

Université de Montréal

Caractérisation des systèmes à deux composantes chez
***Salmonella enterica* sérovar Typhi**

par Claudie Murret-Labarthe

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

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

Avril 2018

© Claudie Murret-Labarthe, 2018

Résumé

Les bactéries sont équipées d'une variété de mécanismes leur permettant de percevoir et de s'adapter à leur environnement. Parmi ces mécanismes, on retrouve les systèmes à deux composantes (S2C) qui permettent la transduction de signaux. Un S2C classique comprend un senseur, qui est situé dans la membrane interne et un régulateur situé dans le cytoplasme. Lorsqu'il y a perception d'un signal, le senseur subit un événement d'autophosphorylation et active le régulateur. Une fois activé, celui-ci agit comme facteur de transcription sur les gènes cibles en se liant à l'ADN. Le régulateur peut induire ou réprimer la transcription de plusieurs gènes simultanément en réponse au signal. *Salmonella enterica* serovar Typhi est un pathogène humain spécifique et l'agent étiologique de la fièvre typhoïde, pour lequel 28 S2C ont été identifiés. Le rôle associé aux S2C permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle les S2C sont importants pour l'adaptation de *S. Typhi* à son environnement et que ceux-ci participent à différentes étapes importantes de l'infection à ce pathogène.

Afin d'étudier les S2C de *S. Typhi*, les objectifs sont 1) de déléter les régulateurs de façon non-polaire du chromosome par une méthode de mutagenèse par échange allélique, 2) de tester les mutants obtenus dans des essais d'infections de cellules humaines et 3) d'évaluer leur phénotype pour la motilité, le morphotype, ainsi que la production de biofilms. Cette étude présente pour la première fois la caractérisation de tous les S2C retrouvés chez *S. Typhi* et identifie un rôle potentiel pour chacun dans sa pathogénèse.

Mots-clés : *Salmonella* Typhi, S2C, senseur (SK), régulateur (RR), régulation, infection

Abstract

Bacteria are equipped with a variety of mechanisms allowing them to sense and adapt to their environment, which include the two-component systems (TCS) that trigger an adaptive response that typically translates into differential expression of specific genes. A classic TCS comprises a sensor in the inner membrane and a regulator located in the cytoplasm. When a signal is perceived, the sensor autophosphorylates, and activates the regulator. Once activated, the regulator acts as a transcriptional factor by targeting specific genes in response to the signal. The regulator can induce or repress the transcription of multiple genes simultaneously in response to the signal. *Salmonella enterica* serovar Typhi is a human specific pathogen and is the etiologic agent of typhoid fever, for which 28 TCS were identified. The role associated with TCS allows us to hypothesize that TCS are important for the adaptation of *S. Typhi* to its environment and therefore participate in the crucial stages of infection of this pathogen.

In order to study the TCS of *S. Typhi*, the objectives are 1) to remove the regulators individually by a non-polar deletion using a method of mutagenesis by allelic exchange, 2) to test each of the mutants obtained in infection assays with human cells and 3) establish their phenotype, using phenotypic assays for motility, the morphotype and the production of biofilms. This study presents for the first time the characterization of all *S. Typhi* TCS and identifies a potential role for each of them in its pathogenesis.

Keywords : *Salmonella* Typhi, TCS, sensor (SK), regulator (RR), regulation, infection

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
1. Généralités à salmonelles.....	1
1.1. Nomenclature et taxonomie.....	1
1.2. Spectres d'hôtes des salmonelles.....	3
1.3. Fardeau mondial des salmonelles.....	5
2. Infections à <i>Salmonella</i>	6
2.1. Infections localisées.....	7
2.2. Infections systémiques.....	10
3. Facteurs de virulence.....	11
3.1. Îlots de pathogénicité chez <i>S. Typhi</i> (SPI).....	11
3.2. Système de sécrétion de type III (SST3).....	12
3.3. Capsule Vi (SPI-7).....	14
3.4. Fimbriae.....	15
3.5. Toxine.....	16
3.6. Biofilms.....	17
4. Les systèmes à deux composantes (S2C).....	18
4.1. Fonctionnement des S2C.....	19
4.2. Organisation et régulation des S2C.....	21
4.3. Rétroaction des S2C.....	22

4.4. Les S2C chez <i>Salmonella</i>	23
Problématique et objectifs.....	40
Matériel et Méthodes	42
1. Souches, plasmides et conditions de culture utilisées.....	42
2. Mutagenèse par méthode d'échange allélique	44
2.1. Construction du gène régulateur tronqué.....	44
2.2. Digestion, ligation et insertion dans un plasmide suicide.....	45
2.3. Extraction plasmidique	45
2.4. Transformation d'ADN.....	46
2.5. Conjugaison bactérienne.....	46
3. Courbe de croissance	47
4. Tests d'adhésion, d'invasion et de persistance en intracellulaire dans les cellules épithéliales intestinales humaines INT407	47
5. Tests de phagocytose et de survie dans les macrophages humains THP-1.....	48
6. Tests de motilité en tubes.....	49
7. Évaluation du phénotype RDAR («Red Dry And Rough»).....	49
8. Biofilms.....	49
Résultats	51
1. Mutagenèse de tous les régulateurs des S2C de <i>S. Typhi</i> ISP1820	51
2. Courbe de croissance	51
3. Motilité.....	53
4. Adhésion, invasion et persistance dans les cellules épithéliales intestinales humaines (INT407)	53
4.1. Adhérence aux cellules épithéliales.....	53
4.2. Invasion des cellules épithéliales	54
4.3. Persistance à l'intérieur des cellules épithéliales.....	55
5. Phagocytose et survie dans les macrophages humains (THP-1).....	57
5.1. Phagocytose par les macrophages.....	57
5.2. Survie dans les macrophages	58
6. Phénotype RDAR.....	59

7. Biofilms.....	60
Discussion.....	62
1. Construction et caractérisation des mutants.....	63
2. Caractérisation des S2C de <i>S. Typhi</i>	64
2.1. Systèmes ne présentant aucun phénotype.....	64
2.2. PhoB.....	64
2.3. OmpR.....	65
2.4. ArcA.....	66
2.5. KdpE.....	67
2.6. CpxR.....	67
2.7. PhoP.....	67
2.8. SirA.....	68
2.9. BaeR.....	68
2.10. DpiA.....	68
2.11. CreB.....	69
2.12. NarL.....	69
2.13. YfhA.....	69
2.14. RstA.....	70
2.15. DcuR.....	70
2.16. GlnG.....	70
2.17. PmrA.....	70
2.18. TorR.....	71
2.19. TctD.....	71
2.20. TtrR.....	71
2.21. HydG.....	72
2.22. CopR.....	72
2.23. RcsB.....	72
2.24. YehT.....	73
2.25. UhpA.....	73
2.26. CitB.....	74

3. Implication des S2C dans l'infection à <i>S. Typhi</i>	74
Conclusion	78
Bibliographie.....	80
Annexes.....	i

Liste des tableaux

Tableau I. Nomenclature actuelle des espèces et sous-espèces de <i>Salmonella</i> (5, 9).	3
Tableau II. Classification de la spécificité d'hôte et maladie associée chez différents sérovars de salmonelles (12, 13).	4
Tableau III. Effecteurs associés aux SST3 situés sur les SPI-1 et 2 ainsi que leur rôle associé (87, 90, 103)	13
Tableau IV. Identification des composantes et du rôle des 28 S2C chez <i>S. Typhi</i>.	23
Tableau V. Description des souches et du plasmide utilisé dans cette étude.	43
Tableau VI. Compilation des phénotypes des mutants RR chez <i>S. Typhi</i>.	65
Tableau VII. Listes d'amorces utilisées pour la création des mutants dans cette étude	i

Liste des figures

Figure 1. Fonctionnement d'un S2C classique.....	20
Figure 2. Représentation schématique de la construction d'un gène délété.....	44
Figure 3. Courbe de croissance de la souche <i>ΔarcA</i> et de la WT.....	52
Figure 4. Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales INT407.	54
Figure 5. Capacité d'invasion des cellules épithéliales intestinales INT407.....	55
Figure 6. Capacité de persistance intracellulaire à l'intérieur des cellules épithéliales intestinales INT407.	56
Figure 7. Capacité d'être phagocyté par les macrophages humains THP-1.	58
Figure 8. Capacité de survie dans les macrophages humains THP-1.	59
Figure 9. Caractérisation phénotypique du morphotype RDAR sur milieu géloses congo rouge à 37°C.	60
Figure 10. Capacité de formation de biofilms en conditions statiques à 37°C après 72h.	61
Figure 11. Représentation schématique de l'activité régulatrice des S2C sur le SPI-1 et le SPI-2 chez <i>S. Typhi</i>	75
Figure 12. Capacité d'adhésion, d'invasion et de persistance intracellulaire dans les cellules épithéliales intestinales INT407.....	iv
Figure 13. Capacité de phagocytose et de survie durant 24 h dans les macrophages humains THP-1.	v

Liste des sigles et des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine di-phosphate

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

CD : cellules dendritiques

Cm : chloramphénicol

CR : congo rouge

DAP : acide diaminopimélique

DO : densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

ERO : espèces réactives d'oxygène

GP : groupement phosphate

IL-8 : interleukine-8

iNTS : invasives NTS

LB : Luria-Bertani

LPS : lipopolysaccharide

NTS : salmonelles non-typhoïdes

ME : membrane externe

MI : membrane interne

PA : peptides antimicrobiens

PBS : tampon phosphate salin

PBS-DOC : PBS-acide déoxycholique

PCR : *polymerase chain reaction*

Pi : phosphate inorganique

S2C : système à deux composants

S. Typhi : *Salmonella enterica* sérovar Typhi

S. Typhimurium : *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium

SCV : *Salmonella containing vacuole*

Sifs : *Salmonella-induced filaments*

SK : senseur kinase

SPI : *Salmonella pathogenicity island*

SST3 : système de sécrétion type 3

ST : séquence type

RDAR : *red dry and rough*

RR : régulateur de réponse

TLR : *Toll-like* récepteur

TS : sérovars typhoïdes

UFC : unité formatrice de colonie

V. cholerae : *Vibrio cholerae*

VIH : virus d'immunodéficience humaine

*«Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop
questioning»*
Albert Einstein

Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de recherche France Daigle, sans qui je ne serais probablement pas ici aujourd'hui. Merci de m'avoir donné ma chance en temps que stagiaire de 1^{ère} année, de m'avoir fait découvrir le monde passionnant de la recherche et de m'avoir fait confiance. Sans cette opportunité que tu m'as accordé, je ne serais pas rendu où je suis en ce moment.

Je tiens aussi à remercier Eve-Lyne «la chef» post-doctorale du laboratoire, qui m'a tout appris ces petits trucs et sans qui je n'aurais pas appris autant.

Je tiens à remercier particulièrement ma collègue Julie, qui sans elle je n'aurais sûrement pas réussi aussi bien cette aventure. Tout nos fous rires et nos moments de «brainstorming» intensifs vont me manquer. Je tiens également à souligner ta formidable écoute, particulièrement dans mes petits moments de panique de 10 minutes. Je tiens sincèrement à te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi.

Je souhaite aussi remercier Karine pour son aide précieuse dans le laboratoire. À chaque fois que j'ai eu besoin d'aide tu répondais présente. Ne lâche pas ton bon travail chère Karine ça va rapporter, peut-être plusieurs bouteilles de Bernard-Massard! Je souhaite aussi remercier Maud, notre professionnelle des infections. Nos discussions sur Saint-Martin vont me manquer, mais qui sait on va peut-être s'y croiser un jour.

Je tiens aussi à remercier ma famille, qui a été présente pour moi toute ma vie et sans qui je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui. Merci maman d'être une personne pleine de courage et de m'encourager dans tout ce que j'entreprends. Merci à mon père de m'aider à remettre les choses en perspective pour pouvoir continuer d'avancer. Merci à ma sœur Lydia qui me pousse à toujours aller chercher le meilleur de moi-même et d'être là pour moi.

Un petit merci à tous les stagiaires Nathan, Charles-Antoine, Valérie, Nassima et Marc d'avoir mis de l'ambiance dans le laboratoire lors de votre passage et d'avoir apporter votre bonne humeur.

J'aimerais aussi remercier les membres du jury d'évaluation de ce mémoire Dr. Marc Drolet et Dr. Sébastien Faucher.

Introduction

1. Généralités salmonelles

Le genre bactérien *Salmonella* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette bactérie fut découverte par Daniel Elmer Salmon, un vétérinaire, qui l'isola pour la première fois à partir d'intestins de porc en 1884. Cette bactérie fut initialement nommée «*Bacillus choleraesuis*», mais le nom fut modifié en 1900 par Lignieres pour devenir «*Salmonella choleraesuis*» en l'honneur du chercheur ayant fait sa découverte (1). La découverte de *Salmonella enterica* sérovar Typhi fut attribuée à Karl Joseph Eberth en 1880 (1, 2).

Les salmonelles sont des bâtonnets à Gram négatifs qui ne forment pas de spores. Elles sont généralement motiles et possèdent des flagelles péritriches (3). Les salmonelles sont uniques parmi les bactéries entériques, puisqu'elles peuvent être monophasiques ou diphasiques au niveau des flagellines qu'elles expriment (4). Ce sont des bactéries anaérobies facultatives (3, 5). *Salmonella* est une bactérie mésophile puisque sa température optimale de croissance est de 37°C, mais elle peut également croître à des températures allant de 2 à 54°C. *Salmonella* est une bactérie neutrophile puisque son pH optimal de croissance est de 6.5 à 7.5, mais elle peut tout de même croître à un pH se situant entre 3.8 et 9.5 (2, 4).

Les salmonelles sont des bactéries retrouvées dans l'environnement, chez les animaux et chez l'humain. Elles peuvent causer des infections chez une grande variété d'hôte, incluant des animaux à sang froid, à sang chaud et l'humain (5, 6). Ces bactéries peuvent également coloniser divers hôtes de façon asymptomatique. Une des caractéristiques principales du genre *Salmonella* c'est la grande diversité de niche écologique retrouvée chez les différents sérovars, malgré un fort taux d'homologies génétiques entre chacun de ces sérovars (7).

1.1. Nomenclature et taxonomie

La nomenclature de *Salmonella* est complexe et celle-ci est en constante évolution. Actuellement, le schéma de classification établi par Kauffmann-White (aujourd'hui appelé

White-Kauffmann-Le Minor) classifie les différents sérovars de salmonelles selon 3 types d'antigènes de surface, soit l'antigène somatique O (composante externe du LPS), l'antigène flagellaire H (flagelle de phase 1, flagelle de phase 2, selon les variants présents), ainsi que l'antigène de capsule Vi (si présent) (4). Ce schéma de classification est encore utilisé aujourd'hui pour caractériser et nommer les nouveaux sérovars (4, 5). La formule antigénique d'un sérovar (ou sérotype) employée comprend dans l'ordre l'antigène somatique O, l'antigène de capsule Vi et l'antigène flagellaire H. L'antigène O détermine le groupe auquel l'isolat appartient, alors que l'antigène H détermine le sérovar. L'antigène de capsule est seulement retrouvé chez *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* et *S. Dublin* (4). Auparavant, Kauffmann avait proposé que chaque sérovar soit considéré comme une espèce à part entière (8). Des noms ont été attribués à ces différentes «espèces» selon leurs caractéristiques cliniques, et ensuite selon l'endroit géographique où l'isolat a été identifiée (4, 5).

Aujourd'hui, le genre *Salmonella* regroupe officiellement deux espèces, soit *S. enterica* et *S. bongori*. L'espèce *S. enterica* représente l'espèce type et comprend jusqu'à ce jour 2659 sérovars, alors que *S. bongori* en comprend seulement 22 (4, 5). Les différents sérovars de *S. enterica* sont regroupés parmi 6 sous-espèces (voir tableau I) (5). Les différents sérovars important sur le plan médical sont retrouvés sous l'espèce *S. enterica* sous-espèce *enterica* (9-11). En théorie, chaque souche devrait être désignée ainsi : *Salmonella enterica* subsp *enterica* sérovar Typhi, où le sérovar n'est pas en italique et comprend une lettre majuscule. Cependant, le nom comme suit : *Salmonella* Typhi ou *S. Typhi* sera utilisé pour ce mémoire.

Tableau I. Nomenclature actuelle des espèces et sous-espèces de *Salmonella* (5, 9).

Genre	Espèce	Sous-espèce	Nombre de sérovars	Niche écologique
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (ou subsp. I)	1504	Animaux à sang chaud et froid et l'environnement
		<i>salamae</i> (ou subsp. II)	502	Animaux à sang froid et l'environnement
		<i>arizonae</i> (ou subsp. IIIa)	95	Animaux à sang froid et l'environnement
		<i>diarizonae</i> (ou subsp. IIIb)	333	Animaux à sang froid et l'environnement
		<i>houteneae</i> (ou subsp. IV)	72	Animaux à sang froid et l'environnement
		<i>indica</i> (ou subsp. VI)	13	Animaux à sang froid et l'environnement
	<i>bongori</i>	(subsp. V)	22	Animaux à sang froid et l'environnement

1.2. Spectres d'hôtes des salmonelles

Les salmonelles sont connues pour avoir une gamme très variée d'hôtes à infecter. Parmi cet éventail d'hôtes, des animaux à sang chaud (exemple : rongeurs, oiseaux et autres) et des animaux à sang froid (exemple : reptiles) y sont retrouvés (5). *S. enterica* susp. *enterica* colonise les animaux à sang chaud (y compris l'humain), alors que toutes les autres sous-espèces de *S. enterica* et *S. bongori* vont coloniser de façon commensale des animaux à sang froid (12).

Les salmonelles peuvent être divisées en trois groupes selon leur adaptabilité à coloniser un hôte (voir tableau II). Le premier groupe comprend les salmonelles à «hôte-restreint» (hôte spécifique), soit des sérovars qui ne peuvent qu'infecter qu'un seul hôte. Ce groupe comprend les sérovars Typhi, Paratyphi A, B et C, ainsi que Sendai qui vont infecter seulement l'humain, les sérovars Arbortusovis (infectant le mouton), Gallinarum et Pullorum (infectant la volaille), Typhisuis (infectant le porc) et Arbortusequi (infectant les équins). Le second groupe comprend les «hôtes-adaptés», soit des sérovars qui vont infecter un hôte, mais qui possède également la capacité d'infecter quelques autres hôtes de façon plutôt occasionnelle. Ce second groupe comprend les sérovars Dublin (infectant les bovins) et

Choleraesuis (infectant les porcs). Le dernier groupe comprend les «généralistes», soit des sérovars pouvant infecter une très grande diversité d'hôte et où les maladies causées par ces derniers vont varier selon l'hôte infecté. Le sérovar type de ce groupe est Typhimurium, causant des infections variées chez plusieurs espèces animales (2, 5, 12, 13).

Tableau II. Classification de la spécificité d'hôte et maladie associée chez différents sérovars de salmonelles (12, 13).

Classification	Sérovar	Hôte naturel	Hôte occasionnel	Maladie
Hôte restreint	Typhi	Humain	Aucun	Typhoïde
	Paratyphi A et C	Humain	Aucun	Paratyphoïde
	Sendai	Humain	Aucun	Paratyphoïde
	Abortusovis	Mouton	Aucun	Bactériémie
	Gallinarum	Volaille	Aucun	Typhoïde aviaire
	Pullorum	Volaille	Aucun	Maladie pullorum
Hôte adapté	Typhisuis	Porcs	Aucun	-
	Abortusequi	Équins	Aucun	-
	Choleraesuis	Porcs	Humain	Bactériémie
Généraliste	Dublin	Bovins	Humain et mouton	Bactériémie
	Typhimurium	Humains, volailles, porcs, bovins et rongeurs	-	Gastroentérite
	Enteritidis	Humains, volailles et rongeurs	Porcs et Bovins	Gastroentérite

La spécificité d'hôte ou l'adaptation à un hôte est souvent caractérisée par la dégradation, l'élimination d'information génétique ainsi que l'acquisition de nouveaux gènes (13, 14). La dégradation génomique consiste en la délétion de gène et/ou l'inactivation de gène par l'apparition de mutations, ce qui forme des pseudogènes (13). Ceci est observé chez *S. Typhi* qui possède 204 pseudogènes (5% de son génome). L'apparition de ces pseudogènes chez *S. Typhi* lui a permis d'évoluer et de s'adapter de façon spécifique à son hôte humain, en ne colonisant plus l'intestin, mais plutôt des sites systémiques (moelle osseuse et vésicule biliaire) (15). De plus, il n'y a pas de réservoir connu dans l'environnement. Cette signature

d'adaptation est également observée chez d'autres pathogènes à hôte restreint comme *Yersinia pestis* et *Mycobacterium leprae* (15).

1.3. Fardeau mondial des salmonelles

Les infections à salmonelles non-typhoïdes (NTS) causent généralement des gastroentérites. Le fardeau associé aux NTS est mondial et correspond à 93,8 millions de cas chaque année avec approximativement 155 000 morts (11, 16, 17). Cette morbidité et mortalité mondiales élevées, chez les infections aux NTS sont le plus souvent retrouvées dans les pays en voie de développement (10, 11). Cependant, dans les pays développés, les éclosions aux NTS sont souvent associées à de la nourriture transformée contaminée (18). Des complications peuvent survenir suite à une infection par les NTS, notamment une infection systémique invasive. Dans environ 5% des cas d'infections aux NTS, celles-ci vont devenir invasives et causer des bactériémies (11). Les cas de bactériémies aux NTS peuvent également survenir chez des individus présentant des facteurs de risques spécifiques (10). Parmi ces facteurs de risques on retrouve la malnutrition, les individus ayant une immunosuppression, les individus souffrant d'une infection sévère comme la malaria ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ainsi que les individus âgés et les jeunes enfants (6, 11, 18).

Récemment, une situation particulière est survenue en Afrique, soit l'apparition de cas d'infections aux NTS invasives (iNTS) (19). Ces infections représentent une cause majeure de bactériémie autant chez les enfants que chez les adultes. Le nombre de cas mondial de iNTS est de 3,4 millions, avec un nombre de décès grimant à plus de 600 000 annuellement (19). Cependant, ce total peut être sous-estimé, puisque ce sont des estimations calculées et de nombreux cas dans les régions rurales d'Afrique peuvent ne pas avoir été pris en compte (16). Le phénotype invasif est particulièrement associé au sérovar Typhimurium séquence type (ST) 313, ainsi que les sérovars *S. Enteritidis* et *S. Dublin* (19). Parmi les patients infectés par les ST313, de 20 à 25% vont en décéder (10, 11). Les ST313 représentent un problème de santé publique important en Afrique Sub-Saharienne, puisque la population est fortement touchée par le VIH, la malaria et la malnutrition (10). Jusqu'à maintenant, aucun vaccin n'existe pour

protéger contre ces salmonelles (19). De plus, la résistance aux antibiotiques contre ce pathogène est de plus en plus grandissante (19).

Le fardeau associé à la fièvre entérique ou fièvre typhoïde concerne les pays en voie de développement, principalement en Asie et en Afrique (10, 11, 15, 17). La fièvre typhoïde est responsable d'environ 21,65 millions de cas annuellement, avec un taux de mortalité de 2%, ce qui représente 433 000 morts par an (16). Grâce à l'amélioration des systèmes sanitaires et d'assainissement des eaux, la typhoïde n'est presque plus observée, particulièrement dans les pays industrialisés (15). La plupart des cas survenant dans ces pays sont importés (10). Cependant, la typhoïde demeure une maladie importante dans les pays où l'hygiène sanitaire et l'accès à l'eau potable sont un problème (11).

2. Infections à *Salmonella*

Les infections associées aux salmonelles, soit les salmonelloses peuvent être divisées en trois groupes. D'abord, la gastroentérite, une infection localisée, causée par les NTS chez des individus immunocompétents. Ensuite, la bactériémie survient comme second tableau clinique lorsqu'une infection aux iNTS survient chez des individus immunocompromis. La fièvre entérique qui est une autre salmonellose causée par les sérovars typhoïdes (TS) (16). Cette maladie est une infection systémique et comprend la fièvre typhoïde, causée par *S. Typhi* et les fièvres paratyphoïdes, causées par *S. Paratyphi* A, B et C (10, 18). Les gastroentérites à salmonelles chez l'humain sont causées par les NTS (en majorité par les sérovars *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis*) (10, 11, 18). Le phénotype invasif des iNTS est souvent associé au séovar *Typhimurium* ST313 qui est une souche ayant évolué pour devenir invasive (10, 11). De ce fait, deux types d'infections principales sont associées aux salmonelles, soit une infection localisée (la gastroentérite) et une infection systémique (bactériémie et la fièvre entérique) (10). Cependant, la colonisation par *Salmonella* ne conduit pas toujours à une infection localisée ou systémique. Des infections asymptomatiques ont également été observées chez l'humain (20, 21).

2.1. Infections localisées

2.1.1. Pathogenèse de *S. Typhimurium* chez l'humain

Les infections à *Salmonella*, se contractent par l'ingestion de produits alimentaires contaminés par voie fécale-orale. L'ingestion de *S. Typhimurium* conduit au développement d'une gastroentérite chez l'humain (22-26). La dose infectieuse minimale pour établir l'infection dépend de plusieurs facteurs touchant notamment la souche pathogène (27).

Une fois ingérée, la bactérie doit traverser une première barrière physiologique importante, soit l'acidité de l'estomac. Cette barrière d'acide gastro-intestinale est également un facteur pouvant influencer la dose infectieuse nécessaire pour établir l'infection (28, 29). L'environnement hostile de l'estomac peut atteindre des pH aussi faible que 2 chez les individus en bonne santé (27, 30). Cependant, *Salmonella* est bien équipée pour faire face à cette hostilité, puisque l'acidité induit chez la bactérie une réponse de tolérance à l'acide. Ceci permet à *Salmonella* de survivre dans cet environnement et de transiger jusqu'à l'intestin grêle (28, 31, 32).

Après avoir traversé l'estomac, *Salmonella* arrive à l'intestin grêle où elle va utiliser sa motilité, à l'aide de ces flagelles péritriches, pour traverser la barrière mucoale de l'intestin et atteindre les cellules épithéliales (33, 34). Les flagelles vont jouer un rôle au niveau de l'attachement aux cellules de l'hôte, puisqu'ils vont permettre d'augmenter le contact des bactéries avec la muqueuse intestinale (33-35). Les flagelles semblent également importants dans la participation à l'invasion des cellules intestinales de l'hôte (35, 36). De plus, plusieurs structures de surface (voir section 3. Facteurs de virulence) vont permettre d'établir un contact intime avec les cellules de l'hôte et contribuer à l'invasion de ces cellules (17, 26).

Une fois que les cellules ont adhéré aux cellules intestinales de l'hôte, *Salmonella* peut en faire l'invasion de trois manières différentes. Le mode privilégié d'invasion est via les cellules M situées dans les plaques de Peyers. Les cellules M sont spécialisées dans l'échantillonnage par pinocytose du contenu antigénique de la lumière intestinale, qu'elles vont présenter aux cellules des tissus lymphoïdes sous les plaques de Peyers (37-40). Lorsque

Salmonella arrive dans l'intestin, des changements d'osmolarité sont perçus, induisent des facteurs de virulence participant au second mode d'invasion, notamment un système de sécrétion de type III (SST3) (28, 41, 42). Ce SST3 se situe sur un îlot de pathogénicité (voir section 3. Facteurs de virulence), appelé «*Salmonella* pathogenicity island» un (SPI-1). Ce premier SST3 (SST3-1) fait l'injection de protéines effectrices dans la cellule hôte, permettant ainsi le remaniement du cytosquelette d'actine de la cellule (26, 27, 43, 44). Ce remaniement forme un renflement de la membrane de la cellule hôte et vient englober la bactérie en intracellulaire (43). Comme dernier mode d'invasion, les bactéries peuvent entrer de façon passive dans les cellules dendritiques (CD) de l'épithélium, qui vont servir de transporteur aux bactéries afin de pouvoir traverser l'épithélium. Les CD forment des pseudopodes qui leur permettent de passer entre les cellules de la barrière épithéliale (26, 45).

Ayant traversé la barrière épithéliale, les tissus plus profonds peuvent ainsi être infectés, soit la *lamina propria* et les ganglions lymphatiques mésentériques (25, 37). Parmi les cellules pouvant être infectées on retrouve des cellules non-phagocytaires, comme les cellules épithéliales intestinales et des cellulaires phagocytaires comme les macrophages et les CD (45).

Lorsque *Salmonella* est internalisée, elle va établir la formation des «*Salmonella* containing vacuole» (SCV) en modifiant la membrane des phagosomes des cellules, à l'aide de ses SST3 (46, 47). *Salmonella* possède notamment un second SST3 (SST3-2) situé sur le SPI-2 qui permet la survie en milieu intracellulaire (44, 47, 48). À l'intérieur de ces SCV, *Salmonella* va produire des filaments appelés «*Salmonella*-induced filaments» (Sifs). Ces filaments vont servir à l'acquisition de nutriments en milieu intracellulaire (49, 50).

L'entrée de *Salmonella* dans l'intestin provoque de nombreuses réponses immunitaires, notamment de l'inflammation et un recrutement massif de neutrophiles, qui est caractéristique de la gastroentérite aux NTS (10, 11, 51). Le système immunitaire induit une réponse inflammatoire suite à la reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS) via le Toll-like récepteur 4 (TLR-4) (16, 52), ainsi que de la flagelline via le TLR-5 (16, 53, 54). Ceci

déclenche la libération de cytokines pro-inflammatoires, comme l'interleukine 8 (IL-8) par les cellules épithéliales intestinales (55, 56) et favorise le recrutement des neutrophiles (25, 57).

