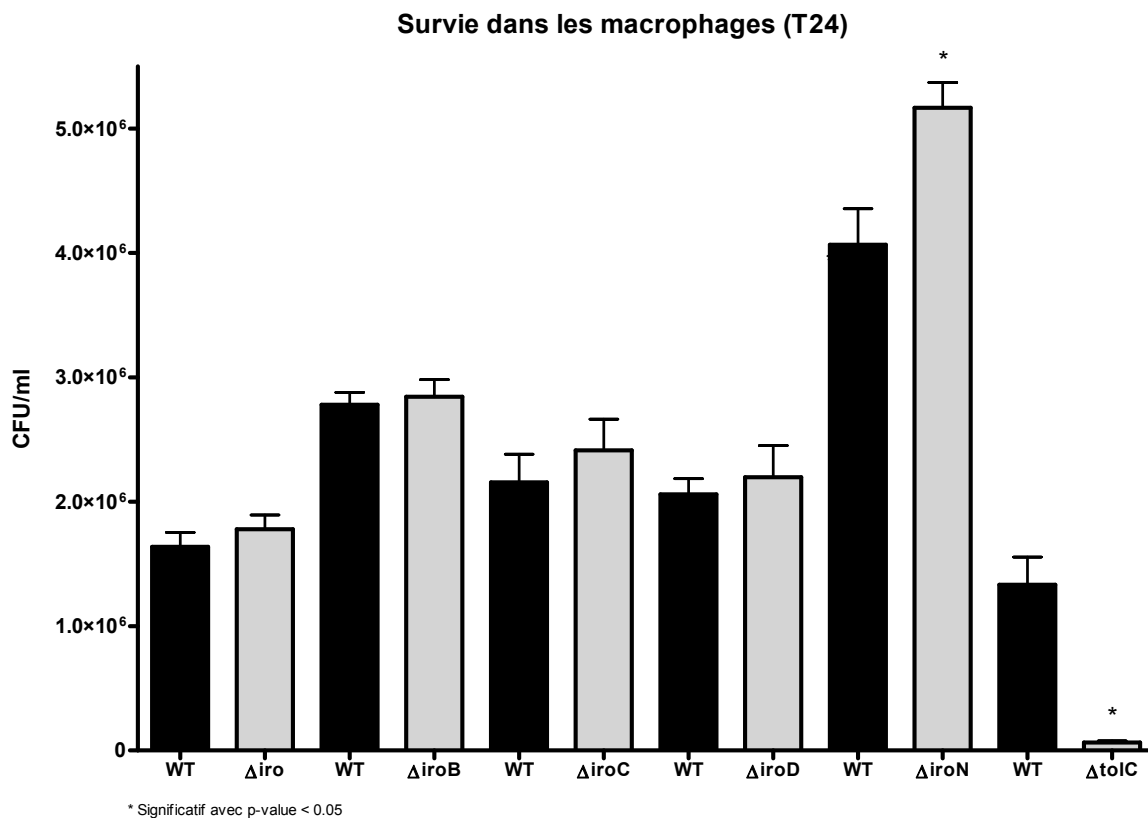


**Figure 21 : Taux de phagocytose dans les macrophages THP-1.** Les données présentées sont le taux  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au minimum 3 expériences en duplicatas. Le taux est obtenu en comparant le nombre de bactéries intracellulaires après 20 minutes d'interaction avec les macrophages avec le nombre de bactéries ayant été inoculé initialement dans les puits. Les résultats ont été soumis au T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

### 3.2. Survie dans les macrophages humains

La capacité de *S. Typhi* à disséminer et causer une maladie systémique dépend de la modification du macrophage afin de survivre à l'intérieur et de s'y multiplier. Les résultats présentés en UFC et en taux correspondent au nombre de bactéries qui ont survie à l'intérieur des macrophages 24 heures (T24) d'interaction avec les cellules phagocytaires.

L'analyse des résultats obtenus (Figure 22) après 24 heures de survie intracellulaire indique que la survie n'est pas liée nécessairement aux résultats de la phagocytose. En effet, les souches mutantes ont la même capacité de survie que la souche sauvage, excepté  $\Delta iroN$  et  $\Delta toIC$ . La délétion du gène *toIC* semble entraîner une diminution de la phagocytose ainsi que de la survie. Alors que la délétion du gène *iroN* procure l'avantage à la souche d'augmenter sa survie dans le macrophage.

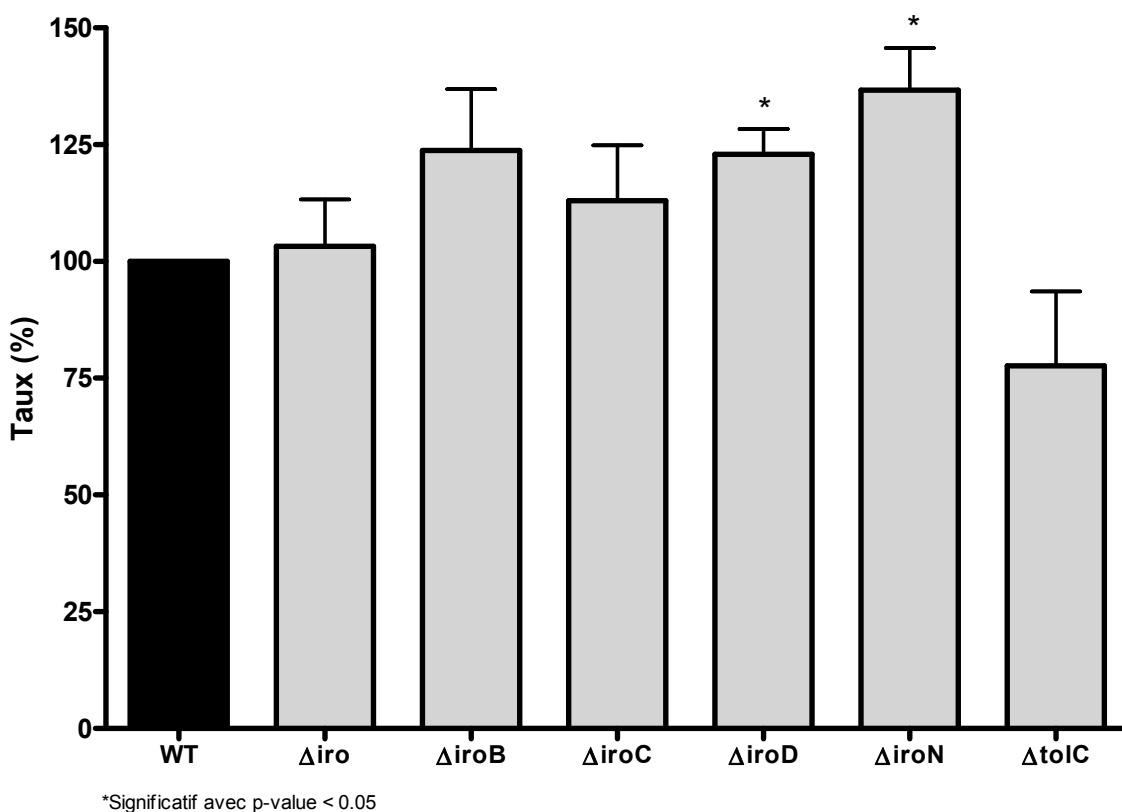


**Figure 22 : Représentation de la survie dans les macrophages humains THP-1 en UFC/ml.** Les données présentées sont le nombre d'unité de colonies formé par millilitre  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au minimum 3 expériences en duplicatas. Le UFC/ml est déterminé par le nombre de bactéries intracellulaires après 24 heures. Les résultats ont été soumis au T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

Le taux de survie de chaque mutant pour le système d'acquisition de fer ont été déterminés (Figure 23). La souche mutante *ΔiroN* a une plus grande capacité de survie dans les macrophages humains, autant en UFC qu'en taux. Toutefois, en taux, *ΔtoIC* semble voir sa capacité de survie se rétablir. En effet, le nombre de bactéries

ayant survécus par rapport au nombre de bactéries ayant été phagocytés est le même que la souche sauvage. Étonnamment, on observe un phénotype chez le mutant  $\Delta iroD$  qui n'est pas présent en UFC (Figure 22). La survie est significativement augmentée par rapport au nombre de bactéries ayant été phagocytés.

### Taux de survie dans les macrophages (T24/T0)

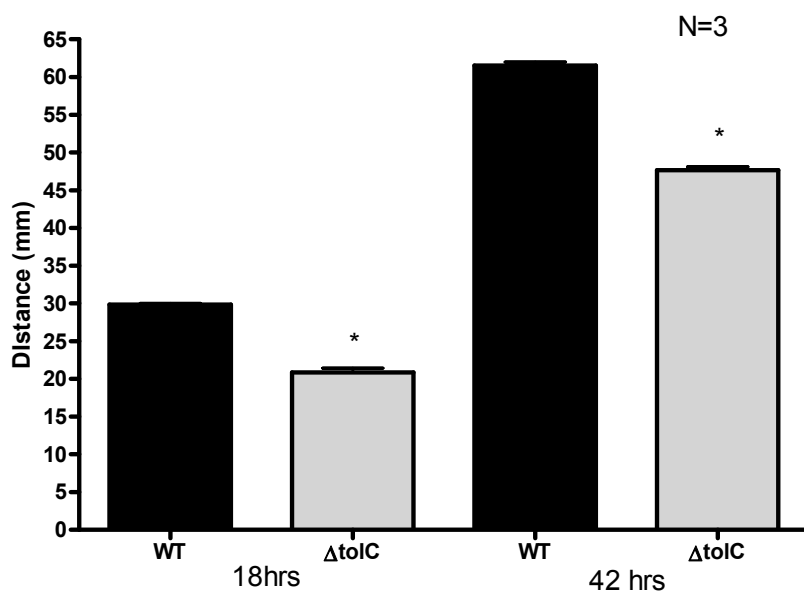


**Figure 23 : Taux de survie dans les macrophages THP-1.** Les données présentées sont le taux  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au minimum 3 expériences en duplicatas. Le taux est obtenu en comparant le nombre de bactéries intracellulaires après 24 heures d'interaction avec les macrophages avec le nombre de bactéries

intracellulaires à 20 minutes. Les résultats ont été soumis au T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

#### **4. Test de mobilité**

La capacité d'une bactérie à se déplacer peut être un facteur important lors d'une infection. Chez *S. Typhi*, la mobilité régit par ses flagelles est importante pour la pathogenèse et l'adhésion aux cellules épithéliales. La délétion du gène *toIC* empêche la bactérie d'adhérer aux cellules épithéliales humaines INT-407 (Figure 24). Un test de mobilité a été effectué afin de vérifier si l'absence de *ToIC* affecte la capacité de la souche à se déplacer par rapport à la souche sauvage. Après 18 et 42 heures, la distance de migration des deux souches est nettement différente. La souche  $\Delta toIC$  est moins mobile que la souche sauvage.



**Figure 24 : Mobilité de la souche mutante  $\Delta toIC$ .** La mobilité est représentée par la moyenne des distances de migrations mesurées sur gélose 0.3% après 18 et 42 heures d'incubation pour la souche mutante et la souche sauvage. Les essais ont été réalisés en triplicata et sont significatif lorsque  $P < 0.05$  (\*) suite à un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).



## DISCUSSION

La fièvre typhoïde, causée par l'agent pathogène *Salmonella* Typhi, est une maladie létale dans les pays endémiques. Elle est la cause de millions de morts et à ce jour, aucun vaccin n'est suffisamment efficace, surtout pour les pays les plus touchés. La résistance aux antibiotiques qui ne fait qu'augmenter devient alarmante et le besoin d'un vaccin efficace s'impose. L'étude plus approfondie de la bactérie est essentielle afin de bien comprendre les mécanismes qui lui permettent de causer une maladie systémique et mortelle. Le problème majeur de son étude relève de sa capacité à infecter seulement l'humain. Cela signifie qu'aucun modèle animal ne peut reproduire la fièvre entérique. Un modèle murin est disponible, mais il est très peu adéquat, car il utilise *S. Typhimurium*. Ce modèle permet d'observer une maladie systémique qui mime quelques caractéristiques de *S. Typhi*, mais aucune étude ne permet d'étudier le rôle des gènes propres à *S. Typhi*. Néanmoins, la similarité entre les deux sérovars permet de comprendre quelques mécanismes de virulence utilisés par les deux pathogènes. Il est primordial d'approfondir nos connaissances sur les gènes de virulence et les mécanismes utilisés par la bactérie qui lui permettent de causer une maladie systémique.

L'objectif de cette étude était de cibler un des facteurs de virulence utilisés par *S. Typhi* afin de survivre chez son hôte. La capacité du pathogène à se procurer du fer dans son milieu par un système d'acquisition de fer qui n'est pas reconnue par les cellules immunitaires est encore peu connue. La caractérisation ainsi que la délétion

du système et de ses composantes nous ont permis de mieux comprendre l'effet sur la virulence que chacun possède.

Dans le but de caractériser le système d'acquisition de fer par les salmochélines, les résultats recueillis démontrent une relation relative à la virulence. La délétion du système en entier a permis d'identifier certains effets lorsque la souche mutante interagit avec les cellules humaines cibles d'une infection systémique. Suite à ces résultats, la délétion de chacune des composantes du système a été effectuée et certaines souches mutantes ont démontré un effet avec les mêmes cellules humaines. Une des composantes du système d'acquisition de fer qui permet l'export des salmochélines est encore inconnue. La caractérisation de TolC, responsable de l'export de l'entérobactine, a été effectuée puisque cette pompe à efflux était un candidat potentiel. La délétion du gène codant TolC a permis d'observer d'importants effets tant sur la mobilité de la bactérie que lors de l'interaction avec des cellules humaines.