De plus, *Salmonella* se heurte à d'autres obstacles en entrant dans l'intestin, soit le microbiote résident. *Salmonella* est cependant capable d'exploiter l'inflammation de l'intestin comme un avantage sélectif par rapport aux bactéries commensales (10, 58). *S. Typhimurium* est équipé sur le plan métabolique pour sur-passer le microbiote lorsque présent dans un environnement inflammatoire (15, 58). En présence d'inflammation, les cellules hôtes vont produire un métabolite, le tétrathionate, qui peut être utilisé exclusivement par *S. Typhimurium* comme accepteur alternatif d'électrons, ce qui permet de compétitionner avec le microbiote (59, 60).

La gastroentérite par les NTS se caractérise par un début rapide où les symptômes apparaissent après environ six à douze heures. La durée de la maladie ne dépasse généralement pas les dix jours (25, 61). Les symptômes principaux de la gastroentérite aux NTS sont la diarrhée et des douleurs abdominales (61).

2.1.1.1. Infections systémiques des iNTS

Les maladies causées par les NTS peuvent être invasives si l'hôte est immunocompromis ou si la souche pathogène a évolué pour être invasive. Ces immunodéficiences peuvent être génétiques ou peuvent être dues à la présence de d'autres infections chez l'hôte comme par exemple, une infection au VIH, la malaria ou être due à l'âge. La malnutrition peut également être un facteur important pour développer une infection à salmonelle invasive, puisque la majorité des cas sont observés actuellement en Afrique subsaharienne (10). Les cas de iNTS survenant en Afrique ont un portrait clinique ressemblant aux fièvres entériques, cependant ces infections incluent des NTS qui ont évolué pour devenir invasives. Ces iNTS incluent les ST313, qui sont un problème grandissant dans ces régions. (10, 62).

2.2. Infections systémiques

2.2.1. Pathogenèse de *S. Typhi* chez l'humain

Les étapes initiales reliées avec l'établissement de l'infection de *S. Typhi* chez l'humain sont similaires à la pathogenèse de *S. Typhimurium*. Les différences marquantes entre ces sérovars se produisent au niveau de l'interaction avec la muqueuse intestinale (16, 27, 63).

S. Typhi évite de générer une réponse inflammatoire, grâce à des mécanismes d'évasion immunitaire, permettant ainsi une infection systémique (10). Cette absence d'inflammation est une caractéristique clé de la pathogenèse par le sérovar Typhi (15). Lorsque *S. Typhi* est dans l'intestin, comme les NTS, l'utilisation des flagelles, du SST3-1 et du SST3-2 sont employés pour faire l'invasion des cellules épithéliales et la survie dans les macrophages, respectivement (48, 64). Cependant, le changement dans l'osmolarité qui induit le SPI-1 va également permettre l'induction du SPI-7 qui est exclusif au sérovar Typhi (65-67). Le SPI-7 code pour une capsule de polysaccharides externe appelée Vi (65) qui camoufle les LPS (68), ainsi qu'un régulateur (TviA) négatif de la flagelline (66). Ceci permet d'empêcher la reconnaissance du pathogène via le TLR-4 et le TLR-5 et diminue la sécrétion d'IL-8, cela réduisant grandement l'inflammation et l'infiltration massive de neutrophiles (54, 69, 70). Cette faible réponse immunitaire favorise la dissémination systémique et le passage vers des tissus plus profonds soit le foie, la rate, la moelle osseuse et la vésicule biliaire (27, 71, 72). De plus, la survie augmentée dans les macrophages par *S. Typhi* (jusqu'à 100 fois), le différencie principalement du sérovar *S. Typhimurium* (27, 73).

La fièvre typhoïde présente une période d'incubation de deux semaines, ainsi que des symptômes pouvant aller jusqu'à trois semaines (74). Parmi les complications rares associées à la fièvre typhoïde on retrouve la perforation et la nécrose intestinale, une péritonite et la mort (26, 27).

2.2.2. Infections chroniques et asymptomatiques

Parmi les patients atteints de la fièvre typhoïde, 1 à 6% deviennent des porteurs chroniques de *S. Typhi*. C'est le cas pour plusieurs individus n'ayant jamais présentés de tableau clinique de la typhoïde (21, 75). Ces individus relâchent des bactéries dans leurs fèces et leur urine sur des périodes de temps allant d'un an jusqu'à toute leur vie et ce sans signes apparent de la maladie (20). Les mécanismes associés à l'établissement de l'état de porteur chronique asymptomatique ne sont pas encore bien compris, mais la colonisation de la vésicule biliaire et la présence de calculs biliaires semblent importants (15, 75). De plus, *S. Typhi* possède la capacité de former des biofilms (voir section 3. Facteurs de virulence) dans la vésicule biliaire, ce qui contribue grandement à sa persistance (76). Les porteurs chroniques de la typhoïde sont plus à risque de développer un carcinome de la vésicule biliaire (77, 78). Ces porteurs chroniques de typhoïde représentent un problème de santé publique majeur, puisqu'ils représentent le seul réservoir de la bactérie (21, 79, 80).

3. Facteurs de virulence

Salmonella possède de nombreux facteurs de virulence qui sont exprimés à la surface de la bactérie, d'autres sont sécrétés par des systèmes de sécrétion et d'autres résident dans la capacité des bactéries à former des communautés multicellulaires (81).

3.1. Îlots de pathogénicité chez *S. Typhi* (SPI)

Plusieurs des facteurs de virulence de *Salmonella* sont retrouvés sur des régions spécifiques du chromosome bactérien, appelées «*Salmonella* pathogenicity island» (SPI) (82). Ces SPIs ont une composition en G + C qui diffère du reste du génome bactérien (83). Malgré le fait que plusieurs de ces îlots sont retrouvés chez d'autres sérovars, on retrouve des différences importantes (84). Parmi les SPIs communs chez les salmonelles on retrouve les SPI-1 et 2 qui code respectivement pour les SST3-1 et 2 (82, 88, 89). Ces 2 SPIs sont génétiquement assez conservés chez les salmonelles (84, 90, 91). Jusqu'à maintenant, 15 SPIs ont été identifiés chez *S. Typhi* (85-87). Parmi ces SPIs, 4 sont spécifiquement associé à *S. Typhi*, soit les SPI-7, 15, 17 et 18 (84). Le SPI-7, unique à *S. Typhi*, code pour la capsule Vi (92-94), ainsi que pour les fimbriae correspondant au pili de type IVB (95). D'autres fimbriae

sont également présents sur des SPIs (84, 96). De plus, *S. Typhi* possède une toxine qui lui est unique, située sur le SPI-11 (97).

3.2. Système de sécrétion de type III (SST3)

Les SST3 sont des complexes formés d'environ 20 à 30 protéines de structures et permettent la translocation de protéines effectrices dans les cellules hôtes (98-100). La structure complexe des SST3 est similaire à une aiguille moléculaire (17, 101, 102). Ces SST3 sont ancrés dans la membrane interne (MI) et dans la membrane externe (ME) où un canal connecte ces deux ancrages et dépasse légèrement en milieu extracellulaire. Ce canal agit comme une aiguille, puisqu'il permet l'injection des effecteurs. Lorsque la partie extracellulaire entre en contact avec la cellule hôte, les effecteurs traversent ce canal dans le cytoplasme de la cellule hôte. (99). Ce processus d'injection est dépendant de l'ATP en plus de nécessiter un contact direct avec les cellules de l'hôte (99).

3.2.1. SST3-1 (SPI-1)

Le SPI-1 est un locus de 40 kb codant pour le SST3-1 (82). Le SST3-1 est impliqué dans l'invasion des cellules épithéliales intestinales. L'invasion avec l'aide du SPI-1 implique des changements au niveau des cellules hôtes, notamment dans la polymérisation de l'actine ainsi que des modifications du cytosquelette. Les effecteurs injectés vont interagir avec le cytosquelette (filaments d'actine) et induire le renflement membranaire pour l'internalisation des bactéries (103-105).

Les effecteurs SipA et SipC du SPI-1 seraient notamment responsables de ce renflement de membrane (103-105). Une fois la bactérie internalisée, l'effecteur SptP agit sur le cytosquelette pour ramener la cellule infectée à un état morphologique plutôt normal (106). Plusieurs autres effecteurs sont impliqués dans ce processus d'invasion, le tableau III présente les effecteurs du SST3-1 ainsi que leur rôle respectif.

Le régulateur principal du SST3-1 est HilA. L'induction de HilA s'effectue en présence de conditions de forte osmolarité ainsi que de faible oxygénation, rencontrées dans l'intestin (107-109).

Tableau III. Effecteurs associés aux SST3 situés sur les SPI-1 et 2 ainsi que leur rôle associé (87, 90, 103)

Effecteurs du SPI-1 associés au SST3-1		Effecteurs du SPI-2 associé au SST3-2	
Effecteur	Rôle	Effecteur	Rôle
SipA	Réarrangement cytosquelette/recrutement neutrophiles	SpiC	Perturbation transport vésiculaire
SipB	Nucléation actine/translocation de d'autres effecteurs	SseF	Contribue formation des Sifs
SipC	Translocation de d'autres effecteurs	SseG	Contribue formation des Sifs
SopA	Recrutement cellules immunitaires, sécrétion de fluide	SifA	Intégrité des SCV
SopB	Réarrangement cytosquelette, recrutement de neutrophiles, sécrétion de fluide	SifB	Cible les Sifs
SopC	Recrutement neutrophiles, sécrétion de fluide	SspH2	Réarrangement cytosquelette
SopD	Recrutement neutrophiles, sécrétion de fluide	SrfT	Apoptose
SopE	Réarrangement cytosquelette	SeeI	Réarrangement cytosquelette
SptP	Réarrangement cytosquelette	SseJ	Dynamique membranes des SCV/ acyle transférase
		PipB	Cible les Sifs
		SopD2	Cible les Sifs sur endosomes tardifs

3.2.2. SST3-2 (SPI-2)

Le SPI-2 est un locus de 40 kb codant pour le SST3-2 qui serait impliqué dans la survie intracellulaire (88, 89). Au cours de l'infection, *Salmonella* rencontre de nombreux types de cellules, soit des macrophages, des CD, ainsi que des neutrophiles. Lorsque *Salmonella* fait l'invasion de ces cellules, celle-ci se retrouve dans les SCV et c'est cet environnement intracellulaire qui induit le SST3-2. À l'intérieur des SCV, le SST3-2 sécrète des effecteurs participant à la modification des SCV et vient également affecter le trafic intracellulaire des cellules hôtes infectées (90, 110, 111). Cependant, une délétion complète du SPI-2 n'affecte pas la survie de *S. Typhi* dans les macrophages (112), alors que le SST3-2 du SPI-2 de *S. Typhimurium* est essentiel à la survie (89, 113). Cependant, lorsqu'une comparaison

génomique est effectuée entre ces 2 sérovars, aucune différence majeure entre les SPI-2 n'est observée (84). Il est possible que le SST3-2 de *S. Typhi* participe à la survie intracellulaire dans d'autres types cellulaires, comme les CD. Ce faisant, le SST3-2 pourrait être impliqué dans l'établissement d'une infection asymptomatique de longue durée chez l'hôte (112).

Une majorité des effecteurs du SPI-2, comme SifA, SifB et SopD2, servent à la formation des Sifs. De ce fait, ces effecteurs vont aller interagir avec le réseau de microtubules de la cellule hôte (90, 114). Plusieurs autres effecteurs sont sécrétés par le SST3-2, ceux-ci sont présentés dans le tableau III, ainsi que leur rôle respectif.

La régulation du SST3-2 est effectuée par le système à 2 composantes (S2C) SsrA-SsrB qui perçoit l'environnement intracellulaire (115). Un autre S2C serait également impliqué dans la régulation du SST3-2, il s'agit de OmpR-EnvZ. Les conditions rencontrées par ce S2C pour l'induction du SST3-2 seraient la faible osmolarité, des changements dans le niveau de nutriments, ainsi que l'acidification des SCV (113, 115).

3.3. Capsule Vi (SPI-7)

Les gènes de la biosynthèse de la capsule Vi sont encodés sur le SPI-7, qui est présent chez *S. Typhi*, mais absent de *S. Typhimurium* (85, 92, 116). La capsule de polysaccharides Vi joue un rôle important dans la virulence et la pathogenèse de *S. Typhi* (64).

L'antigène Vi est codé par 2 loci, *viaA* et *viaB*, où le locus *viaB* est localisé sur le SPI-7 (117). Le locus *viaA* est commun aux entérobactéries et correspond à *rcsB* (118). Le locus *viaB* est composé de 2 opérons soit *tviABCDE* et *vexABCDE*. L'opéron *tviABCDE* comprend le régulateur TviA ainsi que les gènes de biosynthèse capsulaire *tviBCDE*. L'opéron *vexABCDE* comprend les gènes d'exportation de l'antigène Vi (118, 119). La régulation de la capsule passe par le régulateur TviA (119, 120), les S2C OmpR-EnvZ (121) et RcsBCD (64, 119, 122). Les changements au niveau de l'osmolarité perçu par OmpR-EnvZ influencent l'expression de TviA. En présence de faibles conditions d'osmolarité, OmpR-EnvZ induit l'expression de TviA (66, 121). Ensuite, TviA vient former un hétérodimère avec RcsB pour activer l'expression des gènes du locus *viaB* (118, 119) et permettre la synthèse de la capsule.

L'hétérodimère TviA-RcsB contribue également à réprimer les gènes *flhDC* (66, 123) correspondant aux régulateurs principaux de l'expression de la flagelline (124), donc de la motilité. L'expression de Vi diminue l'invasion des cellules épithéliales, probablement en diminuant le contact du SST3-1 avec les cellules (122, 125). Ceci passe par la répression de *flhDC* fait par TviA, puisque *flhDC* régule le gène *hilD*, qui est un activateur de *hilA* (126, 127), et où HilA est le régulateur principal du SST3-1 (128). Pour résumé, l'expression de la capsule Vi en conditions de faible osmolarité est corrélée avec une réduction de la motilité (sécrétion de flagelline), alors que des conditions de forte osmolarité suppriment l'expression de Vi et provoque l'augmentation de l'invasion et une forte sécrétion de flagelline (122, 125).

Les mutants pour le locus *viaB* présentent le même phénotype que ceux observés pour les conditions de forte osmolarité, soit une invasion augmentée (122, 125). D'autres phénotypes sont également associés à l'expression de la capsule Vi, notamment l'évasion du système immunitaire. La capsule Vi camoufle la bactérie en empêchant la reconnaissance des LPS par le TLR-4 (68, 129) et la flagelline par le TLR-5 (68, 130) (voir section 2.2.1. Pathogenèse de *S. Typhi* chez l'humain), de ce fait empêchant une réponse inflammatoire et le recrutement de neutrophiles (64). De plus, la capsule protège contre l'élimination médiée par le complément, permet la résistance à la phagocytose (131) et est également impliquée dans la survie à l'intérieur des macrophages (132).

3.4. Fimbriae

Les fimbriae sont des structures protéiques qui s'assemblent en filaments en surface bactérienne (133). Chaque sérovar de *Salmonella* possède une combinaison unique de fimbriae (133). Les fimbriae sont classés selon leur mode d'assemblage. *S. Typhi* possède 12 fimbriae de type chaperonne/placier (*tcf*, *ste*, *std*, *stc*, *stb*, *sta*, *sef*, *saf*, *sth*, *stg*, *bcf* et *fim*), un fimbriae de type nucléation/précipitation (fimbriae curli *csg*) et le pili de type IVB (*pil*) (133, 134). Parmi ces fimbriae, 6 sont uniques à *S. Typhi*, soit le pili de type IVB, *sef*, *sta*, *ste*, *stg* et *tcf* et 5 comporte au moins un pseudogène dans un cadre de lecture de l'opéron, soit *stg*, *sth*, *bcf*, *ste*, *sef* (133, 134). Certains de ces systèmes fimbriaires sont codés sur des SPI, notamment les fimbriae *tcf* et *saf* sur le SPI-6 et *sef* sur le SPI-10 (84, 96).

Les fimbriae sont des structures importantes pouvant contribuer aux interactions hôte-pathogènes, par l'adhérence et l'invasion de cellules, ainsi qu'à la formation de biofilms (133). Les fimbriae de *S. Typhi* jouent un rôle dans l'invasion des cellules épithéliales, puisque presque tous les fimbriae ont un phénotype diminué lorsque déléétés, sauf *bcf* et *ste*. Peu de fimbriae semblent avoir un rôle au niveau de l'interaction avec les macrophages, puisque seulement les mutants *stc* et *std* ont une survie intracellulaire diminuée, mais le mutant *bcf* présente un phénotype augmenté (133). Les fimbriae *stg*, *bcf*, *saf* et *stc* jouent un rôle au niveau de la formation de biofilms. Les fimbriae représentent des structures redondantes en terme de fonction selon l'étape d'infection de *S. Typhi* (133). Chez *S. Typhimurium*, les fimbriae *csg* seraient également important dans la formation de biofilms, mais ceci reste à investiguer chez *S. Typhi* (135).

3.5. Toxine

La toxine typhoïde, dont les gènes sont retrouvés sur le SPI-11 (97), possède une structure A_2B_5 unique (136), où les sous-unités A produisent les effets toxiques et les sous-unités B lient les récepteurs de surface sur les cellules cibles (137-139). La toxine typhoïde a une structure pyramidale où les sous-unités B (PltB) s'assemblent en pentamère pour former la base. Les 2 sous-unités A vont s'assembler de façon linéaire sur le pentamère de PltB, soit PltA, une ADP ribosyle transférase et au sommet de la pyramide on retrouve la sous-unité CdtB, une DNase qui provoque des cassures doubles brins dans l'ADN, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire (140, 141). Le complexe entier est nécessaire pour produire l'effet toxique, puisqu'une mutation dans PltB ou PltA conduit à une perte de l'activité toxique de CdtB (97).

Un autre aspect unique de cette toxine est qu'elle est exclusivement produite par *S. Typhi* en mode intracellulaire (97, 142), plus particulièrement dans les SCV (143). La toxine n'est pas produite lorsque *S. Typhi* se retrouve libre dans le cytosol des cellules infectées (143). La toxine n'a cependant pas d'effet toxique sur les cellules dans lesquelles elle a été produite, elle doit d'abord passer par le milieu extracellulaire. Le mécanisme d'action autocrine/paracrine est une caractéristique unique de la toxine typhoïde (97, 140, 141). Ce faisant, les cellules n'ayant pas le récepteur à cette toxine peuvent être infectées par *S. Typhi* et servir de source de toxine. Ceci représente un aspect important de la pathogenèse de *S.*

Typhi, puisque cela peut contribuer à la persistance et à l'établissement d'une infection chronique (140). Les cellules affectées par la toxine sont les cellules épithéliales possédant le récepteur PODXL, ainsi que les cellules immunitaires ayant le récepteur ubiquitaire CD45 (140). La toxine typhoïde, par son pentamère de PltB, reconnaît de façon spécifique la moitié terminale Neu5Ac des glycanes des glycoprotéines de surface (136). La reconnaissance spécifique de ces glycanes contribue à la spécificité d'hôte associée à la toxine, ainsi qu'au pathogène *S. Typhi*, puisque cette terminaison Neu5Ac est prédominante chez les cellules humaines (140, 144). Cependant, ce glycanes est partiellement observé chez les souris (140, 145), ceci permet d'observer les phénotypes associés à la toxine typhoïde chez ce modèle (140). L'injection de la toxine purifiée chez la souris est capable de reproduire les symptômes associés à la fièvre typhoïde, lors de la phase aiguë de l'infection (97, 136, 140), parmi ceux-ci un nombre considérablement réduit de leucocytes en circulation (136).

L'expression de la toxine typhoïde est régulée par le S2C PhoQ-PhoP et la protéine H-NS («histone-like protein») (143).

3.6. Biofilms

La capacité des bactéries à produire des biofilms est considérée comme une réponse au stress (146) et un changement de mode vie bactérien (147) et est impliquée dans plusieurs infections chroniques (146, 147). Les biofilms préviennent la résistance à la phagocytose, aux peptides antimicrobiens et aux antibiotiques, en plus de résister à l'élimination par le système immunitaire (148, 149).

Les biofilms se définissent comme étant une communauté multicellulaire hautement organisée de bactéries enrobées dans de la matrice extracellulaire auto-induite (149-151). La formation de biofilms se produit d'abord par l'attachement des bactéries à une surface, où elles vont ensuite produire une matrice extracellulaire protectrice. De cet amas, des bactéries non-adhérées peuvent se détacher (152, 153).

Chez *S. Typhi*, les infections chroniques et asymptomatiques touchent environ 1 à 6% des individus (75). Cette persistance est associée avec la colonisation de la vésicule biliaire et

la formation de biofilms sur les calculs biliaires principalement composés de cholestérol et nécessite la présence de bile (153, 154). La bile agit comme un signal qui affecte l'expression de facteur de virulence (155). La bile pourrait également contribuer à l'adhérence des bactéries aux calculs biliaires, puisque celle-ci régule négativement l'expression de gènes de motilité (156). Cependant, la présence de flagelles non-mobiles et de fimbriae sont impliqués dans les phases initiales d'adhérence du biofilms, chez *S. Typhimurium* (154). La composition de la matrice extracellulaire du biofilm comprend de l'ADN extracellulaire (157), des exopolysaccharides comme la cellulose, l'acide colanique, l'antigène Vi, des fimbriae curli, ainsi que d'autres protéines (135, 158, 159). Plusieurs des découvertes faites sur les biofilms et la composition de la matrice extracellulaire impliquent le sérovar *S. Typhimurium* dans un modèle d'infection chronique murin produisant des calculs biliaires (153). Cependant, il faut investiguer d'avantage ce qui est spécifique chez *S. Typhi*, puisque la cellulose, un composant essentiel pour la formation de biofilms, ne serait pas produite due à la présence d'un pseudogène chez ce sérovar (*bcsC*) (160).

4. Les systèmes à deux composantes (S2C)

Les bactéries sont équipées d'une variété de mécanismes leur permettant d'être à l'affût de leur environnement et de susciter une réponse adaptative selon les stimuli perçus (161, 162). Chez les bactéries, ce processus de perception de signaux et de mise en place d'une réponse est principalement opéré par les S2C (161). Les S2C sont des mécanismes de transduction de signaux, composé d'un senseur kinase (SK) et d'un régulateur de réponse (RR) (163).

Une relation existe entre la taille du génome et le nombre de S2C, soit plus le génome est grand, plus celui-ci codera pour des S2C (162). D'une façon similaire, plus les bactéries vivent dans un environnement nécessitant une grande versatilité au niveau métabolique plus ces bactéries vont posséder de S2C. Ceci est particulièrement observé pour les bactéries qui se sont adaptées à une niche particulière comme un hôte humain, puisqu'elles possèdent moins de S2C (162).

Les S2C peuvent percevoir une variété de signaux qui peuvent être chimiques ou physiques. Parmi ces signaux on retrouve les changements dans la concentration d'ions, les changements de température, de pH, de pression d'oxygène, d'osmolarité, des changements dans l'état redox des transporteurs d'électrons, des changements dans les niveaux de nutriments, dans les molécules de *quorum sensing*, ainsi que la présence d'antibiotiques (162, 164, 165). Les signaux perçus par le SK active le RR qui lui s'applique à modifier le patron d'expression de la bactérie, en fonction de l'environnement de celle-ci (163).

Les S2C sont impliqués dans l'adaptation à toutes sortes de conditions, notamment des conditions de stress, à des interactions hôtes-pathogènes, des interactions symbiotiques avec l'hôte et dans des patrons de signalisation cellulaire bactérienne (166, 167).

4.1. Fonctionnement des S2C

Un S2C classique comprend généralement deux protéines, un SK et RR correspondant (168). Le SK se retrouve au niveau de la MI, alors que le RR est cytoplasmique (162). Un SK typique comprend généralement deux domaines, le premier étant senseur et le second transmetteur qui possède une activité kinase avec un résidu d'histidine conservé. Un RR typique comprend également deux domaines d'activité soit receveur en N-terminal qui comprend un résidu d'aspartate conservé et un domaine réponse en C-terminal (168).

La réception du signal par le SK stimule une autophosphorylation dépendante de l'ATP sur le résidu conservé d'histidine. Le SK phosphorylé transmet son groupement phosphate au résidu conservé d'aspartate retrouvé sur le RR, ce faisant le rendant actif. Une fois activé, le RR peut mettre en branle la réponse transcriptionnelle adaptative, soit l'activation ou la répression de gènes qui permettront d'ajuster le mode de vie bactérien à la condition rencontrée (168). La figure 1A illustre le fonctionnement d'un S2C classique.

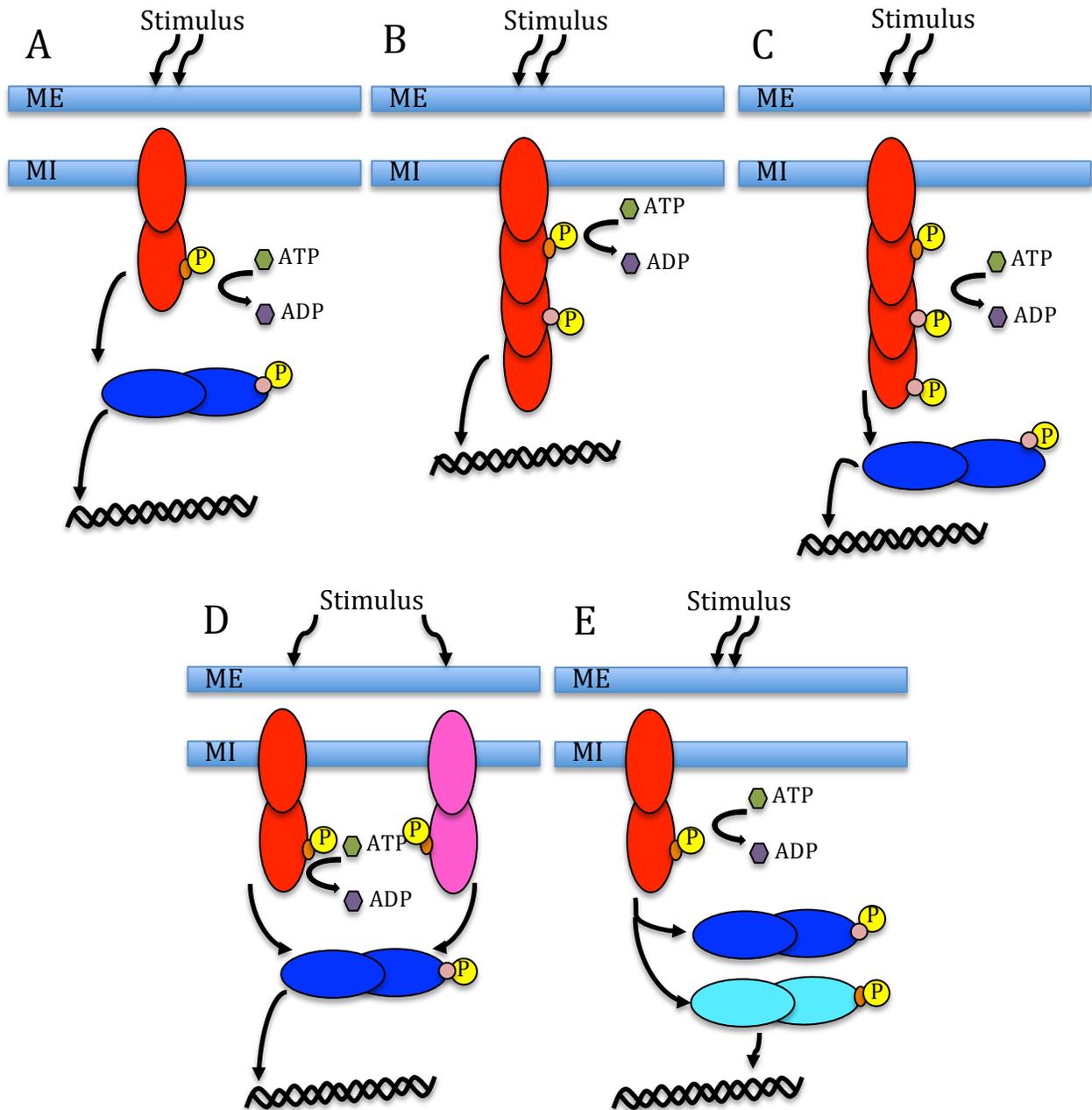


Figure 1. Fonctionnement d'un S2C classique. ME : Membrane externe, MI : Membrane interne. A) S2C classique. Le stimulus est perçu par le senseur kinase (rouge) qui s'autophosphoryle en présence d'ATP et transfère son groupement phosphate (jaune) sur le régulateur (bleu) qui agit comme facteur de transcription sur l'ADN. B) S2C hybride. C) S2C en relais de phosphorylation. D) S2C à signalisation convergente et E) S2C à signalisation divergente. Adapté de (167)

Mise à part les S2C classiques, il existe des systèmes hybrides (voir figure 1B) où l'activité du SK et du RR est sur une même protéine (167-169). De plus, les S2C peuvent également fonctionner sous forme de relais de phosphorylation (figure 1C) (168), ce qui implique un nombre augmenté de transferts de phosphate (167). Ce relais de phosphorylation peut impliquer des domaines d'activité supplémentaires à l'intérieur des composantes classiques (SK et RR) ou impliquer d'autres protéines en plus des composantes classiques (167). En plus de ces voies de signalisation, celle-ci peut être convergente, où par exemple plusieurs SK mène à l'activation d'un même RR ou divergente, où par exemple un SK active plus d'un RR (figure 1D et 1E) (164, 167). La signalisation convergente (figure 1D) fait en sorte que des signaux différents sont perçus par des SK différents, mais vont aller modifier l'état de phosphorylation d'un seul RR. Alors que la signalisation divergente (figure 1E) implique la perception d'un signal par un SK qui va modifier l'état de phosphorylation de deux RR et ainsi générer deux réponses différentes (164, 167).