## **1. Courbe de croissance en milieu LB**

Afin de vérifier si les souches mutantes ont un défaut de croissance en milieu LB, une courbe de croissance a été réalisée pour chacune d'elles. La délétion du locus *iro* ainsi que de ses composantes individuelles n'engendre aucun défaut de croissance (Figure 11). Ce ne sont donc pas des gènes essentiels ni requis dans un milieu riche utilisé fréquemment dans les laboratoires. Le milieu LB contient du fer, ce qui ne nécessite donc pas d'aller le capturer. Le locus *iro* est étroitement régulé et

n'est utilisé qu'en condition de carence en fer et c'est pourquoi aucun phénotype n'est observé. Dans les travaux de Thanassi chez *Francisella tularensis*, la délétion de *tolC* affecte la capacité de croissance de la bactérie en milieu riche (29). Toutefois, chez *S. Typhi* ce ralentissement de croissance n'est pas observé. On retrouve aussi cette absence de phénotype en milieu riche chez *E. coli* où la pompe à efflux TolC est manquante (97).

## **2. Courbe de croissance en milieu LB avec 2,2`-Dipyridyl**

Le système d'acquisition de fer par les salmochélines étant exprimé seulement en conditions de carence en fer, la croissance des souches mutantes a été vérifiée en milieu riche limité en fer par l'ajout d'un chélateur. L'ajout du chélateur de fer permet la séquestration de l'élément et permet de comparer l'expression du système chez les souches mutantes avec la souche sauvage. La délétion du locus *iro* en entier, ainsi que de ses gènes de façon individuelle, ne semble pas affecter la croissance en milieu riche limité en fer (Figure 12). L'absence des salmochélines ou d'une des composantes de son système n'affecte donc pas la croissance et par conséquent, ne sont pas des gènes essentiels dans ces conditions. On observe toutefois un défaut de croissance chez la souche mutante  $\Delta toI/C$ . En milieu limité en fer, la souche ne peut donc croître normalement et cesse de se multiplier (Figure 12), bien que le milieu soit riche. La pompe TolC étant responsable de la sécrétion de l'entérobactine est probablement reliée aussi à la sécrétion des salmochélines, vu le phénotype d'arrêt de la croissance.

### 3. Courbe de croissance en milieu RPMI avec et sans fer

Après avoir effectué une courbe de croissance en milieu défini RPMI avec fer et sans aucune trace de fer, on constate que les souches mutantes ne démontrent aucun défaut de croissance (Figure 13, Figure 14). L'absence de défaut de croissance par rapport à la souche sauvage chez les mutants suggère qu'ils ne sont pas affaiblis ou désavantagés par l'absence du système codé par *iro* ou l'une de ses composantes. *S. Typhi* possède également l'entérobactine qui est fonctionnelle et sécrétée lors de carence en fer. La croissance des souches ne dépend donc pas du locus *iro* et la présence d'un autre système d'acquisition de fer suffit à la bactérie pour croître normalement. Par opposition aux résultats des courbes effectuées en milieu riche LB limité en fer (Figure 12), la souche  $\Delta to/C$  ne démontre aucun défaut de croissance quand le fer est limité dans le milieu défini RPMI.

### 4. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un effet de la cellule induit par des radicaux libres. Ce phénomène est néfaste et létal pour la bactérie. La zone d'inhibition où la croissance est empêchée par l'agent toxique est la même pour toutes les souches mutantes et la souche sauvage (Figure 15). Les gènes contenus dans le système des salmochélines ne sont donc pas impliqués dans la réponse au stress oxydatif. Lors d'une infection bactérienne, les macrophages produisent ces agents toxiques et causent la mort de

la bactérie en induisant le stress oxydatif (98). La diminution de la capacité de virulence de la souche  $\Delta\text{tolC}$  (Figure 16, Figure 18, Figure 20 et Figure 22) observée lors de l'adhésion et de l'invasion des cellules épithéliales, ainsi que lors de la phagocytose et de la survie dans les macrophages n'est donc pas due à la mort cellulaire causée par le stress oxydatif.

## 5. Adhésion et invasion de cellules épithéliales

Les systèmes d'acquisition de fer par les salmochélines et l'entérobactine ont été surtout étudiés chez *S. Typhimurium* et *E. coli*. Les études portant sur l'implication de ces deux systèmes dans la virulence ont été effectuées *in vivo* dans des modèles animaux. En 2008, il a été établi que la délétion de *iroBCDEN* chez *E. coli* réduit la capacité de la bactérie à infecter les tissus chez un modèle aviaire (52). En effet, la souche mutante ne put être isolée dans les poumons ou le foie, mais se retrouvait en infime quantité dans la rate. De plus, chez des souris atteintes de la maladie systémique de *Salmonella*, on observe une diminution accrue de la virulence lorsqu'elles sont infectées par une souche déficiente dans la synthèse ou la sécrétion des salmochélines (61). Ceci suggère une implication du locus *iro* dans la virulence chez *S. Typhimurium* et *E. coli*. Toutefois, le locus n'a pas été caractérisé et son rôle reste inconnu chez *S. Typhi* au niveau de l'interaction avec les cellules épithéliales humaines INT-407. Les résultats indiquent une implication du locus *iro* et de TolC à l'étape critique de l'adhésion aux cellules. L'étape suivante de l'infection, soit l'invasion des cellules épithéliales, indique une différence significative en taux entre les souches mutantes  $\Delta\text{iro}$ ,  $\Delta\text{iroB}$ ,  $\Delta\text{iroC}$  et  $\Delta\text{iroD}$  et la souche sauvage, indiquant un

implication à ce niveau. La souche  $\Delta to/C$  présente le même phénotype rencontré lors de l'adhérence, soit une perte totale de la capacité d'invasion.

L'augmentation significative de l'adhésion (Figure 16) aux cellules épithéliales humaines du mutant  $\Delta iro$ , où *iroBCDEN* est délété, indique que *S. Typhi* adhère mieux aux cellules épithéliales lorsque les salmochéline et son mécanisme sont absents. Néanmoins, la délétion individuelle de chaque gène du locus n'indique aucune augmentation de l'adhésion aux cellules épithéliales. Ces résultats montrent que c'est uniquement l'absence du système au complet qui est responsable de l'augmentation de l'adhésion. À ce jour, aucune relation n'a été discernée entre les salmochélines et l'adhésion aux cellules épithéliales chez *Salmonella Typhi*.

Bien que le mutant de délétion du locus *iro* ( $\Delta iro$ ) adhère mieux aux cellules épithéliales, on observe une diminution du taux d'invasion par rapport à la souche sauvage (Figure 18). Cette diminution de l'invasion est retrouvée aussi chez les souches  $\Delta iroB$ ,  $\Delta iroC$  et  $\Delta iroD$ . Pourtant, il a été démontré que le récepteur des salmochélines IroN joue un rôle lors de l'invasion des cellules épithéliales. Cette étude *in vitro* chez *E. coli* extraintestinale suggère l'implication du gène *iroN* lors de l'invasion, car sa délétion diminue la capacité d'invasion de la souche mutante (73). Étant situé à la membrane externe, le récepteur IroN est reconnu par le système immunitaire et agit comme antigène. Or, chez *S. Typhimurium*, il a été démontré que la délétion d'*iroN* n'affecte en rien la virulence (94). Dans cette étude, aucun phénotype n'a été observé pour la souche mutante  $\Delta iroN$ . On retrouve donc le même effet que chez *S. Typhimurium*. La viabilité des souches  $\Delta iro$ ,  $\Delta iroB$ ,  $\Delta iroC$  et  $\Delta iroD$  ne peut être la raison de la baisse du nombre de bactéries, car les cellules sont

incubées avec le milieu RPMI dont les courbes de croissance ont été effectuées et aucun défaut n'a été reporté (Figure 14). De plus, ces résultats concordent avec la littérature, puisque les résultats des études portant sur ce groupe de gènes chez d'autres entérobactéries illustrent une atténuation de la virulence. Il existe donc une relation entre l'adhérence, l'invasion et le mécanisme de sécrétion, d'export et d'import des salmochélines.

Bien que *toIC* ne fasse pas partie du locus *iro*, l'interaction avec les cellules épithéliales humaines a été vérifiée. Ce gène code la pompe à efflux TolC responsable de l'export de l'entérobactine, le sidérophore précurseur des salmochélines. Le gène responsable de l'export de la salmochéline est encore inconnu et *toIC* semble être impliqué. Chez *Francisella tularensis*, des infections de cellules épithéliales *in vitro* ont été effectuées avec un mutant de délétion du gène *toIC* (29). Les résultats illustrent une diminution accrue de la capacité d'adhésion et d'invasion aux cellules épithéliales. Ce phénomène est causé par une mort cellulaire excessive chez l'hôte. Le pathogène ne peut donc plus se répliquer à l'intérieur des cellules et peut être ainsi éliminé par le système immunitaire de l'hôte (29). Chez *S. Typhi*, on observe une incapacité totale à adhérer aux cellules (Figure 16, Figure 17). Cette perte de la capacité d'adhésion peut être provoquée par l'impossibilité de la bactérie à sécréter l'entérobactine et la salmochéline. Cependant, TolC est une pompe à efflux non spécifique qui est impliquée dans une multitude de mécanismes, comme l'export d'antibiotiques contribuant à la résistance (MDR). La délétion de *toIC* empêche plusieurs voies d'exportation et on ne peut conclure que le phénotype est lié à l'export des sidérophores. Or, la viabilité de la souche mutante ne peut être la

cause de la perte totale d'adhésion aux cellules puisque les cellules sont incubées avec le milieu RPMI dont les courbes de croissance ont été effectuées et aucun défaut n'a été reporté (Figure 14). Les résultats de l'invasion des cellules épithéliales par la souche  $\Delta tolC$  montrent une perte totale de la capacité d'invasion. Il va de soi que ce résultat est relié à l'incapacité d'adhésion, puisque les bactéries ne peuvent pénétrer les cellules sans y adhérer.

## 6. Phagocytose et survie dans les macrophages

Il a été déterminé dans les travaux de Dozois que le locus *iro* a un rôle dans la virulence, puisque la délétion de ce groupe de gènes diminue significativement la capacité d'infecter les tissus de l'hôte chez *E. coli* et *S. Typhimurium* (52). Le rôle du système d'acquisition de fer par les salmochélines chez *S. Typhi* est mal connu par rapport à son implication lors de l'interaction avec les macrophages. Cette cellule immunitaire est modifiée par *Salmonella* à son insu afin qu'il puisse s'y répliquer. La bactérie survie à l'intérieur du macrophage dans une vacuole (SCV) et peut ainsi disséminer vers le foie et la rate sans être reconnue par le système immunitaire.

Les résultats obtenus en UFC (Figure 20) et en taux (Figure 21) démontrent que la délétion du locus  $\Delta iro$ ,  $\Delta iroB$  et  $\Delta tolC$  affecte la phagocytose par les macrophages. Les macrophages phagocytent plus facilement la souche qui ne possède pas le système entier d'acquisition de fer. Puisque c'est à l'avantage de la bactérie pathogène d'être phagocyté par le macrophage afin d'y résider, les résultats démontrent donc une augmentation de la virulence chez la souche mutante. *In vivo*,



les études démontrent une diminution de la virulence, mais pas à ce stade de l'infection. C'est plutôt au niveau de la dissémination et de la survie où le locus joue un rôle. Afin de vérifier si le phénotype de la délétion du système d'acquisition de fer en entier, ou de l'une de ses composantes, l'interaction au niveau de la phagocytose a été observée pour chacune d'elles.

Étonnamment, la souche  $\Delta iroB$  dont la délétion empêche la synthèse des salmochélines est moins facilement phagocytée par les macrophages. Sans les salmochélines, *S. Typhi* est donc moins virulente par rapport à la souche sauvage. Toutefois, *in vivo* il a été démontré que dans une souche  $\Delta iro$  chez *E. coli*, la complémentation par *iroC*, *iroDE* ou *iroN* est obligatoire afin de restaurer la virulence (52). Dans le cas de *S. Typhi*, IroB ne semble donc pas être nécessaire lors d'une infection. Néanmoins, l'absence des salmochélines est un désavantage pour la bactérie, car il ne possède que l'entérobactine qui est reconnue par le système immunitaire et empêche la capture du fer par la bactérie. Les résultats de la souche  $\Delta iro$  semblent ne pas être liés à  $\Delta iroB$  et portent à croire que c'est l'absence du locus en entier plutôt que l'ensemble des résultats de ses composantes individuelles qui est responsable du phénotype obtenu.

L'analyse des résultats en UFC (Figure 20) et en taux (Figure 21) indique pour la souche  $\Delta toIC$  une diminution importante de la capacité de phagocytose par les macrophages. Chez *Legionella pneumophila*, la délétion de *toIC* entraîne une diminution de la virulence lors de l'interaction avec les macrophages (99). Il a été démontré que TolC joue un rôle crucial dans la virulence puisqu'il est présent dans plusieurs mécanismes de pompes à efflux. Cette diminution accrue de la

phagocytose pourrait être liée au blocage de la sécrétion des salmochélines et de l'entérobactine dans le milieu externe.

Lorsque *S. Typhi* se retrouve dans les macrophages, elle modifie son environnement afin d'y survivre et de disséminer. Cette étape est essentielle à la pathogénèse de la bactérie, car elle provoque à ce stade une maladie systémique. Les souches  $\Delta iroD$ ,  $\Delta iroN$  et  $\Delta tolC$  ont provoquées un effet lors de la survie dans les macrophages (Figure 22). Bien que la souche  $\Delta iro$  était plus phagocytée, le nombre de bactéries intracellulaires après 24 heures est le même que chez la souche sauvage. Donc, ensemble, ces résultats illustrent l'absence d'un rôle du locus *iro* dans la capacité de virulence avec les macrophages. La même situation est retrouvée avec la souche  $\Delta iroB$  où la phagocytose était diminuée. Au niveau de la survie, le décompte de bactérie intracellulaire est similaire à la souche sauvage. Donc, *IroB* n'a pas de rôle dans la capacité de virulence avec les macrophages.