Les RR sont souvent des régulateurs transcriptionnels qui peuvent lier l'ADN à un motif dans la région promotrice d'un gène, de ce fait, active ou réprime l'expression de gènes (167, 170). L'activation du RR par la phosphorylation augmente l'affinité de ce dernier pour sa cible d'ADN (167, 171, 172) cependant, certains régulateurs peuvent lier l'ADN sans être phosphorylé (172). D'autres RR ne possèdent pas la capacité de lier l'ADN dans leur domaine réponse, mais vont plutôt établir des interactions avec d'autres protéines (173) ou lier l'ARN (167, 174). Le domaine de reconnaissance du SK pour son RR correspondant, ainsi que leurs propriétés biochimiques sont largement conservées parmi les différents S2C (164, 167, 175). Cependant, les signaux perçus par les SK ainsi que les gènes régulés par les RR diffèrent entre les S2C (167, 176).

4.2. Organisation et régulation des S2C

Les gènes codant pour des S2C sont autorégulés et sont souvent codés en opéron mais certains membres d'un S2C sont encodées à des endroits différents dans le génome (167).

Les gènes des S2C sont transcrits à un niveau basal afin que les bactéries aient suffisamment de SK et de RR pour détecter les signaux et initier une réponse. Cette activité basale de transcription est sous le contrôle d'un premier promoteur constitutif (167). Cependant, plusieurs S2C possèdent un second promoteur qui est autorégulé. Ce promoteur est responsable de produire un nombre de RR nécessaire afin de pouvoir générer le programme génétique qui aidera la bactérie à répondre au signal perçu (167). La localisation des promoteurs constitutifs et autorégulés varient souvent parmi les S2C et/ou les espèces bactériennes (167). Cependant, pour certains S2C situés sur un même opéron, un seul promoteur peut être utilisé pour la transcription basale et autorégulée (167).

4.3. Rétroaction des S2C

La réponse orchestrée par les S2C est régulée grâce à de la rétroaction (167, 177). Cette rétroaction vise à contrôler la quantité de SK et/ou RR (167, 177) via leur transcription en exploitant les propriétés intrinsèques de chacun (167). Par exemple, la vaste majorité des senseurs possèdent également une activité phosphatase envers leur RR phosphorylé correspondant. Le senseur peut modifier son activité biochimique afin de pouvoir réguler le niveau de RR phosphorylé (178). Ceci est exercé par le niveau d'ATP et d'ADP lié au SK. Lorsque le SK est lié à de l'ATP, cela favorise l'autophosphorylation et le transfert de groupement phosphate, alors que le SK lié à de l'ADP favorise plutôt un RR déphosphorylé en 1) favorisant l'activité phosphatase du SK et 2) en bloquant l'activité kinase du SK, puisque l'autophosphorylation dépendante de l'ATP est bloquée par la présence de l'ADP sur le senseur (178).

Le mécanisme de rétroaction du S2C peut également employer une protéine produite par un gène sous le contrôle du RR associé à ce système (167). La rétroaction contrôlée par une protéine dont le gène est sous le contrôle du RR composant le S2C peut être effectuée de plusieurs façons, notamment en modifiant la capacité du SK à avoir accès au signal, en modifiant l'activité du SK par la présence d'une protéine pouvant inhiber son activité et en modifiant l'activité et/ou la quantité de RR présente.

4.4. Les S2C chez *Salmonella*

Un nombre de 28 S2C ont été identifiés chez *S. Typhi*. Le tableau IV présente les S2C identifiées chez ce pathogène humain et présente également une synthèse des principales caractéristiques associées à chacun de ces systèmes. Parmi ces systèmes, on retrouve au moins un système de chaque type, présenté dans la figure 1.

Tableau IV. Identification des composantes et du rôle des 28 S2C chez *S. Typhi*.

S2C	Composante	<i>S. Typhi</i> CT18	Rôle
1	SsrA	Senseur	activation du SPI-2, répression du SPI-1, activation des biofilms et résistance aux stress des espèces réactives d'oxygène
	SsrB	Régulateur	
2	EnvZ	Senseur	réponse au stress membranaire, tolérance à l'acide, régulation de porines, résistance aux sels biliaires, activation de la capsule Vi, activation du SPI-1 et SPI-2
	OmpR	Régulateur	
3	PhoR	Senseur	transport de phosphate
	PhoB	Régulateur	
4	ArcB	Senseur	régulateur global de la croissance en anaérobie et réponse au stress oxydatif en conditions aérobiques
	ArcA♦	Régulateur	
5	KdpD	Senseur	impliqué dans la virulence ; réponse au potassium*
	KdpE♦	Régulateur	
6	CpxA	Senseur	réponse au stress membranaire, résistance aux métaux, impliqué dans l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales
	CpxR	Régulateur	
7	PhoQ	Senseur	régulation positive du SPI-2, virulence, résistance aux peptides antimicrobiens, des transporteurs de magnésium et régulation négative du SPI-1
	PhoP	Régulateur	
8	BarA	Senseur	activation du SPI-1, du SPI-2, répression de la motilité et régulation de la capsule Vi
	SirA	Régulateur	
9	BaeS	Senseur	réponse au stress membranaire, résistance aux antibiotiques et aux métaux et activation de pompe à efflux
	BaeR♦	Régulateur	
10	DpiB	Senseur	activation de la réponse SOS*
	DpiA♦	Régulateur	
11	CreC	Senseur	régulation métabolique (en fermentation du glucose sur milieu minimal)*
	CreB♦	Régulateur	

12	NarX	Senseur	STY1286	réponse au nitrate
	NarL♦	Régulateur	STY1285	
13	NarQ	Senseur	STY2718	réponse au nitrate, impliqué dans la croissance dans la lumière intestinale
	NarP♦	Régulateur	STY2472	
14	YfhK (QseE)	Senseur	STY2811	réponse aux neurotransmetteurs, impliqué dans l'invasion de cellule et la virulence
	YfhA♦ (QseF)	Régulateur	STY2809	
15	RstB	Senseur	STY1651	répression de la motilité, promouvoit dégradation de RpoS, répression des biofilms
	RstA♦	Régulateur	STY1647	
16	DcuS	Senseur	STY4502	catabolisme des C4-dicarboxylates*
	DcuR♦	Régulateur	STY4501	
17	GlnL	Senseur	STY3875	réponse à l'azote
	GlnG♦	Régulateur	STY3876	
18	PmrB	Senseur	STY4490	modification des LPS et résistance aux peptides antimicrobiens, réprime le SPI-2
	PmrA♦	Régulateur	STY4491	
19	QseC /YgiY	Senseur	STY3355	réponse aux neurotransmetteurs, activation de la motilité, impliqué dans l'invasion de cellules, dans la survie dans les macrophages et la virulence
	QseB /YgiX	Régulateur	STY3354	
20	TorS	Senseur	STY3951	réduction du triméthylamine-N-oxyde en respiration anaérobie*
	TorR♦	Régulateur - Pseudogène	STY3954	
21	TctE	Senseur	STY2903	réponse aux acides tricarboxyliques*
	TctD♦	Régulateur	STY2904	
22	TtrS	Senseur - Pseudogène	STY1735	respiration du tétrathionate
	TtrR♦	Régulateur	STY1733	
23	HydH (ZraS)	Senseur	STY3712	réponse au zinc*
	HydG♦ (ZraR)	Régulateur	STY3211	
24	CopR♦ (YedW)	Régulateur	STY1128	système qui n'est pas caractérisé
	CopS (YedV)	Senseur	STY1127	
25	RcsC	Senseur	STY2496	activation de la capsule Vi, répression du SPI-1, résistance aux peptides antimicrobiens et modifications des LPS
	RcsB	Régulateur	STY2495	
	YojN (RcsD)	Intermédiaire	STY2494	
	RcsA	Régulateur	STY2190	

26	YehU	Senseur	STY2389	répression du SPI-1 et activation de la protéine de famine en carbone CstA
	YehT	Régulateur	STY2388	
27	UhpB	Senseur	STY3993	transport des sucres phosphatés* et voies d'assimilation du soufre
	UhpA	Régulateur	STY3992	
28	CitA	Senseur	STY0062	fermentation du citrate en condition anaérobie*
	CitB♦	Régulateur	STY0061	

(*) correspond aux rôles identifiés chez *E. coli*. (♦) correspond aux systèmes non caractérisés chez *S. Typhi*

4.4.1. S2C SsrA-SsrB

Le S2C SsrAB est impliqué dans la régulation du SPI-2 et de nombreux autres gènes (48, 147, 179-182). SsrB possède plusieurs fonctions, selon son état de phosphorylation. Ce dernier est phosphorylé par son SK SsrA (179, 180, 183-185) dans des conditions d'absence de calcium (Ca^{2+}), de faible osmolarité et de pH acide (179), toutes rencontrées à l'intérieur des cellules hôtes (184, 185). Notamment, la phosphorylation de SsrB est essentielle à l'activation du SPI-2 (185). De plus, SsrB est impliqué dans la résistance aux ERO (espèces réactives d'oxygène) lorsque la bactérie y est exposée dans les SCV (181). Dans les SCV, SsrB est aussi impliqué dans la diminution de l'expression des flagelles (181). SsrB participe également à réprimer les gènes du SPI-1 en agissant directement sur les gènes *hilA* et *hilD*, (tout en activant le SPI-2), après l'entrée de la bactérie dans les macrophages (182). Lorsque SsrB est non-phosphorylé, celui-ci est impliqué dans la formation de biofilms, puisqu'il active directement *csgD* (147), le régulateur principal pour la formation de biofilms (186).

Cependant, chez *S. Typhi*, le régulateur SsrB ne semble pas impliqué dans la régulation du SPI-2 pour la survie à l'intérieur des macrophages humains. Lorsque le SPI-2 est délété complètement, ce qui inclut les gènes *ssrB*, *ssrA* et d'autres gènes composants le SST3-2, cela n'affecte pas la survie, indiquant que l'activation du SPI-2 n'est pas requise chez ce sérovar pour survivre dans les macrophages (112).

4.4.2. S2C EnvZ-OmpR

OmpR est un régulateur important pour la virulence. Le SK EnvZ perçoit les changements d'osmolarité (115, 187) et le pH acide (179, 188) et active son RR OmpR. Ce dernier participe à la réponse de tolérance à l'acide (189). Il est également impliqué dans

l'activation du SPI-1, en régulant l'expression de HilA via HilD (188, 190). OmpR régule les gènes du SPI-2 et est nécessaire pour sa pleine activation, en régulant le S2C SsrAB (115, 179, 180).

OmpR est impliqué dans la régulation positive de la capsule Vi de *S. Typhi* (121, 187). De plus, chez *S. Typhi*, OmpR participe à la résistance au sel biliaire désoxycholate de sodium (191). Il régule également chez ce sérovar les porines OmpC et OmpF, toutes deux participant également à la résistance à la bile (191).

4.4.3. S2C PhoB-PhoR

Le S2C PhoBR comprend le SK PhoR, qui perçoit les niveaux intracellulaires et extracellulaires de phosphate inorganique (Pi) (192) et active le RR PhoB (192-194). Lorsque PhoB est activé, il régule positivement les gènes de transport de Pi, comme *pst* (192, 194-196). Lorsque de hauts niveaux de Pi libres sont perçus, cela favorise l'inhibition de PhoBR via d'autres protéines, comme PhoU, une protéine régulatrice (192). Une diminution du Pi intracellulaire perturbe l'inhibition de PhoU et entraîne l'activation de PhoBR, et ce même si le niveau de Pi extracellulaire est élevé (192). De plus, chez *S. Typhimurium*, PhoB peut réprimer directement le SPI-1 en liant le promoteur de *hilA* (197, 198) et indirectement via *hilC* et *hilD* (197).

4.4.4. S2C ArcB-ArcA

ArcA est le régulateur du S2C ArcBA (161). Chez *S. Typhimurium*, il est pléiotropique et versatile en agissant comme régulateur global autant en conditions aérobiques qu'anaérobiques (199, 200). La majorité des gènes régulés dans ces deux conditions sont différents, ce qui souligne son importance (200).

En conditions anaérobiques, ArcA coordonne l'expression de gènes participant au métabolisme cellulaire, à la biosynthèse des flagelles et à la motilité. Certains gènes de virulence sont régulés négativement par ArcA, tel que les gènes *mgtCB* et *slsA* situés sur le SPI-3 qui participent à la croissance en faible concentration de magnésium et au transport de celui-ci (199). Cependant, la souche Δ *arcA* est aussi virulente que la souche sauvage dans un

modèle murin (199). De plus, ArcA contrôle l'expression d'une hydrogénase NiFe modulant l'entrée d'hydrogène. Il active l'hydrogénase Hyb et réprime l'hydrogénase Hyd (201).

En conditions aérobiques, ArcA est un régulateur important dans la réponse au stress oxydatif (202, 203), soit les ERO, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'acide hypochlorique (HOCl). Ce sont des substances rencontrées suite à l'entrée des bactéries dans les cellules phagocytaires de l'hôte (199, 203). En réponse à la présence de ces ERO, ArcA régule négativement les porines OmpD et OmpW qui laisse normalement passer le H₂O₂ et le HOCl (202, 203). De cette façon, ArcA participe à la résistance aux ERO (202, 203).

Ce S2C n'a pas été caractérisé chez *S. Typhi*.

4.4.5. S2C KdpD-KdpE

Le S2C KdpDE est impliqué dans la régulation du potassium (K⁺) (204), où KpdD est le SK et KdpE le RR (205-207). La pompe Kdp-ATPase à ions K⁺, codé par l'opéron *kdpFABC* (204) serait le seul opéron identifié jusqu'à présent à être régulé par le S2C KdpDE chez *S. Typhimurium* (208). Une étude a également démontré que la régulation cet opéron chez *S. Typhimurium* est similaire à celle effectuée chez *E. coli* (209). Cependant, le rôle de cette pompe semble différent chez ces 2 espèces, puisqu'il a été rapporté difficile d'obtenir des mutants *kdpFABC* chez *S. Typhimurium* (209, 210), alors que ceux-ci ont été isolé chez *E. coli* (211). Ceci suggère des implications différentes pour les gènes régulés par KdpDE, puisque *kdpFABC* semble essentiel chez *S. Typhimurium* (210).

Une étude démontre que KdpD participe à la colonisation et à la persistance intestinale de *S. Typhimurium* dans le modèle d'infection de *Caenorhabditis elegans* (210). De plus, KdpD serait impliqué notamment dans la réponse au stress osmotique et oxydatif, en plus de contribuer à la résistance aux peptides antimicrobiens (PA) tel que la polymyxine B (210). KdpD est impliqué dans la survie à l'intérieur de macrophages murins (210). De plus, un mutant pour *kdpD* aurait un défaut de formation de biofilms, cependant ceci reste à être investigué, puisque ces données ont simplement été mentionnées comme «data not shown» (210). Le rôle de KdpDE n'a pas été caractérisé chez le sérovar *S. Typhi*.

4.4.6. S2C CpxA-CpxR

CpxAR est un S2C qui répond au stress de l'enveloppe membranaire. CpxAR participe notamment à la résistance de plusieurs métaux toxiques comme le cuivre (212), le Fe^{3+} en grande concentration (213) et à l'or (214), qui sont perçus par le SK CpxA. CpxAR soutient l'action du S2C PmrAB en réponse à la grande concentration de Fe^{3+} (213). Ce système participe aussi à la résistance aux PA, notamment la protamine (215). De plus, CpxR, le RR, régule négativement l'expression de *rpoE*, le facteur sigma pour la réponse au stress extracytoplasmique (216, 217). De plus, CpxR est impliqué dans la régulation négative du SPI-1, en jouant sur la stabilité de HilD et du SPI-2, via *ssrB*, lorsque les bactéries sont cultivées dans du milieu Luria-Bertani (LB) (218). Cette régulation négative se produit lorsque CpxR n'est pas phosphorylé par CpxA, mais plutôt par l'acétyle phosphate, généré par les enzymes AckA (une acétate kinase) et Pta (une phosphotransacétylase) (219, 220). Il a également été démontré que le SK CpxA est nécessaire pour l'activation et l'expression de *hilA* à bas pH chez *Salmonella*, et que le RR CpxR n'est pas requis (221).

Chez *S. Typhi*, CpxA est impliqué dans l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales intestinales humaines et est activé par l'osmolarité (222).

4.4.7. S2C PhoQ-PhoP

PhoP est un régulateur global de la virulence chez *Salmonella* (223-228), puisqu'une variété des protéines régulées par ce système participe à sa pathogenèse. Parmi la variété de gènes régulés par le système PhoQP, certains d'entre eux codent pour des régulateurs. Chez *Salmonella*, PhoQ, le SK, est activé par au moins trois signaux distincts, soit la présence d'un pH légèrement acide, une faible concentration de magnésium (Mg^{2+}) et la présence de certains PA (223-226). Lorsque PhoQ est activé par des conditions de pH légèrement acide, PhoP active la transcription du régulateur RstA, le RR du S2C RstBA (223, 224), (voir S2C RstBA). Dans des conditions de pH acide, PhoP active également la transcription incomplète de *mgtA*. La transcription complète de ce gène est bloquée par la présence de Mg^{2+} (223). Dans des conditions de faibles concentrations de Mg^{2+} , PhoP active la transcription de *mgtA*, qui permet l'expression de MgtA, un transporteur de Mg^{2+} (223, 225). PhoP active le RR SsrB, faisant partie du S2C SsrAB, qui active l'expression du SPI-2 (224, 226). PhoP active également

l'expression du RR PmrA (du S2C PmrBA), via l'activation du gène *pmrD*. L'activation de PmrA promouvoit la modification des LPS, et qui participe à la résistance au PA polymyxine B (226, 228). De plus, PhoP inactive le SPI-1 en réprimant le gène *hilA* (l'activateur principal du SPI-1) (224, 226, 229).

PhoP est également impliqué dans la régulation de gènes uniques chez *S. Typhi*, dans des conditions de faibles concentrations de Mg^{2+} (226). PhoP active la transcription des gènes *clyA*, *taiA* (230) et *cdtB* (143, 226). TaiA favorise la phagocytose par les macrophages, alors que ClyA diminue la croissance des bactéries à l'intérieur de ces cellules (230). CdtB code pour la toxine typhoïde (voir section 3. Facteurs Virulence). PhoP régule également le gène de virulence *mgtC*, retrouvé sur le SPI-3 (227). MgtC est impliqué chez *S. Typhi* dans la survie à l'intérieur de cellules épithéliales et de monocytes (227).

4.4.8. S2C BarA-SirA

SirA (« *Salmonella* invasion regulator »), chez *S. Typhimurium* est le RR du S2C BarA-SirA qui est important dans la virulence de *Salmonella* (229). SirA contrôle l'expression des gènes du SPI-1 (229, 231-234), du SPI-2 (233, 235), de la motilité (232), des biofilms (en diminuant les flagelles et en régulant positivement le fimbriae de type 1) (232) et de la capsule Vi (236).

La cascade de régulation passant par BarA-SirA est sous le contrôle de la répression catabolique exercée par Crp sur SirA (231), et par les acides gras à courtes chaînes comme l'acétate, le formate et le propionate qui stimule le SK BarA (237, 238). Lorsque SirA est phosphorylé, celui-ci active directement la transcription des petits ARN non-codants *csrB* et *csrC* (231-233, 239). À leur tour, ces petits ARN vont activer la transcription du gène *hilD*, en emprisonnant la protéine répresseur CsrA. De ce fait, HilD peut activer *hilA*, l'activateur principal du SPI-1 (231-233). De plus, HilD peut également activer l'opéron *ssrAB* (184, 185), le S2C qui régule l'expression du SPI-2 (113). SirA influence la motilité en régulant négativement l'expression des gènes *flhDC*, via le système Csr (232). SirA, ainsi que *csrB* et *csrC* sont requis pour la formation de biofilms chez *S. Typhimurium* puisqu'ils augmentent l'expression des fimbriae de type 1 et diminuent l'expression des flagelles (232).

Le S2C BarA-SirA joue un rôle dans la régulation de l'expression de la capsule Vi retrouvé chez *S. Typhi*, puisqu'une mutation dans un de ces deux gènes affecte l'expression de *viaB* (236).

4.4.9. S2C BaeS-BaeR

Le S2C BaeSR est un système qui répond au stress de l'enveloppe membranaire. BaeSR participe à la résistance aux antibiotiques et à la résistance aux métaux (240-243). Le SK BaeS perçoit de nombreux signaux, notamment l'antibiotique ciprofloxacine (240, 242), le cuivre, le zinc (241), le fer et le tungstène (243). BaeR, le RR, induit la transcription de plusieurs opérons codant pour des pompes à efflux en se liant directement au promoteur de *acrD* (241, 243) et de *mdtA* (240, 241, 243). De plus, BaeR participe également à l'activation positive de TolC, le pore de plusieurs pompes à efflux (241, 243). En plus d'induire ces pompes à efflux, la perception de la ciprofloxacine par BaeS induit BaeR pour la transcription directe de *sodA* (codant pour une superoxide dismutase) (242).

Le S2C BaeSR n'a pas été caractérisé chez le sérovar *S. Typhi*.

4.4.10. S2C DpiB-DpiA

Le S2C DpiBA n'a pas été caractérisé chez *Salmonella*. Chez *E. coli*, DpiBA est impliqué dans l'activation de la réponse SOS (244, 245). Cette activation peut être faite de plusieurs façons, notamment en réponse à certains β -lactames, où DpiBA participe ainsi à la résistance aux antibiotiques (245). De plus, la réponse SOS peut être activée par le contrôle que DpiBA exerce sur la régulation de certains plasmides, notamment pSC101, en modulant la réplication et la stabilité de l'hérédité de ce dernier (246). Puisque DpiA possède la capacité de lier les régions riches en A-T de l'origine de réplication du plasmide, ceci vient interférer avec la réplication et induire la réponse SOS (244). De plus, DpiBA est régulé négativement par le petit ARN RybC, en agissant de façon post-transcriptionnelle en liant l'ARNm *dpiBA* (247).

4.4.11. S2C CreC-CreB

Le S2C CreCB n'est pratiquement pas caractérisé chez *Salmonella* et n'est pas du tout caractérisé chez *S. Typhi*. Une étude comparative sur la tolérance à la chlorhexidine (agent antiseptique biocide) entre *S. Typhimurium* sauvage et *S. Typhimurium* devenue tolérante suite à des expositions répétées à cet agent, indiquerait que CreB serait un RR participant à la résistance de cet agent antiseptique (248).

Cependant, CreCB joue un rôle important chez *E. coli*, puisque ce système est impliqué dans le contrôle métabolique général (249, 250). Le S2C CreCB est essentiel dans l'activation du régulon *cre* (249, 250) où le SK CreC est activé par des intermédiaires lors de la fermentation du glucose dans un milieu minimal, soit le pyruvate, l'acétate et le lactate (250). Le RR CreB active les 9 gènes composant le régulon *cre*, où 6 gènes sont impliqués dans des cycles métaboliques, comme la voie des pentoses phosphate ou la glycolyse et les 3 autres gènes ont une fonction encore inconnue (249). De plus, CreC serait en lien avec le S2C PhoRB, puisque CreC était auparavant appelé PhoM et découvert comme étant un donneur de phosphate pour PhoB (251, 252).

4.4.12. S2C NarX-NarL

Le S2C NarXL est très peu caractérisé chez *S. Typhimurium* et pas du tout chez *S. Typhi*. Chez *S. Typhimurium*, NarL ne serait pas impliqué dans la virulence lors de l'infection du modèle murin de colite (253). La présence de nitrate active l'expression de NarL, qui à son tour activerait la transcription de la NiFe hydrogénase Hya (201). De plus, une étude indique que la transcription du RR NarL est sous le contrôle du régulateur global Fur chez *S. Typhimurium* (254). Cependant, la régulation faite par Fur est différente selon les sérovars de *Salmonella* (255).

Cependant, ce S2C est assez bien caractérisé chez *E. coli* où NarXL est impliqué dans la réponse au nitrate (256), en conditions anaérobiques, puisque qu'il est réprimé en conditions aérobiques (257). NarX, le SK, perçoit de fortes concentrations de nitrate et active NarL qui active ensuite la transcription de la nitrate réductase NarGHI et inhibe la transcription de la nitrate réductase périplasmique NapABC (257, 258). De plus, chez *E. coli*, une interaction

intime existe entre le S2C NarXL et le S2C NarQP (253). Chez *E. coli*, NarL régule également plusieurs autres gènes impliqués dans le métabolisme et le S2C DcuSR (256).

4.4.13. S2C NarQ-NarP

Le S2C NarQP est très peu caractérisé chez *S. Typhimurium* et pas du tout chez *S. Typhi*. Chez *S. Typhimurium*, NarP est impliqué dans la croissance de *S. Typhimurium* dans la lumière intestinale du modèle murin de colite (253). De plus, une étude indique que la transcription du RR NarP est sous le contrôle du régulateur global Fur chez *S. Typhimurium* (254).

Cependant, ce S2C est assez bien caractérisé chez *E. coli* où NarQP est impliqué dans la réponse au nitrate (256), dans les mêmes conditions que le S2C NarXL (257). Cependant, NarQ, le SK répond à de faibles concentrations de nitrate, menant à la phosphorylation du RR NarP, qui active la transcription de la nitrate réductase périplasmique NapABC (257, 258). De plus, il y a une interaction intime entre le S2C NarQP et le S2C NarXL (253).

4.4.14. S2C YfhK-YfhA

YfhKA (également appelé QseEF ou GlrKR) (259, 260) est un S2C répondant à l'épinéphrine, à la norépinéphrine, au sulfate et au phosphate (261). Le RR YfhA se lie à la région promotrice de *glmY* de *S. Typhimurium*, pour activer la transcription des petits ARN GlmY et GlmZ, qui régule la synthèse de l'enzyme GlmS (260). Cette enzyme est impliquée dans le maintien de la concentration de la composante glucosamine- 6-phosphate (GlcN6P) qui est retrouvée dans la paroi cellulaire des bactéries (262, 263). De plus le SK, YfhK est important dans l'invasion de cellules épithéliales, lorsque activé par l'épinéphrine (259). Il est également impliqué dans la survie à l'intérieur des macrophages et dans la virulence de *S. Typhimurium* dans un modèle d'infection systémique murin (259). YfhKA est en interaction complexe avec le S2C QseBC pour la virulence de *S. Typhimurium in vitro* et *in vivo* (259). Cependant, YfhKA ne serait pas impliqué dans la colonisation lorsque le modèle utilisé est une boucle intestinale bovine (264).

YfhKA est un S2C non caractérisé chez *S. Typhi*.

4.4.15. S2C RstA-RstB

Le S2C RstAB comprend le SK RstB et le RR RstA (265, 266). Une étude a démontré que RstA promouvoit la dégradation de RpoS, ainsi que la régulation négative des gènes régulés par RpoS chez *S. Typhimurium*, en plus d'influencer négativement la formation de biofilms (267). RstA est aussi impliqué dans l'activation de la transcription de *feoB*, un transporteur de fer, seulement lorsque RstA est activé par PhoP en conditions de pH légèrement acide (223, 224). Le domaine non-enzymatique du SK RstB agit sur le SK PhoQ pour contrôler l'expression des gènes régulés par PhoP, via un mécanisme dépendant de PhoPQ (268). De plus, lorsque RstA active FeoB, cela augmente les niveaux internes de fer et améliore l'activité du régulateur global Fur chez *Salmonella* (266). Cependant, des différences existent dans la régulation effectuée par Fur entre les sérovars *S. Typhi* et *S. Typhimurium* (255), ce qui pourrait impliquer que la régulation indirecte de RstA sur Fur peut être différente chez *S. Typhi*.

4.4.16. S2C DcuS-DcuR

Ce S2C n'est pas caractérisé chez *Salmonella*. Chez *E. coli*, DcuSR participe au catabolisme du C₄-dicarboxylates dans des conditions aérobiques et anaérobiques (269, 270). Le SK DcuS perçoit les C₄-dicarboxylates, comme le fumarate, présent dans le milieu extracellulaire (271-273). Les cibles majeures de DcuSR sont les transporteurs de C₄-dicarboxylates codés par les gènes *dctA* en conditions aérobiques et *dcuB*, la fumarate réductase codé par *frdABCD* (271), et la fumarase B codé par *fumB* en conditions anaérobiques (269, 271, 274). Cependant, pour faire son activité de régulation, DcuS doit se mettre en complexe avec soit DctA ou DcuB selon les conditions aérobiques ou anaérobiques, respectivement et vont agir comme co-activateurs (271, 275), en plus de percevoir les C₄-dicarboxylates (275). Le transporteur et co-activateur DctA fait l'entrée des C₄-dicarboxylates dans les cellules (274, 276), alors que DcuB fait l'échange des C₄-dicarboxylates contre du succinate afin d'effectuer la respiration du fumarate (277). Le S2C DcuSR peut également lier le promoteur de l'opéron *citAB*, qui code pour le S2C CitAB (important dans la réponse au citrate) (278). De plus, les deux SK de ces systèmes peuvent interagir physiquement ensemble (278).