L'analyse des résultats en UFC (Figure 22) et en taux (Figure 23) de la souche  $\Delta iroN$  et seulement en taux pour  $\Delta iroD$  illustre une augmentation de la survie intracellulaire après 24 heures d'interaction avec les macrophages. Chez *S. Typhimurium*, la délétion d'*iroN* n'a aucun effet sur la virulence dans un modèle murin (94). C'est plutôt l'absence des trois récepteurs (Cir, FepA et IroN), ne permettant aucun import des sidérophores, qui a un impact. L'hydrolase IroD semble jouer un rôle prédominant dans la virulence, lorsque comparé à IroE selon l'étude *in vivo* portant sur *E. coli* (100). Ici cependant, la capacité de survie est augmentée, donc intuitivement la virulence, lorsque le gène *iroD* est délété. Les résultats d'infections des souches de *S. Typhi*  $\Delta iroBCDN$  ne semblent pas être reliés à ceux de la délétion

du locus en entier  $\Delta iro$ . Certaines mutations sont bénéfiques et d'autres néfastes lors de l'interaction avec les macrophages humains.

Toutefois, les résultats des études portant sur ce groupe de gènes chez d'autres entérobactéries illustrent plutôt une atténuation de la virulence. Ces études sont cependant effectuées *in vivo* chez différents modèles animaux avec différents pathogènes, excluant *S. Typhi*. La délétion du locus *iro* lors d'une l'infection chez l'hôte signifie que le pathogène a une réduction de capacité de capter le fer, car l'autre sidérophore, l'entérobactine, est reconnue par le système immunitaire. Les salmochélines sont de ce fait considéré comme un facteur de virulence et ne sont pas reconnues par les défenses de l'hôte. Il va donc de soi qu'*in vivo* la virulence d'une souche  $\Delta iro$  est atténuée. Or, les conditions de ce projet, dû au tropisme restreint de la bactérie, sont différentes et le système immunitaire n'entre pas en compte. C'est-à-dire qu'on observe uniquement l'interaction entre les souches mutantes et les cellules épithéliales ou les macrophages en culture. Il est probable que la mutation de ces gènes individuellement intervienne dans d'autres voies. Les salmochélines et l'entérobactine sont analogues et ont en commun certaines voies.

Les résultats de la souche  $\Delta to/C$  en UFC (Figure 22) démontrent une diminution de la capacité de survie dans les macrophages humains. Le nombre de bactéries après 24 heures à l'intérieur du macrophage est beaucoup plus petit que celui de la souche sauvage. Néanmoins, les résultats du taux de survie (Figure 23) indiquent que cette baisse du nombre de bactéries est due au faible nombre phagocyté au départ. Car en proportion, la survie est inchangée par rapport à la souche sauvage. Il a été démontré que *to/C* est important lors de cette étape critique

dans une maladie systémique. L'absence de TolC diminue la capacité de survie dans les cellules eucaryotes et donc la virulence de la bactérie (29). Selon les résultats, TolC est donc essentiel surtout au niveau de la phagocytose et semble se rétablir à la survie, bien qu'on observe une légère diminution du taux de survie.

Bien que les résultats des autres souches mutantes pour les taux de survie ne soient pas significatifs (Figure 23), on observe tout de même une légère augmentation qui est percevable en UFC (Figure 22). Les infections permettent de vérifier l'interaction entre la bactérie et la cellule uniquement. Il est probable qu'en délétant une composante du système d'acquisition de fer par les salmochélines, on augmente de ce fait la virulence, puisque moins d'énergie est dépensée pour ce mécanisme. La sécrétion de l'entérobactine est suffisante dans ces conditions, puisque le lipocalin-2 n'est pas présent dans le milieu.

Dans la littérature, la délétion du locus *iro* diminue la capacité de virulence de la bactérie par rapport à la souche sauvage (52). Ces résultats obtenus *in vivo* ne ciblent pas nécessairement l'interaction avec les cellules cibles de l'établissement de l'infection systémique. Or, les résultats d'infections des cellules épithéliales et de macrophages humains *in vitro* démontrent tout à fait l'opposé chez *S. Typhi*. Cette divergence des résultats pourrait être liée à la bactérie elle-même, puisque la fièvre entérique utilise la voie systémique d'infection chez l'hôte. L'utilisation d'un modèle animal pourrait aussi être un facteur de cette divergence, car *in vitro*, le système immunitaire n'est pas présent. Puisque *S. Typhi* infecte que l'humain et qu'aucun modèle n'est adéquat, il serait intéressant d'effectuer des infections *in vitro* avec les souches  $\Delta iro$  chez *S. Typhimurium* et *E. coli* extraintestinale.

## 7. Mobilité

Les flagelles de *Salmonella* lui procurent la capacité de mobilité dans son hôte (101). Ce facteur de virulence, dont l'antigène H fait partie des trois antigènes exprimés à la surface pour la classification des sérovars, est étroitement régulé (5). La capacité de mobilité de la souche  $\Delta toI C$  a été vérifiée après 18 et 42 heures et illustre une différence avec la souche sauvage (Figure 24). La délétion de *toI C* diminue la capacité de déplacement de la souche dans la gélose. Chez *Salmonella enterica*, un mutant de la pompe à efflux AcrAB-ToI C a été créé pour observer l'effet sur les composantes essentielles afin d'infecter son hôte (102). Aucun phénotype pour la mobilité n'a été observé chez ce mutant.

## Conclusion

Les objectifs de cette étude ont été atteints en construisant plusieurs mutants de délétion pour le locus *iro* ainsi que pour la pompe à efflux TolC. Les résultats obtenus ouvrent une multitude de possibilités quant au rôle des salmochélines et de son mécanisme chez *S. Typhi*. Très peu est connu sur ce sidérophore, particulièrement sur son export, sa sécrétion dans le milieu et son import. La protéine responsable de sa sécrétion chez l'hôte afin de capturer le fer reste méconnue à ce jour. Il est important de s'intéresser et de pousser nos connaissances sur le système d'acquisition de fer par la salmochéline chez ce pathogène, puisqu'il est impliqué dans la virulence. La recherche sur *iroBCDEN* cible d'autres bactéries qui ne causent pas nécessairement une maladie systémique. Cette différence de pathogénicité est importante, vue l'implication du système dans la virulence et donc, la comparaison ne peut se faire.

Lors d'infections *in vitro*, nous avons démontré que la délétion du locus *iro* augmente la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales humaines INT-407. La souche  $\Delta$ *tolC*, au contraire, perd totalement la capacité d'adhérer à ces cellules. Ces mêmes mutations ainsi que  $\Delta$ *iroB*,  $\Delta$ *iroC* et  $\Delta$ *iroD* ont causé une diminution de l'invasion. L'interaction avec l'une des cellules phagocytaires du système immunitaire a été vérifiée afin d'observer l'effet de virulence chez les souches mutantes. Lors des infections avec les macrophages humains THP-1, la phagocytose a été augmentée chez le mutant  $\Delta$ *iro*, conférant un phénotype similaire à celui obtenu avec les cellules épithéliales. On observe le même cas avec le mutant  $\Delta$ *tolC* où la phagocytose a été

diminuée par rapport à la souche sauvage, mais pas autant qu'au niveau des cellules épithéliales. La souche  $\Delta iroB$  a aussi un phénotype de diminution de la capacité de phagocytose, ce qui suggère que le résultat de  $\Delta iro$  n'est pas dû à l'accumulation de chaque mutation individuelle du locus. La survie intracellulaire, importante pour la dissémination du pathogène, est augmentée pour les mutants  $\Delta iroD$  et  $\Delta iroN$ . L'absence de phénotype par rapport à la souche sauvage pour les souches  $\Delta iro$  et  $\Delta iroB$  au niveau de la survie dans le macrophage suggère que la virulence de ces souches n'est pas affectée par leur délétion. Par ailleurs, le mutant  $\Delta toIC$  survie moins dans les macrophages, mais le nombre de bactéries intracellulaires ayant survie par rapport au nombre phagocyté est le même que la souche sauvage.

Les analyses de stress oxydatif causé par le peroxyde d'hydrogène indiquent que toutes les souches mutantes réagissent de la même façon que la souche sauvage à cet agent toxique. Les phénotypes lors des infections ne sont donc pas dus au stress oxydatif. L'absence totale d'adhésion de  $\Delta toIC$  aux cellules épithéliales a porté à croire que la mobilité de la souche était atténuée. En effet, la mobilité de la souche est réduite par la délétion de  $ToIC$ . Nous ne pouvons toutefois en conclure que cette pompe à efflux sécrète les salmochélines dans le milieu externe. D'autres expériences devront être faites afin d'élucider ce mécanisme. Afin de bien comprendre le rôle des composantes du système d'acquisition de fer codé par le locus *iro*, il serait intéressant de combiner toutes les souches mutantes avec une souche  $\Delta entS$ , où l'entérobactine ne serait pas sécrétée. Ainsi, on obtiendrait les souches  $\Delta iro\Delta entS$ ,  $\Delta iroB\Delta entS$ ,  $\Delta iroC\Delta entS$ ,  $\Delta iroD\Delta entS$ ,  $\Delta iroN\Delta entS$  et  $\Delta toIC\Delta entS$ . Ces souches permettraient de vérifier le rôle uniquement du gène

déléché, puisque le système des salmochélines serait la seule voie utilisable de capture de fer. De plus, il serait possible d'observer si TolC est responsable de la sécrétion des salmochélines en carence de fer. Finalement, le mutant de délétion  $\Delta iroE$  contenu dans le locus n'a pu être créé. Il faudrait donc obtenir la souche mutante et effectuer les expériences de ce projet afin de terminer la caractérisation complète du locus *iro*.

Pour terminer, ce projet aura contribué à approfondir les connaissances d'un des facteurs de virulence de *Salmonella* Typhi.



## Bibliographie

1. **Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL.** 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* **155**:568-570.
2. **Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E.** 2006. The Genus *Salmonella*, vol. Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. Springer New York, Munich, Germany.
3. **Rhen M.** 2007. *Salmonella*: molecular biology and pathogenesis, p. 194. *In Press HS* (ed.). Horizon Bioscience, United Kingdom.
4. **Crosa JH, Mey AR, Payne SM.** 2004. Iron transport in bacteria. (Washington, DC: ASM Press). American Society for Microbiology.
5. **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 Microbiology Letters*. **305** :1-13.
6. **Parija S C.** 2009. Textbook Of Microbiology And Immunology. Elsevier India Pvt. Limited.
7. **Schwartz E.** 2009. Tropical Diseases in Travelers. Wiley.
8. **Bergeron N, Corriveau J, Letellier A, Daigle F, Quessy S.** 2010. Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates associated with septicemia in swine. *Canadian Veterinary Journal Research* **74**:11-17.
9. **Hansen-Wester I, Chakravorty D, Hensel M.** 2004. Functional transfer of *Salmonella* pathogenicity island 2 to *Salmonella bongori* and *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **72**:2879-2888.
10. **Hantke K.** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in microbiology* **4**:172-177.
11. **Collins HL.** 2003. The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunology Letters* **85**:193-195.
12. **Bäumler AJ, Tsolis RM, Valentine PJ, Ficht TA, Heffron F.** 1997. Synergistic effect of mutations in *invA* and *lpfC* on the ability of *Salmonella typhimurium* to cause murine typhoid. *Infection and Immunity* **65**:2254-2259.
13. **Poppe C, Smart N, Khakhria R, Johnson W, Spika J, Prescott J.** 1998. *Salmonella* typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Canadian Veterinary Journal Research* **39**:559-565.
14. **Forest C, Ferraro E, Sabbagh S, Daigle F.** 2010. Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is SPI-2 independent. *Microbiology*. **156**: 3689–3698.
15. **Steinberg E, Bishop R, Haber P, Dempsey A, Hoekstra R, Nelson J, Ackers M, Calugar A, Mintz E.** 2004. Typhoid fever in travelers: who should be targeted for prevention? *Clinical Infection Disease* **39**:186-191.
16. **Humphries RM, Yeganeh N, Ward KW, Lewinski MA, Ching N.** 2011. Enteric fever in a 6-year-old traveler caused by *Salmonella enterica* serotypes

- Typhi and Paratyphi A: laboratory detection strategies and treatment options. *Journal of Clinical Microbiology* **49**:452-454.
17. **Nguyen TQ, Reddy V, Sahl S, Kornstein L, Balter S.** 2009. Importance of travel in domestically acquired typhoid fever infections: opportunities for prevention and early detection. *Journal of Immigrant and Minority Health* **11**:139-142.
  18. **Basnyat B.** 2007. The treatment of enteric fever. *Journal of the Royal Society of Medicine* **100**:161-162.
  19. **Haraga A, Ohlson M, Miller S.** 2008. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology* **6**:53-66.
  20. **Alemán A, Fernández-Piñar P, Pérez-Núñez D, Rotger R, Martín H, Molina M.** 2009. A yeast-based genetic screen for identification of pathogenic *Salmonella* proteins. *FEMS Microbiology Letters* **296**:167-177.
  21. **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. *Journal of Experimental Medicine* **182**:655-666.
  22. **Daigle F, Graham J, Curtiss Rr.** 2001. Identification of *Salmonella* typhi genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Molecular Microbiology* **41**:1211-1222.
  23. **Darwin KH, Miller VL.** 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiology Reviews* **12**:405-428.
  24. **Garcia-del Portillo F, Foster JW, Finlay BB.** 1993. Role of acid tolerance response genes in *Salmonella* typhimurium virulence. *Infection and Immunity* **61**:4489-4492.
  25. **Griffin AJ, Li LX, Voedisch S, Pabst O, McSorley SJ.** 2011. Dissemination of persistent intestinal bacteria via the mesenteric lymph nodes causes typhoid relapse. *Infection and Immunity* **79**:1479-1488.
  26. **Kaufmann SH, Raupach B, Finlay BB.** 2001. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. *Microbes Infection* **3**:1177-1181.
  27. **Wilson RP, Raffatellu M, Chessa D, Winter SE, Tükel C, Bäumlér AJ.** 2008. The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cellular Microbiology* **10**:876-890.
  28. **Bleuel C, Grosse C, Taudte N, Scherer J, Wesenberg D, Krauss GJ, Nies DH, Grass G.** 2005. TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **187**:6701-6707.
  29. **Platz GJ, Bublitz DC, Mena P, Benach JL, Furie MB, Thanassi DG.** 2010. A tolC mutant of *Francisella tularensis* is hypercytotoxic compared to the wild type and elicits increased proinflammatory responses from host cells. *Infection and Immunity* **78**:1022-1031.
  30. **Cuellar-Mata P, Jabado N, Liu J, Furuya W, Finlay B, Gros P, Grinstein S.** 2002. Nramp1 modifies the fusion of *Salmonella* typhimurium-containing