4.4.17. S2C GlnL-GlnG

Le S2C GlnLG, également appelé NtrAC (279 , 280) ou GlnFR (281), participe à la réponse régulatrice de l'azote chez *Salmonella* (281, 282). Lorsque le SK GlnL active le RR GlnG et ce dernier lie le promoteur de *glnA* pour activer la synthèse de la glutamine synthétase, ainsi que des transporteurs d'azote (281, 283). Cependant, lorsque GlnL est absent, GlnG réprime la transcription de *glnA* (281). De plus, GlnG lie le promoteur de *dhuA* pour activer l'expression de l'opéron codant pour des gènes impliqués dans le transport actif d'histidine (282).

Aucune caractérisation n'a été effectuée sur ce système chez *S. Typhi*.

4.4.18. S2C PmrA-PmrB

Le S2C PmrAB, «polymyxine résistance» (284, 285) est requis pour la résistance aux PA, notamment la polymyxine B, en médiant la modification des LPS (286-289). Le S2C PmrAB est le système de régulation majeur de modification des LPS (290). Le SK PmrB perçoit des concentrations élevées en fer (Fe^{3+}) et en aluminium (Al^{3+}) et des conditions de pH légèrement acide (291, 292). Ces signaux permettent l'activation du RR PmrA. Une fois activé, PmrA médie la modification des LPS via une série de gènes (293). PmrA active des gènes permettant l'ajout de composantes au lipide A du LPS, par exemple via le gène *pmrE* (aussi appelé *udg*) (294). Ces modifications masquent les groupements phosphate (GP) chargés négativement, par des charges positives et affectent les interactions de certains PA électrostatiques avec la surface des bactéries (287, 295). De plus, PmrA active des gènes, comme *cld*, qui modifie la longueur de l'antigène O des LPS (296), de façon à affecter la résistance au sérum (293). PmrA serait également impliqué dans la régulation négative du SPI-2, en liant directement le promoteur de *ssrB* (297). Donc PmrA possède un rôle anti-virulence qui permettrait de réduire ou limiter la phase aiguë de l'infection afin de contribuer à la persistance (297). De plus, une étude indique que le S2C PmrAB perçoit comme signal l'ADN extracellulaire, un composant important des biofilms, cela contribuant à la résistance aux PA dans les biofilms chez *Salmonella* (157). Le S2C PmrAB semblent jouer différents rôles selon l'étape de l'infection, puisque dans un modèle murin, ce système est exprimé de façon transitoire dans l'intestin (298-300). Le signal perçu ne semble pas encore connu, mais

exclurait ceux précédemment mentionnés (300). De plus, la modification des LPS provoque un défaut de croissance chez *Salmonella* en présence de bile (301). Tout ceci suggérant une régulation étroite médiée par le S2C PmrAB, lors que l'infection par *Salmonella*.

Ce système n'a pas été caractérisé chez *S. Typhi*.

4.4.19. S2C QseB-QseC

Le S2C comprend le SK QseC et le RR QseB (265, 302). Le SK QseC perçoit plusieurs signaux notamment les neurotransmetteurs (épinéphrine et norépinéphrine) (259, 303, 304) et l'auto-inducteur 3 (305). La perception de ces signaux par QseC affecte grandement la pathogénicité de *Salmonella*, en influençant positivement et indirectement l'expression des gènes de la motilité (259, 303, 306-308), du SPI-1, du SPI-2, ainsi que de la virulence dans un modèle d'infection systémique murin (259, 308). Il est intéressant de noter que le phénotype influençant la motilité est seulement observé dans un mutant *qseC* (306), ceci laissant penser que QseC pourrait activer d'autres S2C ou d'autres gènes régulateurs, comme c'est le cas chez *E. coli* (309). De plus, selon une étude génomique, QseBC affecterait de façon négative d'autres S2C, soit PhoPQ et PmrAB (307), cependant ceci reste à confirmer. De plus, il existe une interaction importante du S2C QseBC avec le S2C YfhAK (également appelé QseEF), dans la virulence, dans l'invasion de cellules épithéliales et dans la réplication à l'intérieur de macrophages (259).

4.4.20. S2C TorS-TorR

Le S2C TorSR n'est pas caractérisé chez *Salmonella* et TorR est un pseudogène chez *S. Typhi* (310). Chez *E. coli*, le S2C TorSR accomplit ses fonctions avec l'aide de la protéine périplasmique TorT (311). La protéine TorT lie le triméthylamine-N-oxyde (TMAO) et stimule le SK hybride TorS, pour qu'ensemble ils activent le RR TorR dans un relais de phosphorylation (311, 312). TorR phosphorylé peut ensuite activer la transcription de *torCAD* (313), qui code pour des protéines requises pour la respiration anaérobie via la réduction du TMAO en triméthylamine (312, 314, 315).

4.4.21. S2C TctE-TctD

Le S2C TctED n'est pratiquement pas caractérisé chez *Salmonella*, n'est pas caractérisé chez *S. Typhi* et ne semble également pas avoir été caractérisé chez *E. coli*. Chez *S. Typhimurium*, TctD est un régulateur transcriptionnel (316, 317) activé par la répression catabolique (317) faisant l'activation de l'expression de l'opéron *tctCBA* impliqué dans le transport d'acide tricarboxylique (316, 317). L'analyse bioinformatique identifie TctE comme le SK du S2C, impliqué dans le transport d'acide tricarboxylique chez *S. Typhi* (318).

4.4.22. S2C TtrS-TtrR

Le S2C TtrSR chez *S. Typhimurium* permet la respiration du tétrathionate (319) dans des conditions d'anaérobiose (320). Le S2C TtrSR comprend le SK TtrS qui perçoit le tétrathionate (321) et le RR TtrR (319). Ce système est absolument requis pour l'activation de la transcription de *ttrBCA*, qui code pour la tétrathionate réductase (319). L'activation de cette enzyme permet d'utiliser le tétrathionate comme accepteur d'électron lors de la respiration anaérobique (319). De plus, la présence du régulateur global Fnr, qui perçoit l'oxygène, est nécessaire pour l'expression du système de réduction du tétrathionate, puisqu'il lie directement le gène *ttrB* (319). Cependant, le SK TtrS est un pseudogène chez *S. Typhi* (322), rendant inactive l'expression de la tétrathionate réductase.

4.4.23. S2C HydH-HydG

Chez *Salmonella*, le S2C HydHG a initialement été caractérisé comme étant impliqué dans la régulation de l'activité des hydrogénases, où HydH est le SK et HydG le RR (323). Le S2C HydHG est également appelé ZraSR «Zinc Resistance-Associated» pour son implication dans la tolérance au zinc (324). Une étude chez *S. Typhimurium* démontre que HydHG est impliqué dans le stress de l'enveloppe notamment par sa réponse face au zinc (325). HydHG active l'expression de la chaperonne périplasmique ZraP. En plus de son activité de chaperonne, ZraP séquestre les ions zinc et participe à la régulation négative du S2C HydHG (325). De plus, il y aurait un lien de régulation entre les S2C HydHG et BaeSR (également impliqué dans la réponse au stress de l'enveloppe) (325). Une étude de criblage de gènes exprimés durant l'infection de *S. Typhimurium* chez le porc a identifié HydHG comme étant

important. Cependant, cette étude indique que cela pourrait être due à l'alimentation riche en zinc des porcs (326). Le rôle de HydHG dans l'infection de *Salmonella* reste à être investigué.

Aucune caractérisation du S2C HydHG chez *S. Typhi* n'a été effectuée.

4.4.24. S2C CopS-CopR

Le S2C CopSR n'est pas caractérisé chez *Salmonella*. Selon l'analyse bioinformatique, CopSR est homologue au S2C YedVW chez *E. coli* (327) et ce dernier n'a pas été caractérisé.

4.4.25. Le système Rcs

Le système de régulation Rcs est hybride et comprend plusieurs composantes, notamment RcsC le SK, RcsD une protéine intermédiaire située dans la MI, RcsB le RR et RcsA une protéine auxiliaire (328-330) qui est parfois requise pour la régulation avec RcsB (329, 330). Chacune de ces protéines participe à la régulation du système Rcs. L'activation commence par la perception du signal et ensuite plusieurs voies de régulation peuvent survenir : 1) RcsC s'autophosphoryle et transmet son GP à un second domaine de celui-ci, ensuite ce GP est transféré à RcsD et RcsD transfère le GP à RcsB, 2) RcsC s'autophosphoryle et transfère directement son GP à RcsB pour l'activer et 3) RcsD s'autophosphoryle et transfère directement son GP à RcsB (331). Lorsque activé, RcsB peut former un hétérodimère avec RcsA pour réguler l'expression de gènes pour la biosynthèse de capsule d'acide colanique et d'exopolysaccharides chez *S. Typhimurium* (328, 332, 333). RcsB participe à la modification des LPS, avec d'autres S2C, en modifiant l'antigène O (296, 328) et est impliqué dans la résistance au stress oxydatif (334). RcsB active la transcription du gène *dps* qui aide à la résistance au H₂O₂ (334). Selon l'état de phosphorylation de RcsB, ce dernier peut activer ou réprimer la production de biofilms chez *S. Typhimurium*. Lorsque non-phosphorylé, RcsB participe à l'activation de *csgD*, mais lorsque phosphorylé, RcsB régule la transcription d'un petit ARN non-codant, *rprA*, qui régule négativement *csgD* (335).

Chez *S. Typhi*, RcsB participe à la régulation de la capsule Vi en formant un hétérodimère avec le régulateur TviA, (voir section 3. Facteurs Virulence) dans des conditions

de faibles osmolarité (122, 187). Lorsque les conditions d'osmolarité sont fortes, RcsB régule négativement les gènes du SPI-1 via HilD, et de la motilité via les gènes *flhDC* (122, 187).

4.4.26. S2C YehU-YehT

Le S2C YehUT est peu caractérisé chez *S. Typhimurium* et chez *S. Typhi*. Ce système se compose du SK YehU et du RR YehT (336). Chez *S. Typhimurium*, un mutant pour ce système ne présente aucune différence avec la souche sauvage lors de l'infection du modèle murin pré-traité à la streptomycine (336). Chez *S. Typhi*, une souche $\Delta yehUT$ ne présente aucune différence avec une souche sauvage lors de l'infection de cellules épithéliales humaines (336). Cependant, lors de cette étude, une souche de *S. Typhi* atténuée Ty2 ($\Delta aroA$, $\Delta aroC$ et $\Delta htrA$) fut utilisée, en plus d'utiliser des cellules du larynx humain (HEp-2) lors du test d'invasion. Pour ces raisons, les résultats doivent être interprétés avec prudence pour déterminer le rôle de YehUT dans la virulence de *S. Typhi*. De plus, une étude transcriptomique a été réalisée chez le sérovar *S. Typhi* et révèle que chez le mutant *yehUT*, il y a une régulation négative de gènes codés sur des SPIs (336), notamment *spaM*, *spaN* et *spaI* sur le SPI-1, de *pipB* sur le SPI-5 et de *sopE* sur le SPI-7 (337). Le gène *cstA* codant pour une protéine de famine du carbone («carbon starvation protein»), serait le gène principalement activé par YehUT chez *S. Typhimurium* et *S. Typhi* (336).

De plus, une étude suggère que le S2C YehUT serait régulé par le RR OmpR chez *S. Typhi* dans des conditions de croissance hypotonique (340). Cependant, cette étude fait seulement la démonstration que OmpR peut lier le promoteur de l'opéron *yehUT in vitro*, sans faire un véritable lien avec les conditions étudiées, donc cette affirmation reste à être reconfirmée.

4.4.27. S2C UhpB-UhpA

Le S2C UhpBA est impliqué dans la régulation du système de transport de sucres phosphatés, codé par le gène *uhpT* chez *E. coli* (341, 342). Les gènes *uhpBACT* de *E. coli* sont très similaires à ceux de *S. Typhimurium*, avec un minimum de 80% des nucléotides identiques et au moins 90% des acides aminés identiques (341). Dans ce S2C, UhpB est le SK

et perçoit le glucose-6-phosphate pour activer le RR UhpA, qui à son tour active la transcription de *uhpT* (341, 342).

Une étude comparative du profil transcriptionnel réalisé chez *S. Typhi* indique que UhpA serait impliqué dans la voie d'assimilation du soufre codée par le régulon *cys*. Le régulon *cys* est régulé négativement en l'absence de *uhpA*, lors d'un choc osmotique croissant sur une période de 30 min (343). Cependant, cette étude ne prouve pas un lien direct entre UhpA et la régulation du régulon *cys*.

4.4.28. S2C CitA-CitB

Le S2C CitAB n'est pas caractérisé chez *Salmonella*. CitAB est un S2C où CitA est le SK et CitB est le RR chez *E. coli* (344, 345). CitAB est impliqué dans le catabolisme du citrate en conditions anaérobiques (345). CitB fait l'activation de la transcription des gènes *citCDEFXGT* impliqués dans la fermentation anaérobique du citrate (344), en liant directement la région promotrice de *citC* (345). De plus, le S2C CitAB chez *E. coli* est en relation avec le S2C DcuSR, et ce dernier peut activer la transcription de CitAB (278).

Problématique et objectifs

L'infection à *S. Typhi* représente un fardeau mondial important en santé publique. Le nombre de cas d'infection annuelle reste élevé depuis déjà plusieurs années (16). La résistance aux antibiotiques est de plus en plus observée chez ce pathogène, particulièrement dans les régions d'Afrique et d'Asie (15). Il existe des vaccins contre la fièvre typhoïde, cependant leur efficacité est autour de 75% de protection pour la souche vivante atténuée (27), un taux qui pourrait être amélioré. Il est donc primordial de s'intéresser à ce pathogène et de comprendre les mécanismes de virulence employés par celui-ci lors de l'infection systémique afin de développer de nouveaux vaccins, ou de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour ce faire, notre laboratoire de recherche s'intéresse à démystifier les réseaux de régulation passant par les S2C chez *S. Typhi*. Cette recherche vise à caractériser les S2C retrouvés chez *S. Typhi* et leur phénotype durant les différentes étapes de l'infection systémique. La majorité des connaissances sur les S2C de *Salmonella* proviennent d'études réalisées sur le sérovar *S. Typhimurium* (responsable de gastroentérite) et ont été extrapolées chez *S. Typhi*. Parmi les 28 S2C que possède *S. Typhi*, seulement quelques-uns ont été caractérisés, notamment OmpR, RcsB, SsrB et PhoP, et donc certains d'entre eux pourraient possiblement présenter des patrons de régulation clé dans l'infection à ce sérovar.

Ces diverses preuves et observations ont menés à l'hypothèse selon laquelle les S2C sont importants pour l'adaptation de *S. Typhi* à son environnement et donc certains participent à différentes étapes importantes de l'infection à ce pathogène. Pour valider cette hypothèse, trois objectifs ont été fixés : 1) créer des mutations chromosomiques pour chacun des régulateurs composant un S2C chez *S. Typhi*, 2) de caractériser l'effet de ces mutations lors d'infection de cellules humaines (épithéliales et macrophages) et 3) d'évaluer le profil phénotypique de persistance de ces mutants.

Dans ce projet, les régulateurs des S2C ont été délétés du génome de *S. Typhi* ISP1820 en utilisant une méthode de mutagenèse par échange allélique. Ainsi des mutants individuels

de chacun des régulateurs de ces systèmes ont été créés. Pour connaître l'effet de ces mutations, des essais d'infection *in vitro* de cellules épithéliales intestinales humaines et de macrophages humains ont été réalisés. Durant les tests d'infection de cellules épithéliales, la capacité d'adhésion, d'invasion et de persistance intracellulaire a été mesurée. Lors des infections de macrophages, la capacité de phagocytose et de survie intracellulaire après 24 h a été évaluée. Les divers mutants ont également été soumis à des tests phénotypiques, notamment l'évaluation de la motilité, du morphotype RDAR ainsi que la production de biofilms *in vitro* en conditions statiques. Ce mémoire présente les résultats obtenus et de nouvelles perspectives dans l'implication des S2C dans la régulation et l'infection à *S. Typhi*.

Matériel et Méthodes

1. Souches, plasmides et conditions de culture utilisées

Le tableau V présente les souches bactériennes et plasmide utilisés lors de cette étude. Toutes les souches bactériennes ont été cultivées sur des géloses ou en bouillons Luria-Bertani (LB), sauf indication contraire. De routine, les souches étaient incubées à 37 °C. De plus, selon les expérimentations réalisées, les bouillons de culture étaient incubés avec ou sans agitation. Lorsque nécessaire, les milieux de culture étaient supplémentés de l'antibiotique chloramphénicol à une concentration de 34 µg/ml. Les souches bactériennes utilisées lors de ces tests d'infection sont toutes sensibles à la gentamycine à une concentration de 50 µg/ml. De plus, la souche d'*E. coli*, ne possède pas le gène *asd*, de ce fait le milieu devait être supplémenté d'acide DL- α,ϵ -diaminopimélique (DAP) à une concentration de 50 µg/ml.

La souche ISP1820 de *S. Typhi* utilisée pour cette étude ne possède pas de résistance aux antibiotiques et fut d'abord isolée au Chili (346). Cette souche n'est malheureusement pas encore séquencée, malgré le fait qu'elle soit assez largement caractérisée. De ce fait, toutes les amorces utilisées pour cette étude ont été construites à partir de la souche CT18 (85). Les amorces de cette étude sont listées dans le tableau VII (en annexe).

Tableau V. Description des souches et du plasmide utilisé dans cette étude.

Souches	Description	Résistance/ Utilisation	Référence
<i>S. Typhi</i> ISP1820	Souche sauvage (WT)	-	R. Curtis III
DEF201	$\Delta invA$ et $\Delta ssrB$	-	Labo
DEF433	Allèle <i>phoP24</i> constitutif, X8521	-	R. Curtis III
DEF149	$\Delta ssrB$	-	Labo
DEF570	$\Delta phoB$	-	Labo
DEF863	$\Delta ompR$	-	Labo
DEF1238	$\Delta cpxR$	-	Cette étude
DEF1239	$\Delta arcA$	-	Cette étude
DEF1240	$\Delta kdpE$	-	Cette étude
DEF1241	$\Delta phoP$	-	Cette étude
DEF1247	$\Delta sirA$	-	Cette étude
DEF1248	$\Delta baeR$	-	Cette étude
DEF1253	$\Delta dpiA$	-	Cette étude
DEF1254	$\Delta creB$	-	Cette étude
DEF1289	$\Delta narL$	-	Cette étude
DEF1290	$\Delta narP$	-	Cette étude
DEF1306	$\Delta dcuR$	-	Cette étude
DEF1307	$\Delta glnG$	-	Cette étude
DEF1308	$\Delta pmrA$	-	Cette étude
DEF1310	$\Delta yfhA$	-	Cette étude
DEF1311	$\Delta rstA$	-	Cette étude
DEF1312	$\Delta qseB$	-	Cette étude
DEF1313	$\Delta torR$	-	Cette étude
DEF1314	$\Delta tctD$	-	Cette étude
DEF1315	$\Delta ttrR$	-	Cette étude
DEF1318	$\Delta hydG$	-	Cette étude
DEF1319	$\Delta rcsB$	-	Cette étude
DEF1320	$\Delta copR$	-	Cette étude
DEF1321	$\Delta uhpA$	-	Cette étude
DEF1322	$\Delta yehT$	-	Cette étude
DEF1323	$\Delta citB$	-	Cette étude
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE</i> 44 <i>hsdR</i> 17 <i>recA</i> 1 <i>enda</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>thi</i> -1 <i>relA</i> 1	Transformation	Hanahan 1983
<i>E. coli</i> DH5 α λ pir	<i>supE</i> 44 <i>hsdR</i> 17 <i>recA</i> 1 <i>enda</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>thi</i> - 1 <i>relA</i> 1 λ pir	-	Invitrogen
<i>E. coli</i> X7213	Sm10 λ pir <i>asd thi thr leu tonA lacY supE</i> <i>recA</i> RP4 2-Tc::Mu[λ pir] Δ <i>asdA4</i>	Conjugaison	Kaniga 1998
Plasmide	Description	Résistance	Référence
pMEG375	<i>sac</i> RB, mobRP4, oriR6K, vecteur suicide	Cm	Megan Health

2. Mutagenèse par méthode d'échange allélique

Afin de pouvoir étudier les S2C de *S. Typhi*, les régulateurs de ces systèmes ont été délétés du chromosome de la bactérie (ISP1820). Pour ce faire, la méthode de mutagenèse par échange allélique fut utilisée. Cette méthode vise à faire le retrait du gène de façon non-polaire pour préserver le cadre de lecture des gènes avoisinants.

2.1. Construction du gène régulateur tronqué

Deux réactions PCR ont été effectuées avec les amorces F1 et R2 ainsi que F3 et R4 afin de pouvoir amplifier les régions 5' et 3' du gène (figure 2). Une troisième réaction PCR est effectuée sur l'ADN des amplicons, où une zone de chevauchement a préalablement été insérée sur les amorces R2 et F3, permettant ainsi de générer un fragment d'ADN correspondant à l'allèle muté. Ce fragment d'ADN possède seulement les portions 5' et 3' du gène natif. De plus, ce fragment délété possède dans ces extrémités 5' et 3' des sites de restriction qui ont été préalablement insérés sur les amorces F1 et R4, ce qui fait en sorte que ce fragment peut être cloné dans un vecteur plasmidique.

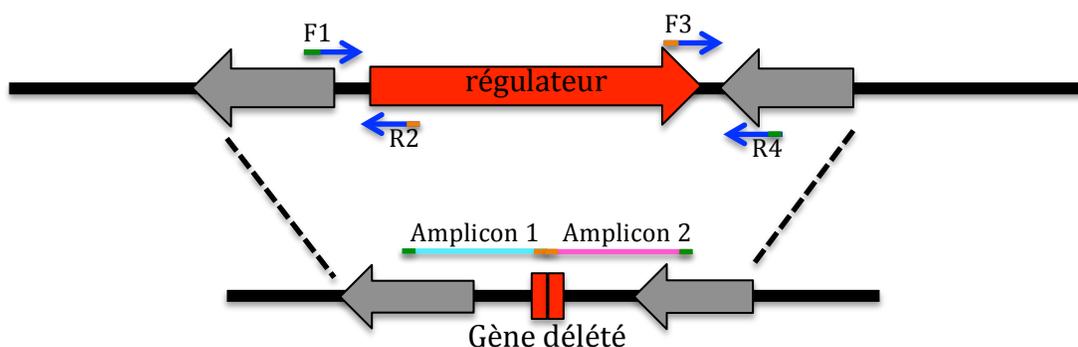


Figure 2. Représentation schématique de la construction d'un gène délété. Les flèches bleues représentent les amorces utilisées pour faire l'amplification. Sur ces flèches, les parties orange représentent la zone de chevauchement et les parties vertes représentent les sites de restriction. Le gène en rouge est le gène régulateur qui doit être retiré.

2.2. Digestion, ligation et insertion dans un plasmide suicide

Le fragment d'ADN comportant l'allèle muté (gène délété) ainsi que le vecteur plasmidique pMEG375 sont digérés par des enzymes de restriction (ces enzymes peuvent différer selon le gène délété). La digestion est réalisée à 37 °C durant 15 minutes avec les enzymes de restriction ANZA Fast-cut (Invitrogen). Suite à la digestion, les enzymes de restriction sont inactivées, par une incubation de 30 minutes à 65 °C.

La ligation du fragment d'ADN délété et du vecteur digérés est effectuée. Ces fragments d'ADN sont incubés ensemble avec une T4 DNA ligase (New England Biolabs), à 16 °C durant une période d'environ 18 h. La ligase est une enzyme qui permet de lier ensemble des fragments d'ADN (cohésifs ou non), puisqu'elle catalyse la formation de nouveaux liens phosphodiester entre les extrémités 5' phosphate et 3' hydroxyle des brins d'ADN.

Le vecteur utilisé, pMEG375 est un plasmide suicide. Ce plasmide possède plusieurs caractéristiques qui lui permet d'être utilisé pour faire de la conjugaison bactérienne, notamment des gènes de mobilisation. Ce plasmide possède une origine de répllication (R6K) nécessitant la protéine Pir. De plus, ce plasmide possède le gène *sacB* qui rend la croissance toxique en présence de sucrose. Ce plasmide possède également le gène de résistance au chloramphénicol (Cm). Initialement, la répllication du vecteur pMEG375 est supportée par la souche *E. coli* DH5 α pir.

2.3. Extraction plasmidique

L'extraction de plasmide est réalisée grâce à une trousse d'extraction (Miniprep kit de Biobasics). Pour ce faire, la souche possédant le plasmide est incubée durant environ 18 h dans un bouillon de 5 ml avec antibiotiques et agitation. La culture bactérienne est concentrée par centrifugation et le protocole du manufacturier est suivi avec les solutions et colonnes appropriées fournies dans la trousse.

2.4. Transformation d'ADN

Le plasmide possédant la délétion est inséré dans la souche *E. coli* X7213 par une méthode de transformation d'ADN par choc thermique. Le plasmide est ajouté aux bactéries préalablement décongelées sur glace. Les bactéries (avec le plasmide) sont incubées 90 secondes à 42°C (choc thermique) et remis rapidement sur glace pour 2 min. Les bactéries sont ensuite incubées à 37°C avec agitation durant 1h30, sans antibiotiques, (avec suppléments DAP, puisque la souche *E. coli* est Δasd , est essentiel à sa croissance), afin que les bactéries puissent se multiplier et répliquer le plasmide. Par la suite, les bactéries sont étalées sur gélose LB-Cm afin de sélectionner pour les transformants. Les transformants sont ensuite confirmés par PCR, afin d'identifier les clones ayant bien reçu le plasmide avec le gène régulateur délété.

2.5. Conjugaison bactérienne

La souche *E. coli* X7213 possède le système RP4 dans son génome et permet de haute fréquence de recombinaison (Hfr). Ensemble, ces caractéristiques permettent une conjugaison efficace entre *E. coli* (X7213 possédant le pMEG375) et *S. Typhi*. La conjugaison est effectuée sur un milieu liquide/solide. Les souches donneuses (*E. coli*) et receveuses (*S. Typhi*) sont incubées dans des bouillons LB (avec supplément DAP et Cm pour *E. coli*) sans agitation à 37 °C durant environ 18 h, afin que les bactéries puissent exprimer les pili de conjugaison. Les bactéries sont par la suite concentrées par centrifugation et re-suspendues et ajoutées sur une même gélose LB-DAP, de manière à ce que les cultures se mélangent. Les géloses LB-DAP sont ensuite incubées pour 4 à 6 h afin que les bactéries effectuent la conjugaison. Des bactéries sont récoltées, diluées et sont étalées sur géloses LB-Cm. L'absence du supplément DAP permet l'élimination des souches d'*E. coli* et la présence de Cm élimine les souches de *S. Typhi* n'ayant pas reçu le plasmide. La croissance sur les géloses LB-Cm permet ainsi de sélectionner les souches de *S. Typhi* ayant reçu le plasmide et ayant fait une première recombinaison, soit l'intégration du plasmide.

Suite à la conjugaison, les conjugants sont soumis à une contre-sélection par le sucrose. La contre-sélection permet de sélectionner les bactéries ayant perdu le plasmide. De cette façon, les bactéries sélectionnées sont celles ayant fait ou non les deux recombinaisons

permettant l'insertion du gène délété à l'endroit du gène natif. Les souches obtenues sont mutantes pour le gène délété ou de type sauvage. Afin de sélectionner les souches mutantes, les bactéries contre-sélectionnées seront confirmées par PCR. Une réaction PCR est également réalisée afin de confirmer la souche *S. Typhi* avec des amorces vérifiant la présence d'un gène unique à cette bactérie (le gène *tviB*).

3. Courbe de croissance

Afin de s'assurer que la délétion réalisée sur le gène régulateur n'affecte pas la croissance de la souche, la croissance des mutants après une culture de nuit a été vérifiée. Puisque la souche *ΔarcA* produisait de très petites colonies, une courbe de croissance fut réalisée. Les souches sont cultivées en bouillon LB avec agitation à 37 °C durant environ 18 h. À partir de ces cultures, une dilution 1:100 est réalisée dans des tubes de LB frais et la densité optique est prise directement avec ces tubes. La densité optique (DO) est ensuite mesurée à 600 nm à chaque heure pour une période de 6 heures, ainsi qu'une mesure au temps 24 h de croissance. Trois réplicas biologiques ont été effectués.

De plus, aux temps 6 h et 24 h, des dilutions ont été effectuées et inoculées sous forme de gouttes sur des géloses LB. Les unités formatrices de colonies (UFC) ont été calculées pour les dilutions 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} . Trois réplicas biologiques et techniques ont été réalisés.