- vacuoles with cellular endomembranes in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **277**:2258-2265.
31. **Furman M, Fica A, Saxena M, Di Fabio JL, Cabello FC.** 1994. *Salmonella typhi* iron uptake mutants are attenuated in mice. *Infection and Immunity* **62**:4091-4094.
  32. **Virlogeux I, Waxin H, Ecobichon C, Popoff MY.** 1995. Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology* **141 ( Pt 12)**:3039-3047.
  33. **Bishop A, House D, Perkins T, Baker S, Kingsley R, Dougan G.** 2008. Interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion. *Microbiology* **154**:1914-1926.
  34. **Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar S.** 2005. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet* **366**:749-762.
  35. **Crawford RW, Rosales-Reyes R, Ramírez-Aguilar MeL, Chapa-Azuela O, Alpuche-Aranda C, Gunn JS.** 2010. Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**:4353-4358.
  36. **MERSELIS JG, KAYE D, CONNOLLY CS, HOOK EW.** 1964. The Typhoid Carrier State: Quantitative Bacteriology and Preliminary Observations on Therapy. *East African Medical Journal* **41**:219-227.
  37. **Shpargel JS, Berardi RS, Lenz D.** 1985. *Salmonella typhi* carrier state 52 years after illness with typhoid fever: a case study. *American Journal of Infection Control* **13**:122-123.
  38. **Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, Waller A, Mende DR, Kultima JR, Martin J, Kota K, Sunyaev SR, Weinstock GM, Bork P.** 2013. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature* **493**:45-50.
  39. **Paz A, Cohen E, Odeh M, Potasman I.** 2007. Typhoid fever in travelers: Time for reassessment. *European Journal of Internal Medicine* **18**:150-151.
  40. **Bormann AM, Boulware DR.** 2008. The trials of the returning traveler: ciprofloxacin failure in enteric fever. *Minnesota Medicine* **91**:43-44.
  41. **Farmakiotis D, Varughese J, Sue P, Andrews P, Brimmage M, Dobroszycki J, Coyle CM.** 2013. Typhoid Fever in an inner city hospital: a 5-year retrospective review. *Journal of Travel Medicine* **20**:17-21.
  42. **Schaible UE, Kaufmann SH.** 2004. Iron and microbial infection. *Nature reviews. Microbiology* **2**:946-953.
  43. **Eloe-Fadrosh EA, McArthur MA, Seekatz AM, Drabek EF, Rasko DA, Sztein MB, Fraser CM.** 2013. Impact of oral typhoid vaccination on the human gut microbiota and correlations with *S. Typhi*-specific immunological responses. *PLoS One* **8**:e62026.
  44. **Payne SM, Wyckoff EE, Murphy ER, Oglesby AG, Boulette ML, Davies NM.** 2006. Iron and Pathogenesis of *Shigella*: Iron Acquisition in the

- Intracellular Environment. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* **19**:173-180.
45. **Fernandez-Beros ME, Gonzalez C, McIntosh MA, Cabello FC.** 1989. Immune response to the iron-deprivation-induced proteins of *Salmonella typhi* in typhoid fever. *Infection and Immunity* **57**:1271-1275.
  46. **Collins HL.** 2003. The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunology Letters* **85**:193-195.
  47. **Africa LA, Murphy ER, Egan NR, Wigley AF, Wing HJ.** 2011. The iron-responsive Fur/RyhB regulatory cascade modulates the *Shigella* outer membrane protease IcsP. *Infection and Immunity* **79**:4543-4549.
  48. **Miethke M, Marahiel MA.** 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**:413-451.
  49. **Braun V, Braun M.** 2002. Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS letters* **529**:78-85.
  50. **Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK.** 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular Cell* **10**:1033-1043.
  51. **Surgener DM, Koechlin BA, Strong LE.** 1949. Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation; the metal-combining globulin of human plasma. *Journal of Clinical Investigation* **28**:73-78.
  52. **Caza M, Lepine F, Milot S, Dozois CM.** 2008. Specific roles of the iroBCDEN genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. *Infection and Immunity* **76**:3539-3549.
  53. **Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* **27**:215-237.
  54. **Litwin CM, Calderwood SB.** 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clinical Microbiology Reviews* **6**:137-149.
  55. **Ratledge C, Dover LG.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review Microbiology* **54**:881-941.
  56. **Benjamin JA, Desnoyers G, Morissette A, Salvail H, Masse E.** 2010. Dealing with oxidative stress and iron starvation in microorganisms: an overview. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **88**:264-272.
  57. **Andrews SC.** 1998. Iron storage in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **40**:281-351.
  58. **Zimmermann L, Hantke K, Braun V.** 1984. Exogenous induction of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **159**:271-277.
  59. **Shouldice SR, Dougan DR, Williams PA, Skene RJ, Snell G, Scheibe D, Kirby S, Hosfield DJ, McRee DE, Schryvers AB, Tari LW.** 2003. Crystal structure of *Pasteurella haemolytica* ferric ion-binding protein A reveals a novel class of bacterial iron-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* **278**:41093-41098.

60. **Dozois C, Daigle F, Curtiss R.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**:247-252.
61. **Crouch ML, Castor M, Karlinsey JE, Kalthorn T, Fang FC.** 2008. Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* **67**:971-983.
62. **Letendre ED, Holbein BE.** 1984. Mechanism of impaired iron release by the reticuloendothelial system during the hypoferremic phase of experimental *Neisseria meningitidis* infection in mice. *Infection and Immunity* **44**:320-325.
63. **Bister B, Bischoff D, Nicholson GJ, Valdebenito M, Schneider K, Winkelmann G, Hantke K, Sussmuth RD.** 2004. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals* **17**:471-481.
64. **Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG, Heublein PC.** 1979. Disease caused by a marine Vibrio. Clinical characteristics and epidemiology. *New England Journal of Medicine* **300**:1-5.
65. **Milteer RM, Sarpong S, Poydras U.** 1989. *Yersinia enterocolitica* septicemia after accidental oral iron overdose. *Pediatric Infection Disease Journal* **8**:537-538.
66. **Crosa JH.** 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiological Reviews* **53**:517-530.
67. **Becroft DM, Dix MR, Farmer K.** 1977. Intramuscular iron-dextran and susceptibility of neonates to bacterial infections. In vitro studies. *Archives of Disease in Childhood* **52**:778-781.
68. **Bagg A, Neilands JB.** 1987. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiology Reviews* **51**:509-518.
69. **Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G.** 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**:3677-3682.
70. **Montgomerie JZ, Bindereif A, Neilands JB, Kalmanson GM, Guze LB.** 1984. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. *Infection and Immunity* **46**:835-838.
71. **Carrano CJ, Drechsel H, Kaiser D, Jung G, Matzanke B, Winkelmann G, Rochel N, Albrecht-Gary AM.** 1996. Coordination Chemistry of the Carboxylate Type Siderophore Rhizoferrin: The Iron(III) Complex and Its Metal Analogs. *Inorganic Chemistry* **35**:6429-6436.
72. **Foster J, Hall HK.** 1992. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (fur) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *Journal of Bacteriology*. **174**:4317-4323.
73. **Feldmann F, Sorsa LJ, Hildinger K, Schubert S.** 2007. The salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by

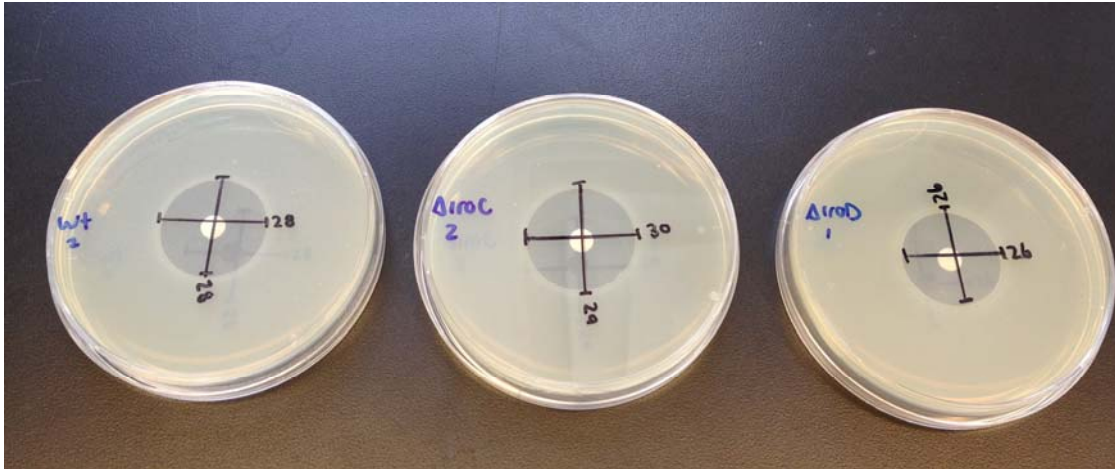
- extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in vitro. *Infection and Immunity* **75**:3183-3187.
74. **Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB, Beanan JM, Barnard TJ, Johnson JR.** 2002. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **70**:7156-7160.
  75. **Russo TA, Carlino UB, Johnson JR.** 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **69**:6209-6216.
  76. **Braun V.** 2001. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *International Journal of Medicine in Microbiology* **291**:67-79.
  77. **Fox JT, Thomson DU, Drouillard JS, Thornton AB, Burkhardt DT, Emery DA, Nagaraja TG.** 2009. Efficacy of *Escherichia coli* O157:H7 siderophore receptor/porin proteins-based vaccine in feedlot cattle naturally shedding *E. coli* O157. *Foodborne Pathogens Disease* **6**:893-899.
  78. **Peacock RS, Andrushchenko VV, Demcoe AR, Gehmlich M, Lu LS, Herrero AG, Vogel HJ.** 2006. Characterization of TonB interactions with the FepA cork domain and FecA N-terminal signaling domain. *Biometals* **19**:127-142.
  79. **Lin H, Fischbach MA, Liu DR, Walsh CT.** 2005. In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *Journal of the American Chemical Society* **127**:11075-11084.
  80. **Fischbach MA, Lin H, Liu DR, Walsh CT.** 2005. In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**:571-576.
  81. **Kadi N, Oves-Costales D, Barona-Gomez F, Challis GL.** 2007. A new family of ATP-dependent oligomerization-macrocyclization biocatalysts. *Nature Chemical Biology* **3**:652-656.
  82. **Chen J.** 2013. Molecular mechanism of the *Escherichia coli* maltose transporter. *Current Opinion Structural Biology*.
  83. **Konopka K, Neilands JB.** 1984. Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron. *Biochemistry* **23**:2122-2127.
  84. **Gil H, Platz GJ, Forestal CA, Monfett M, Bakshi CS, Sellati TJ, Furie MB, Benach JL, Thanassi DG.** 2006. Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *PNAS* **103**:12897-12902.
  85. **Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G.** 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**:3677-3682.
  86. **Garenaux A, Caza M, Dozois CM.** 2011. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* **153**:89-98.

87. **Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, Raymond KN, Wanner BL, Strong RK, Walsh CT, Aderem A, Smith KD.** 2006. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**:16502-16507.
88. **Fischbach MA, Lin H, Liu DR, Walsh CT.** 2006. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nature Chemical Biology* **2**:132-138.
89. **Sorsa LJ, Dufke S, Heesemann J, Schubert S.** 2003. Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infection and Immunity* **71**:3285-3293.
90. **Bäumler AJ, Norris TL, Lasco T, Voight W, Reissbrodt R, Rabsch W, Heffron F.** 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* **180**:1446-1453.
91. **Azpiroz MF, Poey ME, Laviña M.** 2009. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* **47**:274-280.
92. **Baumler AJ, Norris TL, Lasco T, Voight W, Reissbrodt R, Rabsch W, Heffron F.** 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* **180**:1446-1453.
93. **Muller SI, Valdebenito M, Hantke K.** 2009. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* **22**:691-695.
94. **Williams PH, Rabsch W, Methner U, Voigt W, Tschäpe H, Reissbrodt R.** 2006. Catecholate receptor proteins in *Salmonella enterica*: role in virulence and implications for vaccine development. *Vaccine* **24**:3840-3844.
95. **Zhu M, Valdebenito M, Winkelmann G, Hantke K.** 2005. Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology* **151**:2363-2372.
96. **Fiorentino M, Lammers KM, Levine MM, Sztein MB, Fasano A.** 2013. In vitro Intestinal Mucosal Epithelial Responses to Wild-Type *Salmonella* Typhi and Attenuated Typhoid Vaccines. *Frontiers in Immunology* **4**:17.
97. **Bleuel C, Grosse C, Taudte N, Scherer J, Wesenberg D, Krauss GJ, Nies DH, Grass G.** 2005. TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **187**:6701-6707.
98. **Martel-Gallegos G, Casas-Pruneda G, Ortega-Ortega F, Sánchez-Armass S, Olivares-Reyes JA, Diebold B, Pérez-Cornejo P, Arreola J.** 2013. Oxidative stress induced by P2X7 receptor stimulation in murine macrophages is mediated by c-Src/Pyk2 and ERK1/2. *Biochimica Biophysica Acta*. **1830**: 4650–4659.
99. **Ferhat M, Atlan D, Vianney A, Lazzaroni JC, Doublet P, Gilbert C.** 2009. The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion. *PLoS One* **4**:e7732.

100. **Caza M, Lepine F, Dozois CM.** 2011. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **80**: 266-282.
101. **Olsen JE, Hoegh-Andersen KH, Rosenkrantz JT, Schroll C, Casadesús J, Aabo S, Christensen JP.** 2013. Intestinal invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the avian host is dose dependent and does not depend on motility and chemotaxis. *Veterinary Microbiology* **165**: 373–377.
102. **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. *Journal of Bacteriology* **191**:4276-4285.



## Annexe



**Figure 25 : Représentation de la réponse au stress oxydatif** induit par le peroxyde d'hydrogène, un agent toxique. La zone d'inhibition autour du disque est mesurée en mm.