4. Tests d'adhésion, d'invasion et de persistance en intracellulaire dans les cellules épithéliales intestinales humaines INT407

Les cellules INT407 (ATCC #CCL-6) sont cultivées dans du milieu Eagle's minimal essential medium (EMEM) complété avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur et de 25 mM d'acide N-2-hydroxyéthyl piperazine-N -2-ethanesulfonique (HEPES). Les cellules sont repiquées de façon hebdomadaire et sont conservées à 37 °C avec 5% de dioxyde de carbone (CO₂). La veille des tests, les cellules sont distribuées dans une plaque de 96 puits avec 4×10^4 cellules par puits et les souches de *S. Typhi* sont incubées dans du LB 0,3

M de NaCl (chlorure de sodium) à 37 °C sans agitation (milieu connu pour induire le SPI-1) (347) durant environ 18 h.

Le jour du test, les bactéries sont remises en suspension et la DO à 600 nm est prise pour chacune des souches testées pour obtenir une multiplicité d'infection de 20 pour 1. Les UFC initiales sont obtenues par dilution dans du tampon phosphate salin (PBS) (8 g/L de chlorure de sodium, 0,2 g/L de phosphate de potassium (KH₂PO₄), 2,17 g/L de phosphate d'ammonium et 0,2 g/L de chlorure de potassium ajusté à pH 7,4). Les bactéries sont ajoutées à la plaque de cellules, en triplicata technique. Différents temps d'incubation ont été utilisés, soit un temps de 90 minutes (T90) correspondant à l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales, un temps de 180 minutes (T180) correspondant à l'invasion des cellules et un temps de 18 h (T18) correspondant à la persistance des bactéries dans les cellules. Pour chacun de ces temps, la UFC a été obtenue par dilution, en utilisant une solution de PBS-acide déoxycholique 0,1% (PBS-DOC) afin de lyser les cellules et libérer les bactéries. Trois réplicas techniques sont réalisés par test et trois réplicas biologiques ont été réalisés pour chaque souche testée.

5. Tests de phagocytose et de survie dans les macrophages humains THP-1

Les cellules utilisées sont des monocytes humains THP-1 (ATCC #TIB-202) cultivées dans un milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur, de 1 mM de sodium pyruvate (Wisent) et de 1% d'acides aminés non-essentiels (MEM) (Wisent). Les cellules sont repiquées de façon hebdomadaire et sont conservées à 37 °C avec 5% de CO₂. Avant les tests, les cellules sont distribuées dans une plaque de 96 puits avec 8 x 10⁴ cellules par puit et sont différenciées en macrophage par exposition au phorbol 12-myristat 13-acetate (PMA) durant 48 h à 37°C avec 5% de CO₂. Les souches de *S. Typhi* sont incubées la veille du test dans des bouillons de 5ml de LB à 37°C sans agitation durant une période d'environ 18 h.

Le jour du test, les bactéries sont remises en suspension et la DO à 600nm est prise pour chacune des souches testées pour obtenir une multiplicité d'infection de 10 pour 1. Les UFC initiales sont déterminées par dilution dans du PBS jusqu'à la dilution 10^{-4} . La plaque de cellule est infectée et le test est effectué comme précédemment mentionné. Différents temps d'incubation ont été utilisés, soit un temps de 20 minutes (T0) qui correspond à la phagocytose des bactéries et un temps de 24 h (T24) correspondant à la survie des bactéries dans les macrophages. Les UFC sont calculées pour chacun des temps. Trois répliques techniques sont réalisées par test et trois répliques biologiques ont été réalisés pour chaque souche testée.

6. Tests de motilité en tubes

Pour vérifier la motilité, les bouillons de bactéries (incubé environ 18 h à 37 °C avec agitation) sont utilisés pour inoculer, à l'aide d'un fil droit, des géloses motilité de 3 ml en tube (13x100). Ces géloses contiennent le milieu «Motility Test Medium» de BBL, dans lequel est ajoutée une solution de 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC) pour faciliter la détection de la motilité. Les géloses motilité sont incubées à 37 °C durant une période d'environ 18 h. Trois répliques biologiques ont été réalisés pour chaque souche testée.

7. Évaluation du phénotype RDAR («Red Dry And Rough»)

Pour vérifier le phénotype RDAR, les bouillons de bactéries (incubé environ 18 h à 37 °C avec agitation) sont utilisés pour inoculer une goutte de 6 µl sur des géloses congo rouge (CR). Les géloses CR contiennent 1% de tryptone et 1% d'agar, auquel sont ajoutés des concentrations de 40 µg/ml du colorant rouge de congo et 8 µg/ml du colorant bleu de coomassie. Les géloses CR sont incubées à 37 °C pour une période de 6 jours. Trois répliques biologiques ont été réalisés pour chaque souche testée.

8. Biofilms

Le protocole a été adapté de Ganjali Dashti et al. (2016) (348). Les souches de *S. Typhi* sont incubées dans des bouillons de LB à 37°C avec agitation durant environ 18h. Les cultures sont ensuite diluées 1:100 dans un milieu BGK contenant 1,22% de bile, 2% de glucose, 0,25% de chlorure de potassium (KCl) et 3% de «nutrient broth». Ces dilutions sont ensuite

inoculées en triplicata technique dans une plaque de 96 puits en polypropylène, dont les puits ont préalablement été enrobés de cholestérol. La plaque inoculée est incubée durant une période de 72 h dans des conditions statiques à 37°C.

La biomasse est calculée par coloration au cristal violet tel que décrit selon Tremblay et al. (2015) (349). Le surnageant est délicatement retiré et les puits (biofilms) sont lavés délicatement avec de l'eau (non-stérile). La plaque est mise à sécher. Après séchage, la plaque est colorée à l'aide d'une solution de cristal violet à 0,1% durant 30 min. Suite à la coloration, le colorant est retiré et la plaque est de nouveau lavée délicatement avec de l'eau (non-stérile), jusqu'à ce que l'eau retirée ne soit plus colorée. La plaque est ensuite séchée. Une solution de 80:20 d'éthanol-acétone est ensuite utilisée, afin de dissoudre la biomasse produite (les biofilms). La solution de biofilm dissous est transférée dans une nouvelle plaque, pour être lu au lecteur de plaque à un DO de 595nm. Trois répliques biologiques ont été réalisés pour chaque souche testée.

Résultats

1. Mutagenèse de tous les régulateurs des S2C de *S. Typhi* ISP1820

La caractérisation d'un gène débute généralement par la délétion de ce gène et l'observation des changements phénotypiques suite à cette délétion, par rapport à la souche sauvage. Afin de déterminer le rôle et l'impact des S2C dans la pathogenèse de *S. Typhi*, les 28 gènes régulateurs de ces systèmes ont été délétés du chromosome de cette bactérie par la méthode de mutagenèse par échange allélique (voir le tableau V). Chacune des délétions a été validée par PCR. Les gènes régulateurs comportant des gènes avoisinants ont été séquencés, afin de valider la conservation des cadres de lecture. De plus, afin de s'assurer qu'il s'agit bien d'une souche de *S. Typhi*, un PCR a été réalisé sur un gène unique à cette bactérie, le gène *tviB*.

2. Courbe de croissance

Une courbe de croissance a été réalisée sur la souche *ΔarcA*, puisque le morphotype sur gélose de cette souche était le seul à différer de la souche sauvage (WT). La souche *ΔarcA* présente sur gélose de très petites colonies. Afin de s'assurer que cette mutation n'affecte pas la croissance de cette souche (*ΔarcA*), une courbe de croissance a été effectuée en milieu LB liquide (figure 3A). De plus, les UFC ont été calculées pour les temps de 6 h et de 24 h, puisque la croissance en liquide ne semblait pas être affectée, comparativement à la croissance en milieu solide (figure 3B et C). Les résultats indiquent que la souche *ΔarcA* ne présente aucun défaut de croissance en milieu liquide, en fait la croissance est améliorée par rapport à la WT. Cependant, la croissance en milieu solide (sur gélose) est diminuée par rapport à la WT. Les résultats permettent de conclure qu'il n'y a aucun défaut de croissance en milieu liquide LB, mais la croissance est diminuée en milieu solide, par rapport à la WT. De plus, le mutant *arcA* fut le seul à présenter un défaut de croissance sur gélose, tous les autres mutants ont un inoculum de départ similaire au WT.

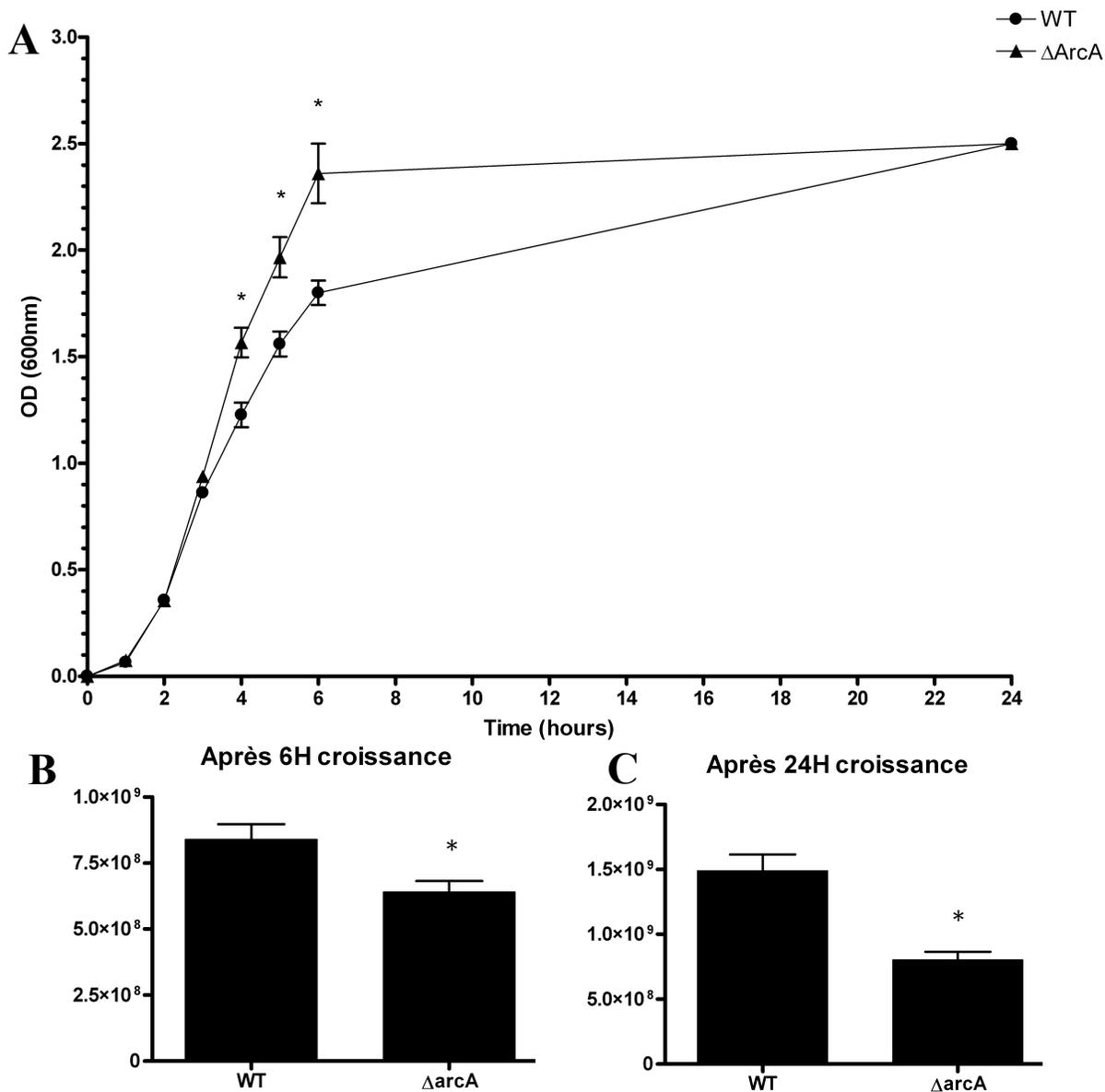


Figure 3. Courbe de croissance de la souche Δ arcA et de la WT. A) Courbe de croissance en milieu LB liquide. Densité optique (DO) prise à 600 nm des souches de *S. Typhi* (WT ou mutante) prise à chaque heure de 0 à 6 h et prise une dernière fois à 24 h.

Chaque courbe représente une moyenne de trois répliques biologiques. B) Les UFC calculés pour la souche de *S. Typhi* WT ou mutante pris au temps de 6 h et C) au temps de 24 h. Les essais sont significatifs lors que $P < 0,05$ (*) suite à un T-test de Student par rapport à la WT.

3. Motilité

Les flagelles sont des éléments importants dans la pathogenèse de *S. Typhi*, ceux-ci participe à la motilité et cela permet de contribuer aux contacts entre les bactéries et les cellules de l'hôte (33-35). Pour cette raison, la motilité des différentes souches créées a été évaluée par la méthode en tubes. La souche Δ *fliC* sert de contrôle négatif, où *fliC* est la sous-unité composant le filament flagellaire (2). Aucun des mutants de *S. Typhi* ne présentent un défaut de motilité (données non présentées).

4. Adhésion, invasion et persistance dans les cellules épithéliales intestinales humaines (INT407)

Le passage de la barrière de cellules épithéliales intestinales est un élément clé dans la pathogenèse de *S. Typhi* (2). Cette méthode expérimentale d'infection de cellules *in vitro* permet d'évaluer plusieurs éléments, notamment d'évaluer les capacités d'adhésion, d'invasion et la persistance de *S. Typhi* dans ce type cellulaire. De cette façon, il est possible de constater l'importance des S2C lors de cette étape de l'infection à *S. Typhi*. La souche Δ *SPIs* correspond à une souche comportant des mutations dans un gène du SPI-1 (*invA*) et dans un gène du SPI-2 (*ssrB*) et sert de contrôle négatif lors de l'infection des cellules épithéliales. Les niveaux d'adhésion, d'invasion et la persistance des mutants lors de l'interaction avec les cellules épithéliales est présentée dans la figure 12 en annexe.

4.1. Adhérence aux cellules épithéliales

Tout d'abord, l'analyse de l'adhésion a été effectuée, soit le nombre de bactéries associées aux cellules épithéliales suite à un temps d'interaction de 90 minutes. Cela permet d'évaluer la capacité d'adhérer aux cellules pour chacun des mutants en comparant à la WT.

Les résultats démontrent que certaines mutations ont des effets sur les capacités d'adhésion (figure 4). Les mutants *arcA*, *narL*, *yfhA*, *rstA*, *dcuR*, *glnG*, *pmrA*, *torR*, *rcsB*, *yehT* et *uhpA* présentent une perte significative dans leur capacité d'adhésion aux cellules. Alors que les mutants *phoP*, *baeR*, *dpiA* et *creB*, présentent une augmentation significative de leur

capacité d'adhésion face à la WT. Les autres mutants ne présentent pas de différence significative d'adhésion avec la WT.

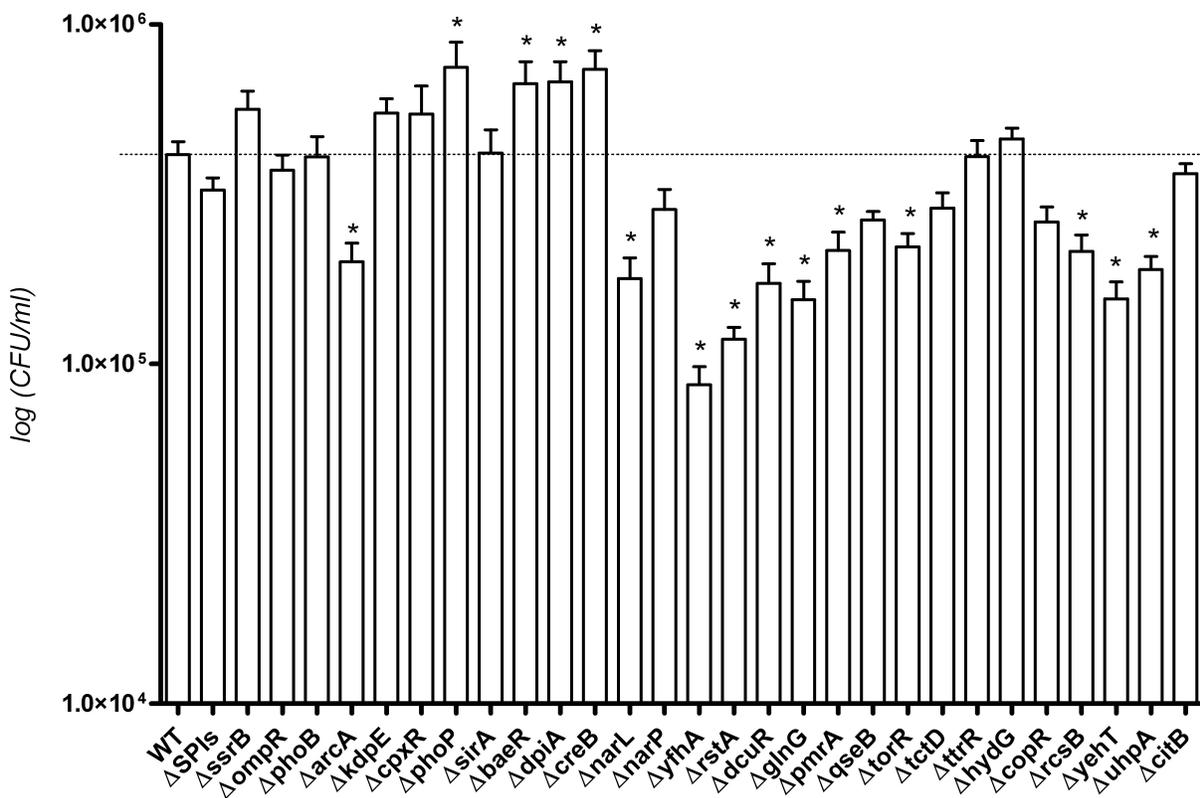


Figure 4. Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales INT407. Les données présentées sont le log (en UFC/ml) ± l'erreur type (SEM) d'au moins trois expériences en triplicatas. L'adhésion représente le nombre de bactéries retrouvées adhérentes aux cellules après 90 minutes d'interaction. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*) suite à un T-test de Student par rapport à la WT.

4.2. Invasion des cellules épithéliales

La capacité d'invasion des cellules a également été comparée pour chacun des mutants avec la WT. La capacité d'invasion correspond au nombre de bactérie ayant pénétré les cellules épithéliales (après un temps d'interaction de 180 minutes). Les bactéries extracellulaires ont été éliminées par la présence de gentamycine, afin de s'assurer de récupérer seulement les bactéries ayant pénétrées les cellules.

L'analyse des résultats révèle que la capacité d'invasion de cellules des mutants *ompR*, *arcA*, *sirA*, *narL*, *yfhA*, *rstA*, *dcuR*, *yehT* et du contrôle Δ *SPIs* est significativement diminuée (figure 5). Alors que la capacité d'invasion est augmentée par rapport à la WT pour les mutants *baeR*, *dpiA*, *creB* et *rcsB*. Les autres mutants ne présentent pas de différence significative dans la capacité d'invasion de cellules par rapport à la WT.

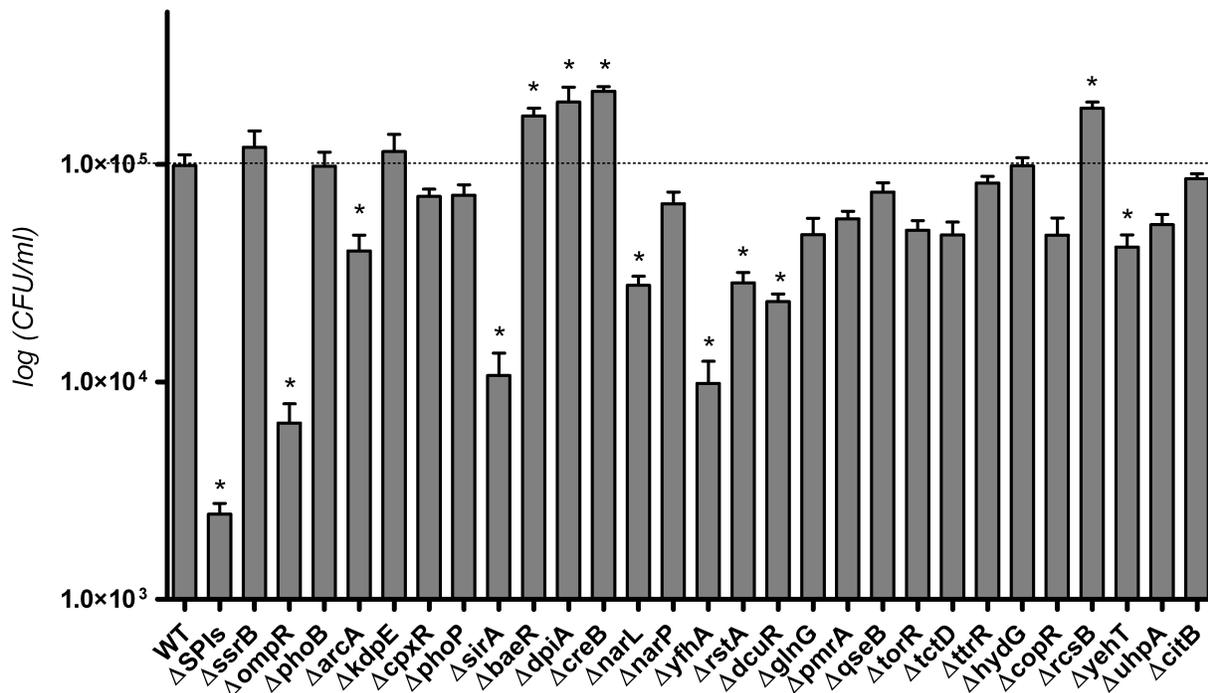


Figure 5. Capacité d'invasion des cellules épithéliales intestinales INT407. Les données présentées sont le log (en UFC/ml) \pm l'erreur type (SEM) d'au moins trois expériences en triplicatas. L'invasion représente le nombre de bactéries ayant pénétré les cellules après 180 minutes d'interaction. Les essais sont significatifs lors que $P < 0,05$ (*) suite à un T-test de Student par rapport à la WT.

4.3. Persistance à l'intérieur des cellules épithéliales

Dans un dernier temps, la persistance intracellulaire des différents mutants à l'intérieur des cellules épithéliales intestinales a été comparée avec la WT. La persistance intracellulaire correspond au nombre de bactéries ayant pénétrer et persister jusqu'à 18 h dans ce type cellulaire.

L'analyse des résultats démontre que la capacité de persister est significativement diminuée pour les mutants *ompR*, *arcA*, *sirA*, *narL*, *yfhA*, *copR*, *yehT*, ainsi que le contrôle Δ *SPIs*, lorsque comparé à la WT (figure 6). Alors qu'aucun mutant ne présente une persistance significativement augmentée.

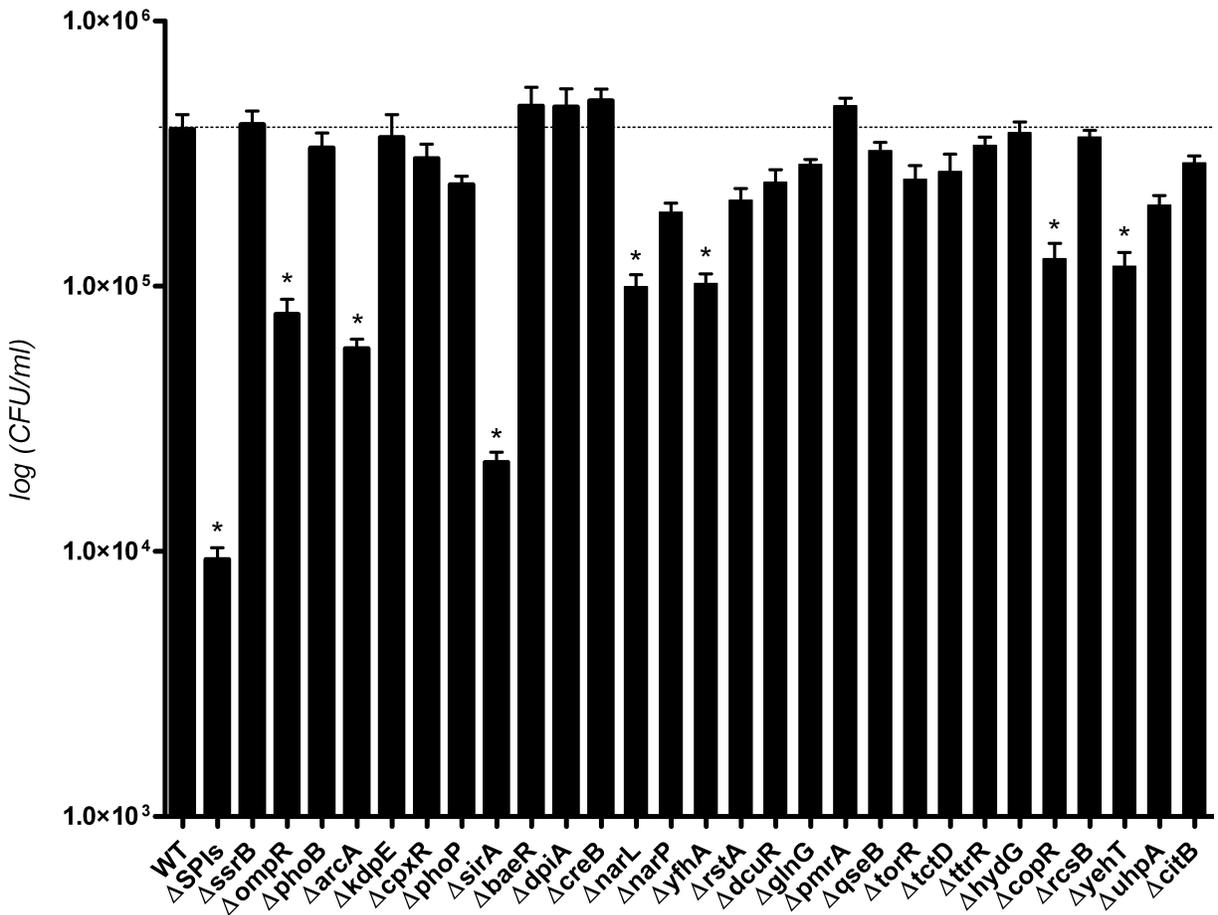


Figure 6. Capacité de persistance intracellulaire à l'intérieur des cellules épithéliales intestinales INT407. Les données présentées sont le log (en UFC/ml) \pm l'erreur type (SEM) d'au moins trois expériences en triplicatas. La persistance intracellulaire représente le nombre de bactéries ayant pénétrer et persister jusqu'à 18 h dans les cellules. Les essais sont significatifs lors que $P < 0,05$ (*) suite à un T-test de Student par rapport à la WT.

5. Phagocytose et survie dans les macrophages humains (THP-1)

Certains S2C sont importants pour la survie à l'intérieur des macrophages lors de l'infection (167, 228). De plus, la survie dans ce type cellulaire correspond à une étape clé dans la pathogenèse et la virulence de *S. Typhi* (2, 27). Il serait donc pertinent de vérifier le rôle joué par les S2C dans l'interaction faite avec les macrophages. L'infection de macrophages humains *in vitro* permet d'évaluer le rôle des S2C d'une part dans la phagocytose et en second lieu dans la survie correspondant à une période de 24 h dans les macrophages. La souche *phoP24* correspond à une souche où le régulateur PhoP est exprimé de façon constitutive et provoque un phénotype atténué au niveau de la survie dans les macrophages (350). Cette souche *phoP24* sert de contrôle négatif lors de l'infection de macrophages. Une figure comportant la phagocytose et la survie 24 h combinées est présentée dans la figure 13 en annexe.

5.1. Phagocytose par les macrophages

La capacité à être phagocyté par les macrophages a été évaluée de façon à comparer les différents mutants avec la WT. La phagocytose représente le nombre de bactéries été phagocyté par les macrophages après une période de 20 minutes d'interaction.

L'analyse des résultats démontre que la capacité d'être phagocyté chez les mutants *ducR*, *ttrR* et *hydG* est significativement diminuée lorsque comparé avec la WT (figure 7). Alors que cette capacité est significativement augmentée chez les mutants *phoB*, *kdpE*, *pmrA*, *rcsB*, *yehT* et *uhpA*.

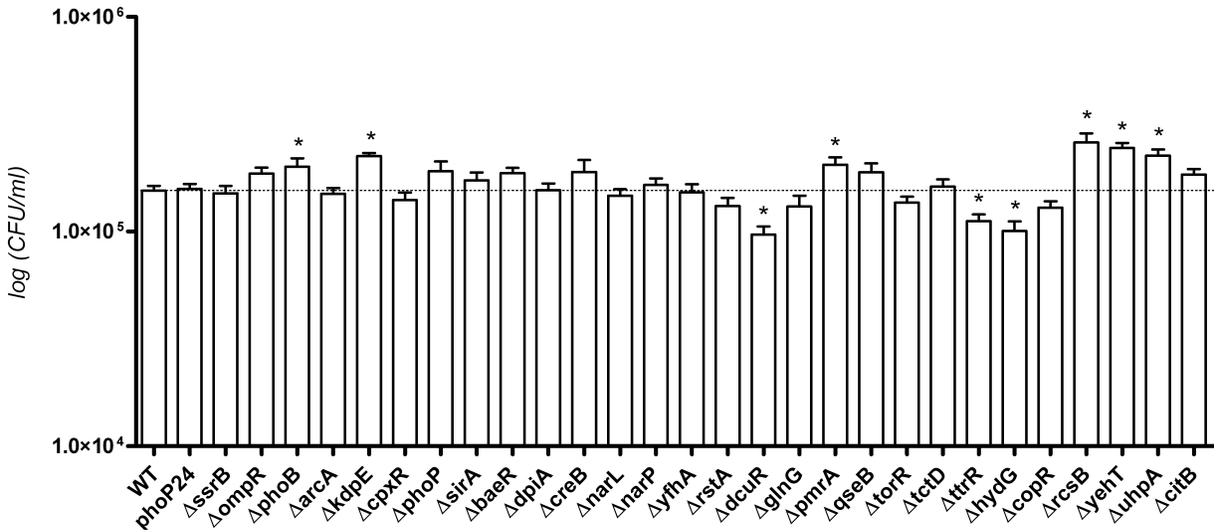


Figure 7. Capacité d’être phagocyté par les macrophages humains THP-1. Les données présentées sont le log (en UFC/ml) \pm l’erreur type (SEM) d’au moins trois expériences en triplicatas. La capacité à être phagocyté représente le nombre de bactéries ayant été phagocytées par les macrophages après une interaction de 20 minutes. Les essais sont significatifs lors que $P < 0,05$ (*) suite à un T-test de Student par rapport à la WT.

5.2. Survie dans les macrophages

La survie intracellulaire des différents mutants à l’intérieur des macrophages a été comparée avec la WT. La survie correspond au nombre de bactéries ayant pénétré et persisté jusqu’à 24 h dans ce type cellulaire.

L’analyse des résultats révèle que la capacité de survie dans les macrophages est significativement diminuée pour les mutants *arca*, *kdpE*, *cpxR* ainsi que pour le contrôle *phoP24* lorsque comparé avec la WT (figure 8). Alors que pour les mutants *sirA*, *pmrA*, *torR*, *ttrR*, *hydG*, *rcsB*, *yehT* et *citB* la survie est significativement augmentée en rapport avec la WT.

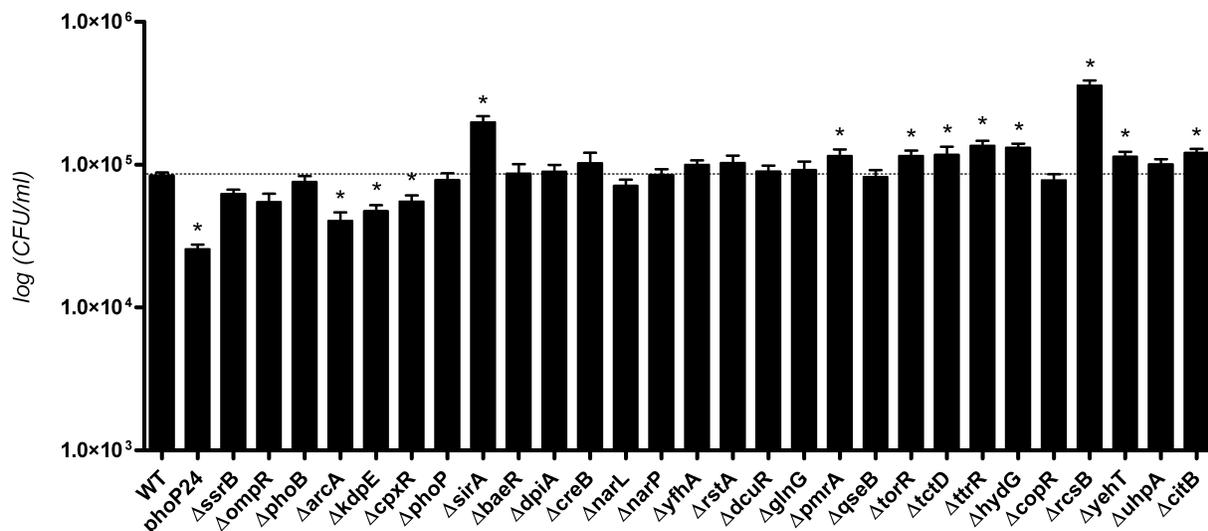


Figure 8. Capacité de survie dans les macrophages humains THP-1. Les données présentées sont le log (en UFC/ml) \pm l'erreur type (SEM) d'au moins trois expériences en triplicatas. La capacité de survie représente le nombre de bactéries ayant persisté dans les macrophages après une période de 24 h. Les essais sont significatifs lors que $P < 0,05$ (*) suite à un T-test de Student par rapport à la WT.

6. Phénotype RDAR

Le morphotype RDAR permet d'évaluer un comportement multicellulaire des bactéries par l'expression de composantes adhésives de la matrice extracellulaire comme la cellulose et les fimbriae curli (351). Le colorant rouge de congo ajouté au milieu interagit avec ces composantes et permet de rendre les colonies rouges. Le morphotype RDAR se caractérise par une coloration rouge et une surface rugueuse et sèche des colonies, avec la présence de rides au travers de celles-ci (351). Ce morphotype permet d'évaluer quel S2C serait le plus susceptible de contribuer à former des biofilms, puisque c'est un milieu utilisé pour constater le mode de vie multicellulaire qui est dépeint par l'expression de composantes de la matrice extracellulaire (351). De plus, les bactéries exprimant le morphotype RDAR présentent une formation de biofilms importante sur des surfaces abiotiques (352).

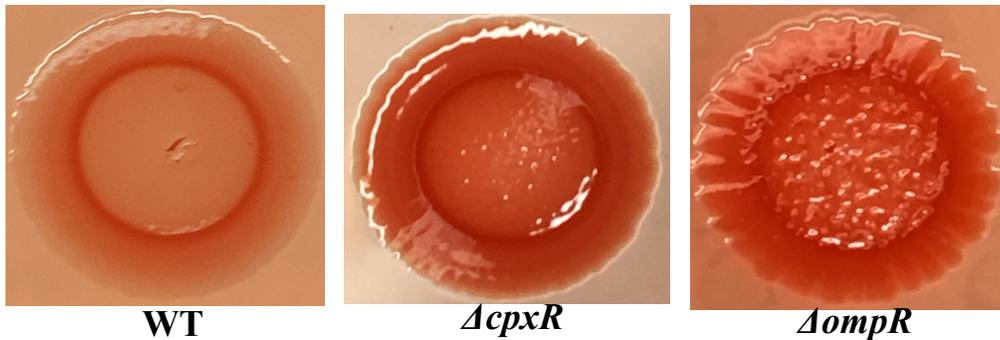


Figure 9. Caractérisation phénotypique du morphotype RDAR sur milieu géloses congo rouge à 37°C. Les essais phénotypiques ont été réalisés en triplicata biologique.

Les mutants présentant le morphotype RDAR sont *ompR* et *cpxR* (figure 9), alors que les autres mutants présentent un morphotype similaire à celui de la WT (données non présentées). Cependant, puisque l'opéron cellulose présente un pseudogène (*bcsC*) chez *S. Typhi* (160), ce milieu permet seulement d'informer sur la production des fibres fimbriaires curli, ainsi que la susceptibilité au mode de vie multicellulaire.

7. Biofilms

La capacité de formation de biofilms est associée à la persistance de l'infection à *S. Typhi* (153, 154). Cette capacité a donc été évaluée chez tous les mutants par rapport à la WT, afin de connaître quel S2C serait impliqué pour la formation de biofilms. De plus, il a été démontré qu'une surface recouverte de cholestérol ainsi que la présence de bile favorise la formation de biofilms (76). Les mutants *phoB*, *kdpE*, *baeR*, *dpiA*, *creB*, *narL*, *torR* et *tctD* présentent une capacité diminuée de la production de biofilms par rapport à la WT. Alors que seulement le mutant *ompR* présente une capacité accrue à faire des biofilms (Figure 10).

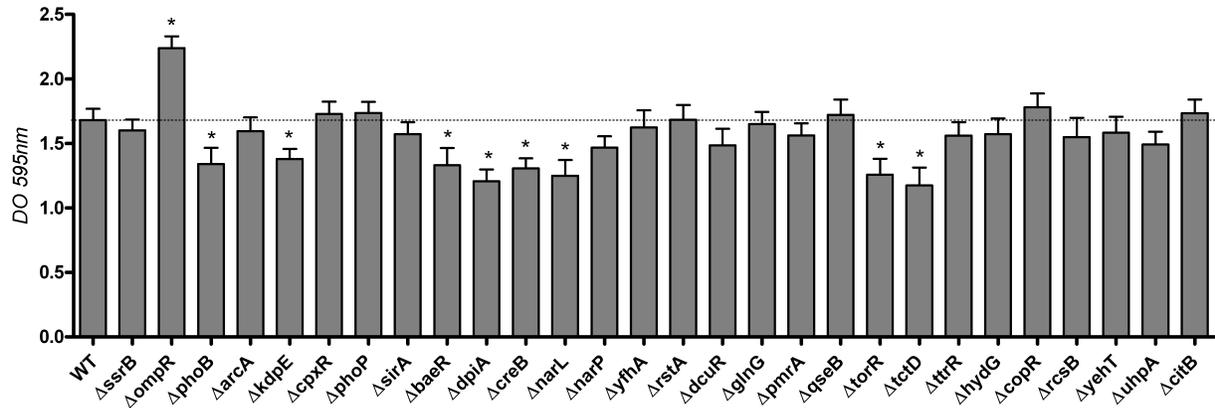


Figure 10. Capacité de formation de biofilms en conditions statiques à 37°C après 72h. Densité optique (DO) mesurée suite à une coloration au cristal violet de la biomasse produite. Les données présentées sont la densité optique à 595 nm \pm l'erreur type (SEM) d'au moins trois expériences en triplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*) suite à un T-test de Student par rapport à la WT.

Discussion

La bactérie *S. Typhi* est l'agent étiologique de la fièvre typhoïde, un pathogène hôte restreint spécifique, dont le seul réservoir connu est l'être humain (15). Ce pathogène représente un problème de santé publique important et est toujours d'actualité (16). Une grande partie des données connues et recueillies chez ce pathogène proviennent de l'étude du sérovar *S. Typhimurium*, dans un modèle d'infection systémique murin. *S. Typhimurium* a été utilisé comme modèle d'étude, puisque ce sérovar présente de très grande homologie sur le plan génétique avec *S. Typhi*. Ces deux sérovares partagent environ 89% de leurs gènes (353). Cependant, peu de choses sont connues sur *S. Typhi*, particulièrement suite à l'étude directe de ce pathogène et non de son homologue en modèle murin. La différence entre ces sérovares pourrait résider dans la régulation de l'expression des gènes, plutôt que dans la quantité de gènes, puisque *S. Typhi* est un pathogène ayant évolué par la perte de fonction de gènes (354).

L'objectif de cette étude visait à caractériser les S2C de *S. Typhi* et d'identifier les S2C importants lors des étapes clés de l'infection à ce pathogène, puisque ceux-ci sont à peine caractérisés chez ce sérovar. La délétion et la caractérisation des régulateurs de ces systèmes contribuent à identifier l'implication de chacun de ceux-ci dans l'infection à *S. Typhi*.

Les objectifs de cette recherche ont permis de récolter beaucoup d'information sur les S2C de *S. Typhi*. La délétion de chacun des régulateurs permet d'évaluer le rôle individuel de chacun d'entre eux lors de l'infection de cellules humaines. Le profil phénotypique de chacun des S2C a été observé pour la motilité, le morphotype RDAR et la capacité de production de biofilms. Cette étude a permis de révéler l'impact que possède les S2C sur la pathogénèse de ce pathogène et expose le rôle des S2C lors des étapes clés d'infection à *S. Typhi*.

Chez *S. Typhi*, 28 S2C ont été identifiés, un nombre se rapprochant de celui du sérovar *S. Dublin*, un autre sérovar de salmonelle qui est hôte adapté aux bovins, qui en possède 31 (355). Le tableau IV présente les S2C de *S. Typhi*, ainsi que leur rôle et leur rôle présumé lorsque ceux-ci ne sont pas caractérisés chez ce sérovar ou chez cette espèce.

1. Construction et caractérisation des mutants

Tous les gènes régulateurs des S2C de *S. Typhi* ont été délétés en utilisant une méthode de mutagenèse par échange allélique. Les délétions ont été vérifiées par séquençage, afin de s'assurer que la polarité des gènes avoisinants soit préservée.

La croissance de 27 mutants dans des conditions classiques de milieu LB en bouillons ou en géloses est similaire à la WT. Cependant, le mutant *arcA* présente une croissance améliorée par rapport à la WT en condition liquide, alors qu'en milieu solide, ce mutant présente de très petites colonies et un défaut de croissance significatif (figure 3). Puisque ArcA est le régulateur global en croissance anaérobie (203), la présence d'oxygène pourrait affecter la croissance de ce mutant. En milieu solide, les colonies sont directement et constamment exposées à l'oxygène, alors qu'en milieu liquide la présence de l'oxygène est moins importante. De plus, il semble qu'un mutant *arcA* présente un défaut de division cellulaire, puisque ArcA régule des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire (200). Ce défaut est également observé chez le sérovar *S. Dublin* (355) et chez *E. coli* K-12 (356). Ces observations suggèrent que ArcA est bien un régulateur global de réponse. Les résultats concernant ce mutant devront être évalués avec précaution.

Dans cette étude, aucun des mutants individuels n'a présenté de défaut de motilité. Cependant, les conditions *in vitro* employées ne permettaient pas la présence des signaux requis pour l'activation des systèmes, pour lesquels les mutants auraient pu avoir un phénotype. Pour cette raison, aucune différence n'a été observée et ce malgré le fait que certains S2C sont connus pour être impliqués dans la régulation de la motilité, notamment les activateurs de motilité *qseB* et *arcA*, ainsi que les répresseurs *sirA* et *rscB*. Ceci permet également d'indiquer qu'aucun S2C régule directement la motilité et qu'il y a beaucoup de régulation croisée entre ces systèmes et le régulateur majeure de la motilité *flhDC*.

2. Caractérisation des S2C de *S. Typhi*

Les S2C sont impliqués dans l'adaptation des bactéries à une variété de stimuli environnementaux (167). Les mutants ont été testés en réponse à des infections de cellules humaines, et leur profil phénotypique dans différentes conditions a été répertorié. Le tableau VI présente la compilation des données obtenues lors de cette étude.

2.1. Systèmes ne présentant aucun phénotype

Les mutants *ssrB*, *narP* et *qseB* ne présente aucune différence avec la WT lors de tous les tests réalisés. Le phénotype de Δ *ssrB* peut s'expliquer par le modèle d'étude employé dans le laboratoire, puisque Forest et al. présente également que *ssrB* n'a pas d'importance dans la régulation du SPI-2 (112). Alors que plusieurs autres études soulignent l'importance de *ssrB* dans la régulation du SPI-2 (du moins chez *S. Typhimurium*) (48, 147, 179-182). Le phénotype du mutant *narP* pourrait s'expliquer par le fait que le modèle d'étude ne génère pas de forte concentration de nitrate pouvant activer ce S2C. Le résultat concernant le mutant *qseB* peut être expliqué par l'absence des signaux perçus par ce S2C, soit les neurotransmetteurs.

2.2. PhoB

Le mutant *phoB* est davantage phagocyté que la WT et présente une diminution de production de biofilms. *phoB* a un rôle dans la virulence chez d'autres espèces bactériennes, notamment chez *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli* (357). Chez *V. cholerae*, lorsque les concentrations de Pi sont limitées PhoB diminue l'expression des gènes de virulence pour promouvoir l'expression de gènes impliqués dans la survie, ce qui pourrait expliquer le fait que le mutant *phoB* soit plus facilement phagocyté (358). Chez *V. cholerae*, PhoB est impliqué dans la formation de biofilms en influençant les niveaux de c-di-GMP, qui induit la formation de biofilms et donc l'absence de *phoB* diminue les biofilms (358).

Tableau VI. Compilation des phénotypes des mutants RR chez *S. Typhi*.

Mutant	RDAR	Mobilité	infection INT407			infection THP1		Biofilms
			Adh	Inv	Persist	Phago	Survie	
WT	Blanc	+	WT	WT	WT	WT	WT	WT
<i>ΔSPIs</i>	Blanc	+	0	↓	↓	ND	ND	ND
<i>phoP24</i>	Rouge	+	ND	ND	ND	0	↓	X
<i>ΔssrB</i>	Blanc	+	0	0	0	0	0	0
<i>ΔompR</i>	Rouge	+	0	↓	↓	0	↓	↑
<i>ΔphoB</i>	Blanc	+	0	0	0	↑	0	↓
<i>ΔarcA</i>	Blanc	+	↓	↓	↓	0	↓	0
<i>ΔkdpE</i>	Blanc	+	0	0	0	↑	↓	↓
<i>ΔcpxR</i>	Rouge	+	0	0	0	0	↓	0
<i>ΔphoP</i>	Blanc	+	↑	0	0	0	0	0
<i>ΔsirA</i>	Blanc	+	0	↓	↓	0	↑	0
<i>ΔbaeR</i>	Blanc	+	↑	↑	0	0	0	↓
<i>ΔdpiA</i>	Blanc	+	↑	↑	0	0	0	↓
<i>ΔcreB</i>	Blanc	+	↑	↑	0	0	0	↓
<i>ΔnarL</i>	Blanc	+	↓	↓	↓	0	0	↓
<i>ΔnarP</i>	Blanc	+	0	0	0	0	0	0
<i>ΔdcuR</i>	Blanc	+	↓	↓	0	↓	0	0
<i>ΔglnG</i>	Blanc	+	↓	0	0	0	0	0
<i>ΔpmrA</i>	Blanc	+	↓	0	0	↑	↑	0
<i>ΔyfhA</i>	Blanc	+	↓	↓	↓	0	0	0
<i>ΔrstA</i>	Blanc	+	↓	↓	0	0	0	0
<i>ΔqseB</i>	Blanc	+	0	0	0	0	0	0
<i>ΔtorR</i>	Blanc	+	↓	0	0	0	↑	↓
<i>ΔtctD</i>	Blanc	+	0	0	0	0	↑	↓
<i>ΔtrrR</i>	Blanc	+	0	0	0	↓	↑	0
<i>ΔhydG</i>	Blanc	+	0	0	0	↓	↑	0
<i>ΔrcsB</i>	Blanc	+	↓	↑	0	↑	↑	0
<i>ΔcopR</i>	Blanc	+	0	0	↓	0	0	0
<i>ΔuhpA</i>	Blanc	+	↓	0	0	↑	0	0
<i>ΔyehT</i>	Blanc	+	↓	↓	↓	↑	↑	0
<i>ΔcitB</i>	Blanc	+	0	0	0	0	↑	0

Comprend l'adhésion (Adh), l'invasion (Inv) et la persistance (Persist), phagocytose (Phago).
 Où (ND) correspond à des données non-déterminées, 0 correspond à l'absence d'effet, (↓)
 correspond à une diminution et (↑) correspond à une augmentation.

2.3. OmpR

Un mutant *ompR* présente une diminution importante de l'invasion et une diminution de la persistance dans les cellules épithéliales et également une diminution de la survie dans les macrophages. Ceci correspond à ce qui a déjà été rapporté pour ce RR, puisque OmpR participe à l'activation du SPI-1 (188, 190) et à l'activation du SPI-2 (115, 179, 180). Cependant, $\Delta ompR$ présente un morphotype RDAR rouge, phénotype associé avec le fait que OmpR est un activateur de biofilms chez *E. coli* (359). Cependant, la délétion de *ompR* provoque une augmentation importante de la production de biofilms (figure 10), Donc, chez *S. Typhi*, cela suggère plutôt que OmpR agit comme répresseur des biofilms. Plusieurs activateurs de biofilms ont été rapporté chez *S. Typhimurium* et *E. coli*, notamment OmpR, RstA, IHF et MlrA, qui tous active *csgD* le régulateur majeur des biofilms (186, 359). Cependant, peu d'éléments sont connus pour la production de biofilms chez *S. Typhi* et le rôle de *csgD* semble varier chez ce sérovar (360, 361). Ceci pourrait expliquer le résultat obtenu pour $\Delta ompR$, en plus du fait que *S. Typhimurium* et *S. Typhi* ne présente pas le même morphotype sur gélose congo rouge (351).

2.4. ArcA

Le mutant *arcA* présente un phénotype diminué pour toutes les étapes testées en infection de cellules épithéliales et présentent une diminution de la survie à l'intérieur des macrophages. Tous ces résultats peuvent être expliqués partiellement par le fait que le mutant *arcA* possède un défaut de croissance sur gélose, et donc affecte les UFC calculées sur ce milieu solide. Cependant, une partie des résultats peut aussi être expliquée par le fait que *arcA* participe à la réponse au stress oxydatif notamment lors de l'entrée dans les cellules phagocytaires chez *S. Typhimurium* (203). En l'absence de *arcA*, les bactéries sont plus sensibles à ce stress et survivent moins bien dans ces conditions. De plus, *arcA* est un régulateur important pour la croissance en conditions anaérobiques, soit une condition rencontrée au niveau de l'intestin, ce qui pourrait indiqué que *arcA* ait un rôle activateur au niveau des cellules épithéliales.

2.5. KdpE

Le S2C KdpDE semble être important lors de l'interaction avec les macrophages, puisque le mutant *kdpE* présente une capacité augmentée à être phagocyté, alors qu'il présente une diminution dans la survie à l'intérieur de ceux-ci. De plus, KdpE semble jouer un rôle au niveau des biofilms, puisque lorsque muté, les biofilms sont diminués. Les résultats obtenus reflètent ce qui est connu pour ce S2C, puisque l'homéostasie du potassium semble jouer un rôle dans la virulence (210). KdpDE participe à la réponse au stress oxydatif chez *S. Typhimurium* et serait aussi impliqué dans la formation de biofilms, puisqu'un mutant *kdpD* présente une diminution de production de biofilms (210). De plus, le S2C KdpDE participe à la survie chez d'autres pathogènes en favorisant l'entrée de potassium, c'est le cas chez les *E. coli* entérohémorragique (362).

2.6. CpxR

Le mutant *cpxR* présente un morphotype RDAR rouge et une diminution de la survie dans les macrophages humains. Le morphotype RDAR pourrait être due au fait que le stress membranaire des bactéries sur les géloses congo rouge permet l'entrée du colorant dans les bactéries, puisque ce mutant ne présente pas de différence avec la WT en biofilms. De plus, *cpxR* est impliqué dans la résistance aux PA relâchés par les macrophages (215) et donc participe à la survie dans ces cellules.

2.7. PhoP

Le mutant *phoP* présente une augmentation de l'adhésion aux cellules épithéliales, qui peut être expliqué par le fait que PhoP participe à la régulation négative du SPI-1 (224). L'absence de phénotype au niveau de l'invasion et de la persistance dans les cellules épithéliales pourrait être simplement due à un temps d'adaptation, puisque d'autres systèmes participent à la régulation du SPI-1. De plus, *ΔphoP* ne présente aucun phénotype différent de la WT lors de l'infection de macrophages, malgré l'importance de ce RR dans la survie chez *S. Typhimurium*. Cette différence pourrait être expliquée par une différence de régulation entre le sérovar *S. Typhimurium* et *S. Typhi* ou simplement être causée par un défaut du modèle

d'étude, puisque PhoP influence directement le S2C *ssrAB* (224) qui lui ne présente aucun phénotype lorsque délété.

2.8. SirA

La délétion de *sirA* présente une diminution de l'invasion et de la persistance intracellulaire au niveau des cellules épithéliales, ce qui concorde avec le rôle de SirA dans l'induction du SPI-1 (231-233). De plus, Δ *sirA* présente une augmentation de la survie à l'intérieur des macrophages. Ceci impliquerait que SirA réprime le SPI-2 dans les macrophages. Ce phénotype d'augmentation de survie pourrait être en lien avec la régulation de la capsule Vi, puisque les plus grands phénotypes d'augmentation de survie dans les macrophages sont observés chez les mutants *sirA* et *rcsB*, tous deux impliqués dans la régulation de la capsule (187, 236).

2.9. BaeR

Le mutant *baeR* présente une augmentation de l'adhérence et de l'invasion de cellules épithéliales, en plus de diminuer la production de biofilms. Puisque le S2C BaeSR est un régulateur qui participe à la réponse au stress membranaire en induisant de nombreuses pompes à efflux (240-243), cela pourrait expliquer le phénotype observé en biofilms. L'absence de la régulation des pompes à efflux par BaeR pourrait diminuer l'exportation de certaines composantes de la matrice extracellulaire nécessaires pour la formation des biofilms.

2.10. DpiA

Le S2C DpiBA n'est pas caractérisé chez *Salmonella*, mais nous avons observé que la délétion de *dpiA* présente une augmentation de l'adhérence et de l'invasion des cellules épithéliales et également une diminution de la production de biofilms. Chez *E. coli*, DpiBA est impliqué dans l'activation de la réponse SOS, et dans la production de biofilms (245). De plus, cette étude présenterait pour la première fois un rôle pour le S2C DpiBA chez *Salmonella* lors de l'infection de cellules épithéliales en participant à la répression de l'adhérence et de l'invasion de cellules non-phagocytaires.

2.11. CreB

Le S2C CreCB n'est pas vraiment caractérisé chez *Salmonella*. Notre étude révèle un rôle au niveau de l'infection, puisque lorsque ce gène est muté, une augmentation de l'adhésion et de l'invasion de cellules épithéliales est observée, ce qui indique que CreB serait impliqué dans la répression de l'adhérence et de l'invasion de ces cellules. Chez *E. coli*, CreB présente un rôle important au niveau du métabolisme général (249, 250). Il est possible que lorsque muté, ce système pourrait activer d'autres voies métaboliques et provoquer une augmentation indirecte de la virulence. Puisque CreB est important dans les voies métaboliques, ce RR pourrait être impliqué dans l'acquisition de nutriments et donc contribuer à la formation de biofilms, puisque le phénotype du mutant *creB* présente une diminution en biofilms.

2.12. NarL

Le mutant *narL* présente un phénotype diminué pour chacune des étapes testées dans l'infection de cellules épithéliales, en plus de diminuer la production de biofilms. Le système NarXL a été rapporté dans la réponse au nitrate, qui pourrait jouer un rôle au niveau des cellules épithéliales, car chez *S. Typhi*, NarL serait impliqué dans l'adhésion, l'invasion et la persistance dans ces cellules.

2.13. YfhA

Le mutant *yfhA* présente un phénotype diminué à chacune des étapes testées lors de l'infection de cellules épithéliales, ceci indiquant que YfhA participe à l'adhérence, l'invasion et à la persistance dans ces cellules. Par contre, les résultats obtenus concernant ce système peuvent présenter un phénotype partiel seulement, puisque les signaux détectés par ce système ne sont pas tous présents dans les modèles employés dans cette étude. Le S2C YfhKA chez *S. Typhimurium* répond aux neurotransmetteurs, comme le S2C QseCB, mais également au sulfate et au phosphate (261). L'absence de certains de ces signaux, soit les neurotransmetteurs pourrait impacter le phénotype obtenu à l'aide de ce modèle d'étude.

2.14. RstA

Le mutant *rstA* présente une diminution de l'adhésion et de l'invasion aux cellules épithéliales, ce qui indique que RstA participe à ces étapes d'infection. Il a été documenté que RstA participe dans le transport du fer (266) et active le transporteur de fer FeoB, cela augmente les niveaux internes de fer et améliore l'activité du régulateur global Fur (266). Fur participe à la virulence de *S. Typhi*, notamment dans l'invasion des cellules épithéliales (363). La participation de RstA à l'invasion serait indirecte et passerait par une diminution de l'activité de Fur.

2.15. DcuR

Le S2C DcuSR n'est pas caractérisé chez *Salmonella*. Cette étude présente donc pour la première fois un rôle chez *S. Typhi*, soit une implication dans la virulence au niveau de l'adhésion et de l'invasion de cellules épithéliales, ainsi que dans la capacité à être phagocyté par des macrophages humains.

2.16. GlnG

Le mutant *glnG* présente une diminution de l'adhésion aux cellules épithéliales. Puisque le S2C GlnLG participe à la régulation de la réponse à l'azote, qui est essentiel chez les bactéries (281, 282), l'absence de ce gène pourrait générer des changements métaboliques pour aller chercher ce nutriment dans les cellules de l'hôte. De ce fait, GlnG pourrait également induire des changements importants chez *Salmonella*, et pourrait impliquer l'adhésion aux cellules épithéliales.

2.17. PmrA

Chez *S. Typhimurium*, PmrA a été rapporté comme ayant une régulation négative sur le SPI-2 (297), ce qui est confirmée par mon étude, puisque l'absence de *pmrA* provoque l'augmentation de la phagocytose et de la survie à l'intérieur des macrophages. De plus, *ΔpmrA* présente une diminution de l'adhésion aux cellules épithéliales, ceci suggérant que PmrA pourrait avoir un rôle à cette étape, notamment par la modification des LPS en surface de la bactérie.

2.18. TorR

Le S2C TorSR n'est pas caractérisé chez *Salmonella* et le RR TorR est un pseudogène chez *S. Typhi* (310). L'inactivation de ce gène reste à être investiguée afin de confirmer que TorR ne soit pas produit. Cependant, lors de notre étude, le mutant *torR* présente des phénotypes, notamment une diminution de l'adhésion aux cellules épithéliales, une augmentation de la phagocytose et de la survie dans les macrophages, ainsi qu'une diminution de la production de biofilms. Chez *E. coli*, TorSR est un système hybride nécessitant la protéine périplasmique TorT pour son fonctionnement (311). Étant donné que la protéine TorT n'est pas pseudogène chez *S. Typhi*, cette protéine a peut-être évolué pour jouer le rôle de RR chez cette espèce, ceci pouvant expliquer la présence de plusieurs phénotypes malgré la présence du pseudogène. De cette façon, le système Tor serait important chez *S. Typhi* pour l'adhésion aux cellules non-phagocytaires et aurait pour rôle de résister à la phagocytose et de réprimer la survie à l'intérieur de cellules phagocytaires.

2.19. TctD

Le S2C TctED n'est pratiquement pas caractérisé chez *Salmonella* et chez *E. coli*. Chez *Salmonella*, TctED est activé par la répression catabolique (317), donc impliqué dans le métabolisme. Mon étude démontre possiblement un nouveau rôle pour ce S2C chez *S. Typhi*, soit d'être impliqué au niveau de la virulence, en participant à la formation de biofilms, puisque le mutant *tctD* présente un phénotype diminué dans la production de biofilms.

2.20. TtrR

Le S2C TtrSR chez *S. Typhimurium* présente un avantage dans la colonisation intestinale et permet de prendre avantage sur le microbiote intestinale en présence d'inflammation (10, 58) en permettant d'utiliser le tétrathionate, produit par les cellules hôtes, comme accepteur d'électron (59, 60). Alors que, *S. Typhi* ne cherche pas à coloniser l'intestin, mais cherche plutôt à se disséminer dans l'organisme. L'apparition d'un pseudogène chez le SK *ttrS* permettrait à *S. Typhi* de ne pas persister dans l'intestin et ainsi de mieux traverser la barrière intestinale et de ce fait, d'aller infecter les cellules phagocytaires, comme les macrophages. TtrR participerait à la résistance à la phagocytose et réprimerait la survie dans

les macrophages, puisque le mutant *ttrR* présente un phénotype diminué dans sa capacité à être phagocyté dans les macrophages, ainsi qu'une survie améliorée dans ces cellules.

2.21. HydG

Le mutant *hydG* présente une diminution dans la capacité à être phagocyté, ce qui peut être expliqué par le fait que HydG est impliqué dans la réponse au stress membranaire, et la réponse au zinc (325). La perturbation de la membrane occasionnée par la délétion du gène *hydG* pourrait modifier la présence de certaines protéines en surface de la bactérie et ainsi modifier la capacité des bactéries à être phagocytées. HydG serait impliqué dans le maintien de la membrane. Cependant, dans les macrophages, le mutant *hydG* présente une survie augmentée, ce qui laisse penser que HydG pourrait également jouer un rôle de répresseur dans les macrophages.

2.22. CopR

Ce S2C n'est pas du tout caractérisé chez *Salmonella* et n'est même pas caractérisé chez *E. coli*. La présente étude révèle donc pour la première fois un rôle possible pour ce S2C. CopR serait potentiellement impliqué au niveau de la persistance intracellulaire dans les cellules épithéliales, puisque lorsque délété, le phénotype est diminué. D'autres études restent à être réalisées concernant ce S2C, puisqu'un rôle métabolique dans l'acquisition de certains nutriments ne peut être exclu par cette étude.

2.23. RcsB

Le mutant *rcsB* présente un phénotype de diminution de l'adhérence et une augmentation de l'invasion des cellules épithéliales, ainsi qu'une augmentation à être phagocyté et à survivre dans les macrophages. Chez *S. Typhi*, le système Rcs est impliqué dans la régulation positive de la capsule Vi (122, 187). Le rôle de cette capsule vise à camoufler les composantes de surface de *S. Typhi*, afin de faire l'évasion du système immunitaire (68). La délétion de *rcsB*, empêche la formation d'hétérodimère avec le régulateur TviA (119), pour permettre l'expression de la capsule, ce qui augmenterait la phagocytose par les macrophages, puisque la bactérie n'est plus camouflée (131). RcsB serait impliqué dans la répression du SPI-2, puisque le mutant *rcsB* présente une augmentation

importante de la survie à l'intérieur des macrophages. De plus, RcsB est connu pour réprimer le SPI-1 (122, 187), ce qui est confirmé, puisque *ArcsB* présente une augmentation de l'invasion des cellules épithéliales.

2.24. YehT

Le mutant *yehT* présente un phénotype diminué à toutes les étapes de l'infection des cellules épithéliales et présente une augmentation de la phagocytose et de la survie dans les macrophages. Une étude chez *S. Typhi* a révélé que le S2C YehUT n'est pas impliqué dans la virulence de *S. Typhi* lors de l'infection de cellules (336), cependant l'étude a été réalisée avec une souche atténuée et emploi des cellules différentes de celles utilisées dans cette étude. L'emploi d'une souche atténuée implique qu'il y ait déjà une réduction de virulence et donc n'est pas très adaptée pour étudier cet aspect de la pathogenèse de *S. Typhi*. Cependant, notre étude, employant une souche sauvage de *S. Typhi*, présente pour le mutant *yehT* une diminution à toutes les étapes évaluées lors de l'infection de cellules épithéliales intestinales. Ceci implique que YehT possède un rôle activateur pour l'adhésion, l'invasion et la persistance dans ces cellules. YehT aurait également un rôle de répresseur lorsque retrouvé dans les macrophages, puisque le mutant *yehT* présente une augmentation de la phagocytose et de la survie dans les macrophages. D'autres études doivent être réalisées afin de connaître comment ce régulateur influence ces étapes d'infection.

2.25. UhpA

Le mutant *uhpA* présente un phénotype de diminution de l'adhésion aux cellules épithéliales et une capacité augmentée à être phagocyté par les macrophages. Cette capacité indique que UhpA participerait à la résistance à la phagocytose chez *S. Typhi*. Une étude réalisée chez *S. Typhi* indique qu'un choc osmotique induit la transcription de *uhpA* (343). Il est possible que le choc osmotique induit d'autres réponses chez ce régulateur et que parmi celles-ci, on retrouve la résistance à la phagocytose, puisque ce régulateur est assez peu caractérisé chez *Salmonella*.

2.26. CitB

Notre étude permet de révéler que CitB agirait possiblement comme répresseur dans les macrophages, puisque le mutant *citB* présente une meilleure survie. Le S2C CitAB est impliqué dans le catabolisme du citrate en conditions anaérobiques chez *E. coli*. Le rôle chez *Salmonella* de ce S2C a été très peu évalué. Une étude avec le sérovar *S. Dublin* indique que ce système serait bien impliqué dans ce processus, puisque le mutant *citB* serait négativement sélectionné dans l'infection du modèle murin par injection intra péritonéale (355). Par contre, le modèle employé dans notre étude ne permet pas d'évaluer ce rôle, puisque ce sont des cellules en culture qui ont été infectées.

3. Implication des S2C dans l'infection à *S. Typhi*

La virulence dans le cycle d'infection de *S. Typhi* doit être régulée de façon étroite afin de bien répondre aux conditions rencontrées, pour pouvoir cheminer et survivre dans l'organisme. Les S2C participent tout au long de l'infection à la régulation de plusieurs facteurs de virulence et contribuent à leur régulation au moment où ces facteurs sont nécessaires dans le cycle de l'infection.

La motilité présente une grande importance du niveau de l'infection à *S. Typhi*, celle-ci contribue à la pathogenèse, puisque la motilité aide les bactéries à traverser la barrière mucoale de l'intestin et leur permet d'atteindre l'épithélium intestinal (33, 34) et à mettre en contact les bactéries avec les cellules de l'hôte (33-35). Les S2C jouant un rôle important à ce niveau sont QseCE et ArcBA, où ces systèmes répondent aux neurotransmetteurs présents dans l'intestin et aux conditions anaérobiques qui y sont retrouvées, respectivement.

Après avoir franchi cette barrière et être brièvement entré en contact avec les cellules, le S2C BarA-SirA régule négativement la motilité pour permettre une meilleure adhérence aux cellules de l'hôte et éventuellement mener à l'invasion des cellules intestinales. En plus de ce S2C, d'autres participent à l'activation du SPI-1 (figure 11) et contribue à la pathogenèse de *S. Typhi*. Parmi ces systèmes on retrouve EnvZ-OmpR, qui répond à l'osmolarité présente dans l'intestin, YfhKA qui répond à des neurotransmetteurs et NarXL qui répond à la concentration

de nitrate. Des S2C ont également un rôle au niveau de l'interaction avec les cellules épithéliales intestinales qui n'ont jusqu'à maintenant pas été répertoriés, soit le S2C DcuSR et le S2C YehUT.

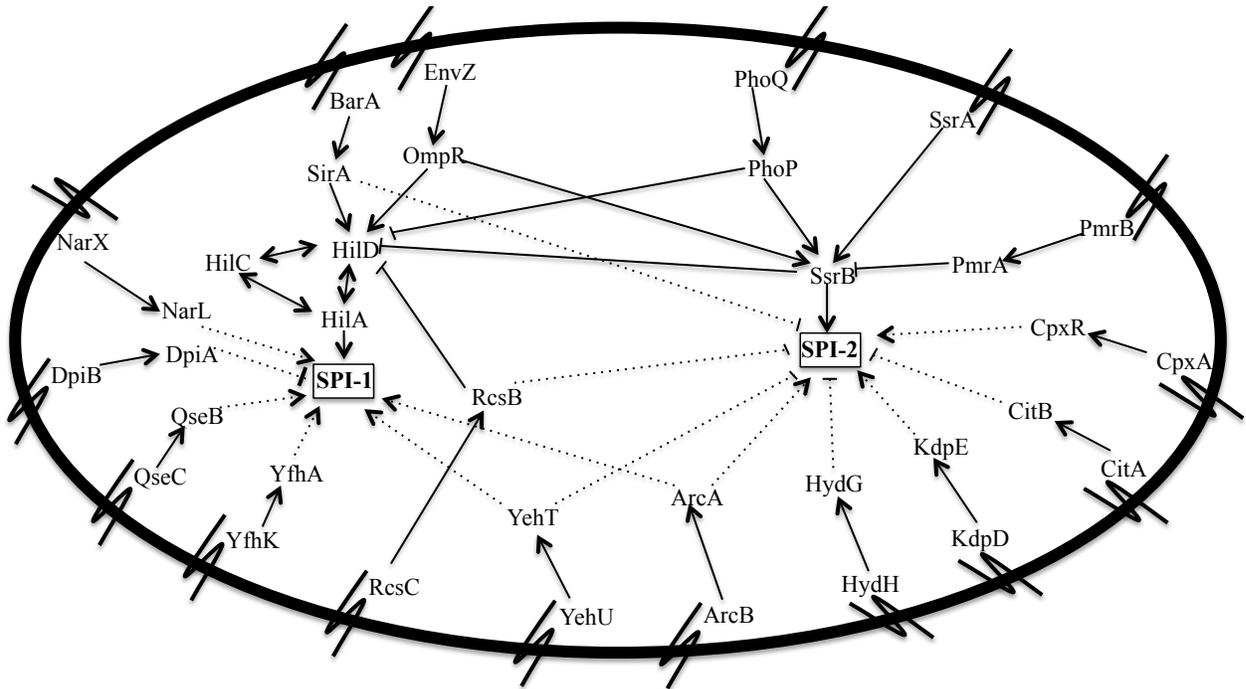


Figure 11. Représentation schématique de l'activité régulatrice des S2C sur le SPI-1 et le SPI-2 chez *S. Typhi*. Les lignes pleines illustrent la régulation connue dans la littérature, alors que les lignes pointillées représentent la régulation potentielle. La terminaison barrée présente un effet de répression, alors que la terminaison en flèche représente une activation.

D'autres S2C ont plutôt été identifiés comme étant des répresseurs du SPI-1, soit PhoQP et SsrAB qui participent tous deux à l'activation du SPI-2 (figure 11). Donc après avoir traversé l'épithélium de l'intestin, l'activation de ces systèmes est mise de l'avant afin de pouvoir survivre à l'intérieur des macrophages. Le S2C DpiBA serait potentiellement impliqué dans la répression du SPI-1, cependant ce dernier ne semble pas avoir d'impact sur la régulation du SPI-2. Plusieurs systèmes sont impliqués dans la régulation du SPI-2, autant

dans son activation que dans sa répression. Parmi les S2C participant à l'activation du SPI-2 on retrouve les systèmes connus comme PhoQP, SsrAB et EnvZ-OmpR. Cette étude a permis d'identifier des S2C ayant possiblement un rôle à ce niveau, soit CpxAR, KpdDE et ArcBA. D'autres systèmes ont également été identifiés pour avoir une activité répressive sur la survie dans les macrophages, c'est le cas du système Rcs, de BarA-SirA, de YehUT, de HydHG, de CitAB et du système PmrBA qui a déjà été documenté pour avoir un effet répressif.

Le modèle d'étude employé pour l'évaluation de la persistance, soit la production de biofilms, n'est pas le plus adéquat pour évaluer ce paramètre, mais contribue tout de même à identifier des rôles potentiels, qui devront être investigués davantage. Cette étude a identifiée plusieurs S2C participant à la production de biofilms, notamment PhoRB, KdpDE, BaeSR, CreCB et TctED. Un seul système a été identifié comme étant un répresseur de la formation de biofilms, le S2C EnvZ-OmpR. Cependant, ce résultat est contradictoire avec ce qui a été observé chez *E. coli*, puisque chez cette espèce, OmpR est un activateur. De plus, le morphotype RDAR sur gélose congo rouge indique également que OmpR serait un répresseur de biofilms, puisqu'en l'absence de *ompR*, *S. Typhi* présente un phénotype rouge sur ce milieu.

Plusieurs S2C sont impliqués dans la régulation de voies métaboliques. Cependant, métabolisme et pathogénèse ne sont pas des antagonistes, ce sont des voies pouvant travailler ensemble et procurer des avantages aux bactéries (364). Certains gènes métaboliques peuvent avoir été acquis et permettre d'avoir un avantage sélectif dans les tissus de l'hôte. L'acquisition de ces gènes métaboliques permet aux bactéries de pouvoir coloniser de nouvelles niches, ce fut le cas du S2C TtrSR chez *S. Typhimurium* (364). Ce système a été acquis chez cette salmonelle et lui a procuré un avantage sélectif dans l'intestin par rapport au microbiote (364). Cependant, d'autres avantages sélectifs au niveau de l'hôte peuvent être acquis, dans certaines circonstances, par la perte de fonction qui serait occasionnée par des mutations, ceci altérant les fonctions métaboliques (364). La formation de pseudogène chez *S. Typhi* pour le S2C TtrSR illustrerait parfaitement ce principe. Ce qui était auparavant utile chez *S. Typhimurium* ne l'est plus chez *S. Typhi*. Cette bactérie a donc évolué en se départissant de ce système, qui lui permet de ne plus demeurer dans l'intestin, mais de se

répandre de façon systémique. Donc le métabolisme contribue parfois à la virulence, tout simplement en permettant de prendre l'avantage dans certaines conditions. Certains des S2C de *S. Typhi* pourrait contribuer à la virulence dans ce sens, comme les S2C PhoB avec le transport du phosphate, KdpDE avec l'homéostasie du potassium, NarL avec la réponse au nitrate, KdpDE avec l'entrée de potassium, DcuSR CreCB. TorSR, TctED, HydHG, CopSR, UhpBA et CitBA.

Cette étude présente pour la première fois la caractérisation de tous les S2C retrouvés chez *S. Typhi* et identifie un rôle potentiel pour chacun dans la pathogenèse de ce pathogène.

Conclusion

Les objectifs de ce projet de maîtrise ont été réalisés et permettent d'établir une caractérisation générale des S2C de *S. Typhi*. Cette étude laisse place à de nombreux autres questionnements au sujet de la place qu'occupe les S2C dans l'infection de ce pathogène humain. Cette recherche vient démontrer l'importance des S2C dans l'adaptation de *S. Typhi* aux diverses étapes de l'infection, notamment lorsque le pathogène rencontre les cellules épithéliales de l'intestin, pour ensuite s'adapter à la vie intra-macrophage. Il est capital de s'intéresser à ces systèmes de régulation, puisque cette recherche a mis en lumière le rôle important de ceux-ci dans la virulence.

Ces travaux démontrent qu'aucun S2C n'est exclusivement responsable de la régulation de la motilité, ceci indiquant qu'il y a de la régulation croisée entre ces systèmes et avec d'autres régulateurs. De plus, un grand nombre de S2C influence la régulation de deux facteurs de virulence capitaux pour l'infection à *S. Typhi*, soit le SPI-1 et le SPI-2, en démontrant que la régulation de ces SPIs n'est pas mutuellement exclusive parmi les S2C. Quelques-uns des S2C ont une activité positive ou négative sur chacun des SPIs, alors que d'autres participent à l'activation d'un SPI et réprime l'autre. De cette façon, les S2C participent de façon non-négligeable à la régulation complexe des facteurs de virulence de *S. Typhi*. De plus, cette étude donne un aperçu sur le mode de vie multicellulaire nécessaire pour la formation de biofilms, étant en soit un processus complexe et une caractéristique importante des porteurs asymptomatiques de *S. Typhi*. Comme perspective à court terme, la complémentation de chacun de ces mutants devra être effectuée, afin de confirmer les phénotypes observés.

Puisque les S2C participent à l'adaptation des bactéries à leur environnement et contribuent à la virulence, ceux-ci pourraient être visés comme cibles thérapeutiques (165). Une drogue pourrait être synthétisée et permettre de cibler les domaines structurellement conservés des composantes du S2C. De cette façon, plusieurs S2C pourraient être inhibés de façon simultanée (165). De plus, la combinaison de cette inhibition des S2C avec une thérapie

antibiotique pourrait possiblement favoriser l'élimination des bactéries résistantes, puisque plusieurs S2C participent cette résistance.

La modulation de la régulation des S2C pourrait être également la cible pour l'élaboration de nouvelles souches vaccinales. Par exemple, un mutant *phoQP* a déjà été testé en clinique comme souche vaccinale contre *S. Typhi* et a été démontrée sécuritaire, bien tolérée, immunogénique après une seule dose orale et génère une réponse humorale (365). Donc en sélectionnant une combinaison de S2C à déléter, par exemple *yfhKA* pour le SPI-1 et *phoQP* et *ssrAB* pour le SPI-2, cela pourrait générer une souche vaccinale qui n'aura pas été soumise aux pressions sélectives de l'atténuation en laboratoire et présenter un phénotype membranaire similaire à la souche sauvage, afin de générer une meilleure réponse immunologique.

En bref, cette étude a permis de contribuer aux connaissances et à la compréhension des patrons de régulation des S2C chez *S. Typhi* et laisse la porte grande ouverte sur de nombreuses autres opportunités de recherche.

Bibliographie

1. Salmon DS, T. Report on swine plague. US Bureau of Animal Industries. 1885;2nd Ann. Rep. U.S. Gov't. Printing Office, Washington:184.
2. Slauch CDEaJM. The Genus *Salmonella*. In: Martin Dworkin SF, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer and Erko Stackebrandt, editor. Prokaryotes. 6. 3 ed: Springer; 2006. p. 123-58.
3. Sleigh JD, JP. *Salmonella*. Practical medical microbiology. 1989;13th eds. Churchill Livingstone, Edinburgh:456.
4. Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. Biomed Res Int. 2017;2017:3782182.
5. Agbaje M, Begum RH, Oyekunle MA, Ojo OE, Adenubi OT. Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. Folia Microbiol (Praha). 2011;56(6):497-503.
6. Su LH, Chiu CH. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Med J. 2007;30(3):210-9.
7. Porwollik S, McClelland M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. Microbes Infect. 2003;5(11):977-89.
8. Kauffmann F. The bacteriology of *Enterobacteriaceae*. Munksgaard, Copenhagen, Denmark. 1966.
9. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. J Clin Microbiol. 2000;38(7):2465-7.
10. Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Heyderman RS, Gordon MA. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. Lancet. 2012;379(9835):2489-99.
11. Gal-Mor O, Boyle EC, Grassl GA. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. Front Microbiol. 2014;5:391.
12. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, et al. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. Epidemiol Infect. 2000;125(2):229-55.

13. Baumler A, Fang FC. Host specificity of bacterial pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(12):a010041.
14. Spano S. Mechanisms of *Salmonella* Typhi Host Restriction. *Adv Exp Med Biol.* 2016;915:283-94.
15. Dougan G, Baker S. *Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:317-36.
16. Keestra-Gounder AM, Tsolis RM, Baumler AJ. Now you see me, now you don't: the interaction of *Salmonella* with innate immune receptors. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(4):206-16.
17. de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ. Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog.* 2012;8(10):e1002933.
18. Crump JA, Sjolund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(4):901-37.
19. Haselbeck AH, Panzner U, Im J, Baker S, Meyer CG, Marks F. Current perspectives on invasive nontyphoidal *Salmonella* disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30(5):498-503.
20. Vogelsang TM, Boe J. Temporary and chronic carriers of *Salmonella typhi* and *Salmonella paratyphi B*. *J Hyg (Lond).* 1948;46(3):252-61.
21. Ruby T, McLaughlin L, Gopinath S, Monack D. *Salmonella's* long-term relationship with its host. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(3):600-15.
22. Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis.* 2001;32(2):263-9.
23. Braden CR. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clin Infect Dis.* 2006;43(4):512-7.
24. Meltzer E, Schwartz E. Enteric fever: a travel medicine oriented view. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(5):432-7.
25. Raffatellu M, Wilson RP, Winter SE, Baumler AJ. Clinical pathogenesis of typhoid fever. *J Infect Dev Ctries.* 2008;2(4):260-6.
26. Hurley D, McCusker MP, Fanning S, Martins M. *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front Immunol.* 2014;5:481.

27. Galen JE, Buskirk AD, Tennant SM, Pasetti MF. Live Attenuated Human *Salmonella* Vaccine Candidates: Tracking the Pathogen in Natural Infection and Stimulation of Host Immunity. *EcoSal Plus*. 2016;7(1).
28. Audia JP, Webb CC, Foster JW. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int J Med Microbiol*. 2001;291(2):97-106.
29. Tiwari RP, Sachdeva N, Hoondal GS, Grewal JS. Adaptive acid tolerance response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Basic Microbiol*. 2004;44(2):137-46.
30. Verdu E, Viani F, Armstrong D, Fraser R, Siegrist HH, Pignatelli B, et al. Effect of omeprazole on intragastric bacterial counts, nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds. *Gut*. 1994;35(4):455-60.
31. Khosla SN, Jain N, Khosla A. Gastric acid secretion in typhoid fever. *Postgrad Med J*. 1993;69(808):121-3.
32. Bhalla S, Vij JC, Anand BS, Varghese A, Chuttani HK. Gastric acid secretion in patients with typhoid fever. *Gut*. 1985;26(5):491-4.
33. Galan JE, Curtiss R, 3rd. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(16):6383-7.
34. Khoramian-Falsafi T, Harayama S, Kutsukake K, Pechere JC. Effect of motility and chemotaxis on the invasion of *Salmonella typhimurium* into HeLa cells. *Microb Pathog*. 1990;9(1):47-53.
35. Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol*. 2004;12(11):509-17.
36. Elsinghorst EA, Baron LS, Kopecko DJ. Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(13):5173-7.
37. Jones BD, Ghori N, Falkow S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med*. 1994;180(1):15-23.

38. Jensen VB, Harty JT, Jones BD. Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. *Infect Immun*. 1998;66(8):3758-66.
39. Jepson MA, Clark MA. The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes Infect*. 2001;3(14-15):1183-90.
40. Halle S, Bumann D, Herbrand H, Willer Y, Dahne S, Forster R, et al. Solitary intestinal lymphoid tissue provides a productive port of entry for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun*. 2007;75(4):1577-85.
41. Hallback DA, Hulten L, Jodal M, Lindhagen J, Lundgren O. Evidence for the existence of a countercurrent exchanger in the small intestine in man. *Gastroenterology*. 1978;74(4):683-90.
42. Hallback DA, Jodal M, Mannischeff M, Lundgren O. Tissue osmolality in intestinal villi of four mammals in vivo and in vitro. *Acta Physiol Scand*. 1991;143(3):271-7.
43. Zhou D, Galan J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect*. 2001;3(14-15):1293-8.
44. Coombes BK, Coburn BA, Potter AA, Gomis S, Mirakhur K, Li Y, et al. Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect Immun*. 2005;73(11):7161-9.
45. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001;2(4):361-7.
46. Garcia-del Portillo F, Nunez-Hernandez C, Eisman B, Ramos-Vivas J. Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(1):46-52.
47. Holden DW. Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic*. 2002;3(3):161-9.
48. Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7800-4.
49. Liss V, Hensel M. Take the tube: remodelling of the endosomal system by intracellular *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol*. 2015;17(5):639-47.

50. Garcia-del Portillo F, Zwick MB, Leung KY, Finlay BB. *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(22):10544-8.
51. Santos RL, Raffatellu M, Bevins CL, Adams LG, Tukel C, Tsolis RM, et al. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol*. 2009;17(11):498-506.
52. Khan SA, Everest P, Servos S, Foxwell N, Zahringer U, Brade H, et al. A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Mol Microbiol*. 1998;29(2):571-9.
53. Cummings LA, Wilkerson WD, Bergsbaken T, Cookson BT. In vivo, *fliC* expression by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted. *Mol Microbiol*. 2006;61(3):795-809.
54. Winter SE, Winter MG, Atluri V, Poon V, Romao EL, Tsolis RM, et al. The flagellar regulator TviA reduces pyroptosis by *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun*. 2015;83(4):1546-55.
55. Abreu MT, Thomas LS, Arnold ET, Lukasek K, Michelsen KS, Arditi M. TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *J Endotoxin Res*. 2003;9(5):322-30.
56. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*. 2001;167(4):1882-5.
57. Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tukel C, Akcelik M, Baumler AJ. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun*. 2006;74(1):19-27.
58. Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5(10):2177-89.
59. Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, Crawford RW, et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*. 2010;467(7314):426-9.
60. Rivera-Chavez F, Baumler AJ. The Pyromaniac Inside You: *Salmonella* Metabolism in the Host Gut. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:31-48.
61. Glynn JR, Palmer SR. Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence from a *Salmonella* outbreak. *Am J Epidemiol*. 1992;136(11):1369-77.

62. Gordon MA, Banda HT, Gondwe M, Gordon SB, Boeree MJ, Walsh AL, et al. Non-typhoidal *salmonella* bacteraemia among HIV-infected Malawian adults: high mortality and frequent recrudescence. *AIDS*. 2002;16(12):1633-41.
63. Tsois RM, Young GM, Solnick JV, Baumler AJ. From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(12):883-92.
64. Wangdi T, Winter SE, Baumler AJ. Typhoid fever: "you can't hit what you can't see". *Gut Microbes*. 2012;3(2):88-92.
65. Seth-Smith HM. SPI-7: *Salmonella's* Vi-encoding Pathogenicity Island. *J Infect Dev Ctries*. 2008;2(4):267-71.
66. Winter SE, Winter MG, Thiennimitr P, Gerriets VA, Nuccio SP, Rusmann H, et al. The TviA auxiliary protein renders the *Salmonella enterica* serotype Typhi RcsB regulon responsive to changes in osmolarity. *Mol Microbiol*. 2009;74(1):175-93.
67. Tran QT, Gomez G, Khare S, Lawhon SD, Raffatellu M, Baumler AJ, et al. The *Salmonella enterica* serotype Typhi Vi capsular antigen is expressed after the bacterium enters the ileal mucosa. *Infect Immun*. 2010;78(1):527-35.
68. Wilson RP, Raffatellu M, Chessa D, Winter SE, Tukel C, Baumler AJ. The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cell Microbiol*. 2008;10(4):876-90.
69. Haneda T, Winter SE, Butler BP, Wilson RP, Tukel C, Winter MG, et al. The capsule-encoding *viaB* locus reduces intestinal inflammation by a *Salmonella* pathogenicity island 1-independent mechanism. *Infect Immun*. 2009;77(7):2932-42.
70. Raffatellu M, Santos RL, Chessa D, Wilson RP, Winter SE, Rossetti CA, et al. The capsule encoding the *viaB* locus reduces interleukin-17 expression and mucosal innate responses in the bovine intestinal mucosa during infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infect Immun*. 2007;75(9):4342-50.
71. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, et al. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*. 1999;401(6755):804-8.
72. Sinnott CR, Teall AJ. Persistent gallbladder carriage of *Salmonella typhi*. *Lancet*. 1987;1(8539):976.

73. Schwan WR, Huang XZ, Hu L, Kopecko DJ. Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun*. 2000;68(3):1005-13.
74. Olsen SJ, Bleasdale SC, Magnano AR, Landrigan C, Holland BH, Tauxe RV, et al. Outbreaks of typhoid fever in the United States, 1960-99. *Epidemiol Infect*. 2003;130(1):13-21.
75. Levine MM, Black RE, Lanata C. Precise estimation of the numbers of chronic carriers of *Salmonella typhi* in Santiago, Chile, an endemic area. *J Infect Dis*. 1982;146(6):724-6.
76. Crawford RW, Gibson DL, Kay WW, Gunn JS. Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for *Salmonella* biofilm formation on gallstone surfaces. *Infect Immun*. 2008;76(11):5341-9.
77. Welton JC, Marr JS, Friedman SM. Association between hepatobiliary cancer and typhoid carrier state. *Lancet*. 1979;1(8120):791-4.
78. Shukla VK, Singh H, Pandey M, Upadhyay SK, Nath G. Carcinoma of the gallbladder - is it a sequel of typhoid? *Dig Dis Sci*. 2000;45(5):900-3.
79. Bao X, Qiu J, Yang N, Mei L, Chen X. [Study and preparation of Vi-PHA reagent and its application for detection of *Salmonella typhi* carriers]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 1992;32(4):289-95.
80. House D, Bishop A, Parry C, Dougan G, Wain J. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2001;14(5):573-8.
81. Burmolle M, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Christensen L, Homoe P, et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;59(3):324-36.
82. Mills DM, Bajaj V, Lee CA. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol*. 1995;15(4):749-59.
83. Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J Bacteriol*. 2003;185(12):3624-35.
84. Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc JM, Daigle F. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;305(1):1-13.

85. Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, Wain J, et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*. 2001;413(6858):848-52.
86. Vernikos GS, Parkhill J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics*. 2006;22(18):2196-203.
87. Kaur J, Jain SK. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiol Res*. 2012;167(4):199-210.
88. Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(6):2593-7.
89. Hensel M, Shea JE, Waterman SR, Mundy R, Nikolaus T, Banks G, et al. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol*. 1998;30(1):163-74.
90. Waterman SR, Holden DW. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol*. 2003;5(8):501-11.
91. Jacobsen A, Hendriksen RS, Aarestrup FM, Ussery DW, Friis C. The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microb Ecol*. 2011;62(3):487-504.
92. Hashimoto Y, Li N, Yokoyama H, Ezaki T. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of ViaB region encoding Vi antigen in *Salmonella typhi*. *J Bacteriol*. 1993;175(14):4456-65.
93. Baker EE, Whiteside RE, Basch R, Derow MA. The VI antigens of the Enterobacteriaceae. I. Purification and chemical properties. *J Immunol*. 1959;83:680-96.
94. Whiteside RE, Baker EE. The Vi antigens of the Enterobacteriaceae. V. Serologic differences of Vi antigens revealed by deacetylation. *J Immunol*. 1961;86:538-42.
95. Zhang XL, Tsui IS, Yip CM, Fung AW, Wong DK, Dai X, et al. *Salmonella enterica* serovar typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun*. 2000;68(6):3067-73.

96. Forest CGaD, F. Molecular Armory of *S. Typhi*: Deciphering the Putative Arsenal of Our Enemy. In: Annous DB, editor. *Salmonella - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*: InTech; 2012. p. 405-28.
97. Spano S, Ugalde JE, Galan JE. Delivery of a *Salmonella* Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe*. 2008;3(1):30-8.
98. Marlovits TC, Kubori T, Sukhan A, Thomas DR, Galan JE, Unger VM. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*. 2004;306(5698):1040-2.
99. Galan JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*. 2006;444(7119):567-73.
100. Marlovits TC, Stebbins CE. Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(1):47-52.
101. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, et al. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*. 1998;280(5363):602-5.
102. Kimbrough TG, Miller SI. Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(20):11008-13.
103. Lostroh CP, Lee CA. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect*. 2001;3(14-15):1281-91.
104. McGhie EJ, Hayward RD, Koronakis V. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J*. 2001;20(9):2131-9.
105. Myeni SK, Zhou D. The C terminus of SipC binds and bundles F-actin to promote *Salmonella* invasion. *J Biol Chem*. 2010;285(18):13357-63.
106. Knodler LA, Steele-Mortimer O. Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic*. 2003;4(9):587-99.
107. Bajaj V, Lucas RL, Hwang C, Lee CA. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol*. 1996;22(4):703-14.
108. Galan JE, Curtiss R, 3rd. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect Immun*. 1990;58(6):1879-85.

109. Jones BD, Falkow S. Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect Immun.* 1994;62(9):3745-52.
110. Brumell JH, Rosenberger CM, Gotto GT, Marcus SL, Finlay BB. SifA permits survival and replication of *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Cell Microbiol.* 2001;3(2):75-84.
111. Yu XJ, Liu M, Holden DW. SsaM and SpiC interact and regulate secretion of *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system effectors and translocators. *Mol Microbiol.* 2004;54(3):604-19.
112. Forest CG, Ferraro E, Sabbagh SC, Daigle F. Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2. *Microbiology.* 2010;156(Pt 12):3689-98.
113. Cirillo DM, Valdivia RH, Monack DM, Falkow S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol.* 1998;30(1):175-88.
114. Abrahams GL, Hensel M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cell Microbiol.* 2006;8(5):728-37.
115. Lee AK, Detweiler CS, Falkow S. OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol.* 2000;182(3):771-81.
116. Pickard D, Wain J, Baker S, Line A, Chohan S, Fookes M, et al. Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol.* 2003;185(17):5055-65.
117. Kolyva S, Waxin H, Popoff MY. The Vi antigen of *Salmonella typhi*: molecular analysis of the *viaB* locus. *J Gen Microbiol.* 1992;138(2):297-304.
118. Virlogeux I, Waxin H, Ecobichon C, Popoff MY. Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology.* 1995;141 (Pt 12):3039-47.
119. Virlogeux I, Waxin H, Ecobichon C, Lee JO, Popoff MY. Characterization of the *rcsA* and *rcsB* genes from *Salmonella typhi*: *rcsB* through *tviA* is involved in regulation of Vi antigen synthesis. *J Bacteriol.* 1996;178(6):1691-8.

120. Hashimoto Y, Khan AQ, Ezaki T. Positive autoregulation of *vipR* expression in ViaB region-encoded Vi antigen of *Salmonella typhi*. J Bacteriol. 1996;178(5):1430-6.
121. Pickard D, Li J, Roberts M, Maskell D, Hone D, Levine M, et al. Characterization of defined *ompR* mutants of *Salmonella typhi*: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. Infect Immun. 1994;62(9):3984-93.
122. Arricau N, Hermant D, Waxin H, Ecobichon C, Duffey PS, Popoff MY. The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. Mol Microbiol. 1998;29(3):835-50.
123. Winter SE, Raffatellu M, Wilson RP, Russmann H, Baumler AJ. The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. Cell Microbiol. 2008;10(1):247-61.
124. Kutsukake K, Ohya Y, Iino T. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol. 1990;172(2):741-7.
125. Zhao L, Ezak T, Li ZY, Kawamura Y, Hirose K, Watanabe H. Vi-Suppressed wild strain *Salmonella typhi* cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches. Microbiol Immunol. 2001;45(2):149-58.
126. Kage H, Takaya A, Ohya M, Yamamoto T. Coordinated regulation of expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease. J Bacteriol. 2008;190(7):2470-8.
127. Lin D, Rao CV, Slauch JM. The *Salmonella* SPI1 type three secretion system responds to periplasmic disulfide bond status via the flagellar apparatus and the RcsCDB system. J Bacteriol. 2008;190(1):87-97.
128. Bajaj V, Hwang C, Lee CA. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. Mol Microbiol. 1995;18(4):715-27.
129. Sharma A, Qadri A. Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(50):17492-7.
130. Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Dusold R, Rubino S, Baumler AJ. The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. Infect Immun. 2005;73(6):3367-74.

131. Kossack RE, Guerrant RL, Densen P, Schadelin J, Mandell GL. Diminished neutrophil oxidative metabolism after phagocytosis of virulent *Salmonella typhi*. *Infect Immun*. 1981;31(2):674-8.
132. Hirose K, Ezaki T, Miyake M, Li T, Khan AQ, Kawamura Y, et al. Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted *Salmonella typhi* strains in cultured macrophage expressing different levels of CD14 antigen. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;147(2):259-65.
133. Dufresne K, Saulnier-Bellemare J, Daigle F. Functional Analysis of the Chaperone-Usher Fimbrial Gene Clusters of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:26.
134. Townsend SM, Kramer NE, Edwards R, Baker S, Hamlin N, Simmonds M, et al. *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun*. 2001;69(5):2894-901.
135. Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Romling U, Belova LM, et al. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol*. 2007;7:70.
136. Song J, Gao X, Galan JE. Structure and function of the *Salmonella* Typhi chimaeric A(2)B(5) typhoid toxin. *Nature*. 2013;499(7458):350-4.
137. Lara-Tejero M, Galan JE. Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol*. 2002;10(3):147-52.
138. Guerra L, Cortes-Bratti X, Guidi R, Frisan T. The biology of the cytolethal distending toxins. *Toxins (Basel)*. 2011;3(3):172-90.
139. Locht C, Coutte L, Mielcarek N. The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J*. 2011;278(23):4668-82.
140. Galan JE. Typhoid toxin provides a window into typhoid fever and the biology of *Salmonella* Typhi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(23):6338-44.
141. Fowler CC, Chang SJ, Gao X, Geiger T, Stack G, Galan JE. Emerging insights into the biology of typhoid toxin. *Curr Opin Microbiol*. 2017;35:70-7.
142. Chang SJ, Song J, Galan JE. Receptor-Mediated Sorting of Typhoid Toxin during Its Export from *Salmonella* Typhi-Infected Cells. *Cell Host Microbe*. 2016;20(5):682-9.
143. Fowler CC, Galan JE. Decoding a *Salmonella* Typhi Regulatory Network that Controls Typhoid Toxin Expression within Human Cells. *Cell Host Microbe*. 2018;23(1):65-76 e6.

144. Varki NM, Strobert E, Dick EJ, Jr., Benirschke K, Varki A. Biomedical differences between human and nonhuman hominids: potential roles for uniquely human aspects of sialic acid biology. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:365-93.
145. Hedlund M, Tangvoranuntakul P, Takematsu H, Long JM, Housley GD, Kozutsumi Y, et al. N-glycolylneuraminic acid deficiency in mice: implications for human biology and evolution. *Mol Cell Biol.* 2007;27(12):4340-6.
146. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005;13(1):34-40.
147. Desai SK, Winardhi RS, Periasamy S, Dykas MM, Jie Y, Kenney LJ. The horizontally-acquired response regulator SsrB drives a *Salmonella* lifestyle switch by relieving biofilm silencing. *Elife.* 2016;5.
148. Van Acker H, Coenye T. The Role of Efflux and Physiological Adaptation in Biofilm Tolerance and Resistance. *J Biol Chem.* 2016;291(24):12565-72.
149. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. *J Biol Chem.* 2016;291(24):12538-46.
150. Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen PO, Phipps RK, Moser C, Christophersen L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology.* 2009;155(Pt 11):3500-8.
151. Monds RD, O'Toole GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* 2009;17(2):73-87.
152. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.
153. Crawford RW, Rosales-Reyes R, Ramirez-Aguilar Mde L, Chapa-Azuela O, Alpuche-Aranda C, Gunn JS. Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(9):4353-8.
154. Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect Immun.* 2002;70(5):2640-9.
155. Gunn JS. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes Infect.* 2000;2(8):907-13.

156. Crawford RW, Reeve KE, Gunn JS. Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. *J Bacteriol.* 2010;192(12):2981-90.
157. Johnson L, Horsman SR, Charron-Mazenod L, Turnbull AL, Mulcahy H, Surette MG, et al. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol.* 2013;13:115.
158. Ledebouer NA, Jones BD. Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar typhimurium on HEP-2 cells and chicken intestinal epithelium. *J Bacteriol.* 2005;187(9):3214-26.
159. Gibson DL, White AP, Snyder SD, Martin S, Heiss C, Azadi P, et al. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *J Bacteriol.* 2006;188(22):7722-30.
160. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Romling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol.* 2001;39(6):1452-63.
161. Alvarez AF, Georgellis D. In vitro and in vivo analysis of the ArcB/A redox signaling pathway. *Methods Enzymol.* 2010;471:205-28.
162. Beier D, Gross R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(2):143-52.
163. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:183-215.
164. Laub MT, Goulian M. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet.* 2007;41:121-45.
165. Tiwari S, Jamal SB, Hassan SS, Carvalho P, Almeida S, Barh D, et al. Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview. *Front Microbiol.* 2017;8:1878.
166. Quon KC, Marczynski GT, Shapiro L. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell.* 1996;84(1):83-93.
167. Groisman EA. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annu Rev Microbiol.* 2016;70:103-24.

168. Parkinson JS, Kofoid EC. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* 1992;26:71-112.
169. Raghavan V, Groisman EA. Orphan and hybrid two-component system proteins in health and disease. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13(2):226-31.
170. West AH, Stock AM. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(6):369-76.
171. Gao R, Stock AM. Temporal hierarchy of gene expression mediated by transcription factor binding affinity and activation dynamics. *MBio.* 2015;6(3):e00686-15.
172. Desai SK, Kenney LJ. To approximately P or Not to approximately P? Non-canonical activation by two-component response regulators. *Mol Microbiol.* 2017;103(2):203-13.
173. Hengge R. The two-component network and the general stress sigma factor RpoS (sigma S) in *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol.* 2008;631:40-53.
174. Shu CJ, Zhulin IB. ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(1):3-5.
175. Ohta N, Newton A. The core dimerization domains of histidine kinases contain recognition specificity for the cognate response regulator. *J Bacteriol.* 2003;185(15):4424-31.
176. Mascher T, Helmann JD, Uuden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(4):910-38.
177. Mitrophanov AY, Groisman EA. Positive feedback in cellular control systems. *Bioessays.* 2008;30(6):542-55.
178. Yeo WS, Zwir I, Huang HV, Shin D, Kato A, Groisman EA. Intrinsic negative feedback governs activation surge in two-component regulatory systems. *Mol Cell.* 2012;45(3):409-21.
179. Garmendia J, Beuzon CR, Ruiz-Albert J, Holden DW. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology.* 2003;149(Pt 9):2385-96.
180. Feng X, Oropeza R, Kenney LJ. Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol.* 2003;48(4):1131-43.
181. Brown NF, Rogers LD, Sanderson KL, Gouw JW, Hartland EL, Foster LJ. A horizontally acquired transcription factor coordinates *Salmonella* adaptations to host microenvironments. *MBio.* 2014;5(5):e01727-14.

182. Perez-Morales D, Banda MM, Chau NYE, Salgado H, Martinez-Flores I, Ibarra JA, et al. The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. PLoS Pathog. 2017;13(7):e1006497.
183. Feng X, Walthers D, Oropeza R, Kenney LJ. The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. Mol Microbiol. 2004;54(3):823-35.
184. Walthers D, Carroll RK, Navarre WW, Libby SJ, Fang FC, Kenney LJ. The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. Mol Microbiol. 2007;65(2):477-93.
185. Walthers D, Li Y, Liu Y, Anand G, Yan J, Kenney LJ. *Salmonella enterica* response regulator SsrB relieves H-NS silencing by displacing H-NS bound in polymerization mode and directly activates transcription. J Biol Chem. 2011;286(3):1895-902.
186. Gerstel U, Park C, Romling U. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. Mol Microbiol. 2003;49(3):639-54.
187. Santander J, Roland KL, Curtiss R, 3rd. Regulation of Vi capsular polysaccharide synthesis in *Salmonella enterica* serotype Typhi. J Infect Dev Ctries. 2008;2(6):412-20.
188. Rychlik I, Barrow PA. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. FEMS Microbiol Rev. 2005;29(5):1021-40.
189. Bang IS, Kim BH, Foster JW, Park YK. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. J Bacteriol. 2000;182(8):2245-52.
190. Coombes BK, Wickham ME, Lowden MJ, Brown NF, Finlay BB. Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(48):17460-5.
191. Villarreal JM, Becerra-Lobato N, Rebollar-Flores JE, Medina-Aparicio L, Carbajal-Gomez E, Zavala-Garcia ML, et al. The *Salmonella enterica* serovar Typhi *ltrR-ompR-ompC-ompF* genes are involved in resistance to the bile salt sodium deoxycholate and in bacterial transformation. Mol Microbiol. 2014;92(5):1005-24.
192. Pontes MH, Groisman EA. Protein synthesis controls phosphate homeostasis. Genes Dev. 2018;32(1):79-92.

193. Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Kimura S, Nakata A, Ishihama A. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein in vitro. *J Mol Biol.* 1988;203(1):85-95.
194. Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Kawamoto T, Yamada M, Nakata A. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol.* 1989;210(3):551-9.
195. Rosenberg H, Gerdes RG, Chegwiddden K. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1977;131(2):505-11.
196. Cox GB, Rosenberg H, Downie JA, Silver S. Genetic analysis of mutants affected in the Pst inorganic phosphate transport system. *J Bacteriol.* 1981;148(1):1-9.
197. Lucas RL, Lee CA. Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 2001;183(9):2733-45.
198. Lucas RL, Lostroh CP, DiRusso CC, Spector MP, Wanner BL, Lee CA. Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol.* 2000;182(7):1872-82.
199. Evans MR, Fink RC, Vazquez-Torres A, Porwollik S, Jones-Carson J, McClelland M, et al. Analysis of the ArcA regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *BMC Microbiol.* 2011;11:58.
200. Morales EH, Collao B, Desai PT, Calderon IL, Gil F, Luraschi R, et al. Probing the ArcA regulon under aerobic/ROS conditions in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Genomics.* 2013;14:626.
201. Zbell AL, Benoit SL, Maier RJ. Differential expression of NiFe uptake-type hydrogenase genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology.* 2007;153(Pt 10):3508-16.
202. Morales EH, Calderon IL, Collao B, Gil F, Porwollik S, McClelland M, et al. Hypochlorous acid and hydrogen peroxide-induced negative regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompW* by the response regulator ArcA. *BMC Microbiol.* 2012;12:63.
203. Calderon IL, Morales E, Caro NJ, Chahuan CA, Collao B, Gil F, et al. Response regulator ArcA of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium downregulates expression of *OmpD*, a porin facilitating uptake of hydrogen peroxide. *Res Microbiol.* 2011;162(2):214-22.

204. Freeman ZN, Dorus S, Waterfield NR. The KdpD/KdpE two-component system: integrating K(+) homeostasis and virulence. *PLoS Pathog.* 2013;9(3):e1003201.
205. Rhoads DB, Waters FB, Epstein W. Cation transport in *Escherichia coli*. VIII. Potassium transport mutants. *J Gen Physiol.* 1976;67(3):325-41.
206. Walderhaug MO, Polarek JW, Voelkner P, Daniel JM, Hesse JE, Altendorf K, et al. KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *J Bacteriol.* 1992;174(7):2152-9.
207. Altendorf K, Voelkner P, Puppe W. The sensor kinase KdpD and the response regulator KdpE control expression of the *kdpFABC* operon in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 1994;145(5-6):374-81.
208. Gannoun-Zaki L, Belon C, Dupont C, Hilbert F, Kremer L, Blanc-Potard AB. Overexpression of the *Salmonella* KdpF membrane peptide modulates expression of *kdp* genes and intramacrophage growth. *FEMS Microbiol Lett.* 2014;359(1):34-41.
209. Frymier JS, Reed TD, Fletcher SA, Csonka LN. Characterization of transcriptional regulation of the *kdp* operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1997;179(9):3061-3.
210. Alegado RA, Chin CY, Monack DM, Tan MW. The two-component sensor kinase KdpD is required for *Salmonella typhimurium* colonization of *Caenorhabditis elegans* and survival in macrophages. *Cell Microbiol.* 2011;13(10):1618-37.
211. Rhoads DB, Laimins L, Epstein W. Functional organization of the *kdp* genes of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1978;135(2):445-52.
212. Pezza A, Pontel LB, Lopez C, Soncini FC. Compartment and signal-specific codependence in the transcriptional control of *Salmonella* periplasmic copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(41):11573-8.
213. Kato A, Higashino N, Utsumi R. Fe(3+)-dependent epistasis between the CpxR-activated loci and the PmrA-activated LPS modification loci in *Salmonella enterica*. *J Gen Appl Microbiol.* 2017;62(6):286-96.
214. Cerminati S, Giri GF, Mendoza JI, Soncini FC, Checa SK. The CpxR/CpxA system contributes to *Salmonella* gold-resistance by controlling the GolS-dependent *gesABC* transcription. *Environ Microbiol.* 2017;19(10):4035-44.
215. Weatherspoon-Griffin N, Zhao G, Kong W, Kong Y, Morigen, Andrews-Polymenis H, et al. The CpxR/CpxA two-component system up-regulates two Tat-dependent peptidoglycan

- amidases to confer bacterial resistance to antimicrobial peptide. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5529-39.
216. Humphreys S, Rowley G, Stevenson A, Anjum MF, Woodward MJ, Gilbert S, et al. Role of the two-component regulator CpxAR in the virulence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect Immun*. 2004;72(8):4654-61.
217. Miticka H, Rowley G, Rezuchova B, Homerova D, Humphreys S, Farn J, et al. Transcriptional analysis of the *rpoE* gene encoding extracytoplasmic stress response sigma factor sigmaE in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;226(2):307-14.
218. De la Cruz MA, Perez-Morales D, Palacios IJ, Fernandez-Mora M, Calva E, Bustamante VH. The two-component system CpxR/A represses the expression of *Salmonella* virulence genes by affecting the stability of the transcriptional regulator HilD. *Front Microbiol*. 2015;6:807.
219. Raivio TL, Silhavy TJ. Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *J Bacteriol*. 1997;179(24):7724-33.
220. Wolfe AJ, Parikh N, Lima BP, Zemaitaitis B. Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR. *J Bacteriol*. 2008;190(7):2314-22.
221. Nakayama S, Kushiro A, Asahara T, Tanaka R, Hu L, Kopecko DJ, et al. Activation of *hilA* expression at low pH requires the signal sensor CpxA, but not the cognate response regulator CpxR, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*. 2003;149(Pt 10):2809-17.
222. Leclerc GJ, Tartera C, Metcalf ES. Environmental regulation of *Salmonella typhi* invasion-defective mutants. *Infect Immun*. 1998;66(2):682-91.
223. Choi E, Groisman EA, Shin D. Activated by different signals, the PhoP/PhoQ two-component system differentially regulates metal uptake. *J Bacteriol*. 2009;191(23):7174-81.
224. Kato A, Groisman EA, Howard Hughes Medical I. The PhoQ/PhoP regulatory network of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol*. 2008;631:7-21.
225. Park SY, Groisman EA. Signal-specific temporal response by the *Salmonella* PhoP/PhoQ regulatory system. *Mol Microbiol*. 2014;91(1):135-44.

226. Charles RC, Harris JB, Chase MR, Lebrun LM, Sheikh A, LaRocque RC, et al. Comparative proteomic analysis of the PhoP regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhi versus Typhimurium. PLoS One. 2009;4(9):e6994.
227. Retamal P, Castillo-Ruiz M, Mora GC. Characterization of MgtC, a virulence factor of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. PLoS One. 2009;4(5):e5551.
228. Groisman EA. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. J Bacteriol. 2001;183(6):1835-42.
229. Ahmer BM, van Reeuwijk J, Watson PR, Wallis TS, Heffron F. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. Mol Microbiol. 1999;31(3):971-82.
230. Faucher SP, Forest C, Beland M, Daigle F. A novel PhoP-regulated locus encoding the cytolysin ClyA and the secreted invasin TaiA of *Salmonella enterica* serovar Typhi is involved in virulence. Microbiology. 2009;155(Pt 2):477-88.
231. Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BM. Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. Int J Med Microbiol. 2006;296(7):449-66.
232. Teplitski M, Al-Agely A, Ahmer BM. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology. 2006;152(Pt 11):3411-24.
233. Martinez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, et al. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. Mol Microbiol. 2011;80(6):1637-56.
234. Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BM. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. J Bacteriol. 2003;185(24):7257-65.
235. Bustamante VH, Martinez LC, Santana FJ, Knodler LA, Steele-Mortimer O, Puente JL. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(38):14591-6.
236. Pickard D, Kingsley RA, Hale C, Turner K, Sivaraman K, Wetter M, et al. A genomewide mutagenesis screen identifies multiple genes contributing to Vi capsular expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi. J Bacteriol. 2013;195(6):1320-6.
237. Chavez RG, Alvarez AF, Romeo T, Georgellis D. The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. J Bacteriol. 2010;192(7):2009-12.

238. Lawhon SD, Maurer R, Suyemoto M, Altier C. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol.* 2002;46(5):1451-64.
239. Zere TR, Vakulskas CA, Leng Y, Pannuri A, Potts AH, Dias R, et al. Genomic Targets and Features of BarA-UvrY (-SirA) Signal Transduction Systems. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145035.
240. Guerrero P, Collao B, Morales EH, Calderon IL, Ipinza F, Parra S, et al. Characterization of the BaeSR two-component system from *Salmonella Typhimurium* and its role in ciprofloxacin-induced *mdtA* expression. *Arch Microbiol.* 2012;194(6):453-60.
241. Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 2007;189(24):9066-75.
242. Guerrero P, Collao B, Alvarez R, Salinas H, Morales EH, Calderon IL, et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium BaeSR two-component system positively regulates *sodA* in response to ciprofloxacin. *Microbiology.* 2013;159(Pt 10):2049-57.
243. Appia-Ayme C, Patrick E, Sullivan MJ, Alston MJ, Field SJ, AbuOun M, et al. Novel inducers of the envelope stress response BaeSR in *Salmonella Typhimurium*: BaeR is critically required for tungstate waste disposal. *PLoS One.* 2011;6(8):e23713.
244. Miller C, Ingmer H, Thomsen LE, Skarstad K, Cohen SN. DpiA binding to the replication origin of *Escherichia coli* plasmids and chromosomes destabilizes plasmid inheritance and induces the bacterial SOS response. *J Bacteriol.* 2003;185(20):6025-31.
245. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science.* 2004;305(5690):1629-31.
246. Ingmer H, Miller CA, Cohen SN. Destabilized inheritance of pSC101 and other *Escherichia coli* plasmids by DpiA, a novel two-component system regulator. *Mol Microbiol.* 1998;29(1):49-59.
247. Mandin P, Gottesman S. A genetic approach for finding small RNAs regulators of genes of interest identifies RybC as regulating the DpiA/DpiB two-component system. *Mol Microbiol.* 2009;72(3):551-65.

248. Condell O, Power KA, Handler K, Finn S, Sheridan A, Sergeant K, et al. Comparative analysis of *Salmonella* susceptibility and tolerance to the biocide chlorhexidine identifies a complex cellular defense network. *Front Microbiol.* 2014;5:373.
249. Avison MB, Horton RE, Walsh TR, Bennett PM. *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *J Biol Chem.* 2001;276(29):26955-61.
250. Cariss SJ, Tayler AE, Avison MB. Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2008;190(11):3930-9.
251. Wanner BL, Latterell P. Mutants affected in alkaline phosphatase, expression: evidence for multiple positive regulators of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Genetics.* 1980;96(2):353-66.
252. Makino K, Shinagawa H, Nakata A. Cloning and characterization of the alkaline phosphatase positive regulatory gene (phoM) of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 1984;195(3):381-90.
253. Lopez CA, Rivera-Chavez F, Byndloss MX, Baumler AJ. The Periplasmic Nitrate Reductase NapABC Supports Luminal Growth of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium during Colitis. *Infect Immun.* 2015;83(9):3470-8.
254. Teixido L, Cortes P, Bigas A, Alvarez G, Barbe J, Campoy S. Control by Fur of the nitrate respiration regulators NarP and NarL in *Salmonella enterica*. *Int Microbiol.* 2010;13(1):33-9.
255. Leclerc JM, Dozois CM, Daigle F. *Salmonella enterica* serovar Typhi siderophore production is elevated and Fur inactivation causes cell filamentation and attenuation in macrophages. *FEMS Microbiol Lett.* 2017;364(15).
256. Rabin RS, Stewart V. Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1993;175(11):3259-68.
257. Darwin AJ, Stewart V. Expression of the *narX*, *narL*, *narP*, and *narQ* genes of *Escherichia coli* K-12: regulation of the regulators. *J Bacteriol.* 1995;177(13):3865-9.

258. Noriega CE, Lin HY, Chen LL, Williams SB, Stewart V. Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* 2010;75(2):394-412.
259. Moreira CG, Sperandio V. Interplay between the QseC and QseE bacterial adrenergic sensor kinases in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. *Infect Immun.* 2012;80(12):4344-53.
260. Gopel Y, Luttmann D, Heroven AK, Reichenbach B, Dersch P, Gorke B. Common and divergent features in transcriptional control of the homologous small RNAs GlmY and GlmZ in Enterobacteriaceae. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(4):1294-309.
261. Reading NC, Rasko DA, Torres AG, Sperandio V. The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(14):5889-94.
262. Reichenbach B, Maes A, Kalamorz F, Hajnsdorf E, Gorke B. The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of *glmS* expression and is subject to regulation by polyadenylation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(8):2570-80.
263. Kalamorz F, Reichenbach B, Marz W, Rak B, Gorke B. Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2007;65(6):1518-33.
264. Pullinger GD, Carnell SC, Sharaff FF, van Diemen PM, Dziva F, Morgan E, et al. Norepinephrine augments *Salmonella enterica*-induced enteritis in a manner associated with increased net replication but independent of the putative adrenergic sensor kinases QseC and QseE. *Infect Immun.* 2010;78(1):372-80.
265. Yamamoto K, Hirao K, Oshima T, Aiba H, Utsumi R, Ishihama A. Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2005;280(2):1448-56.
266. Jeon J, Kim H, Yun J, Ryu S, Groisman EA, Shin D. RstA-promoted expression of the ferrous iron transporter FeoB under iron-replete conditions enhances Fur activity in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 2008;190(22):7326-34.
267. Cabeza ML, Aguirre A, Soncini FC, Vescovi EG. Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 2007;189(20):7335-42.

268. Nam D, Choi E, Kweon DH, Shin D. The RstB sensor acts on the PhoQ sensor to control expression of PhoP-regulated genes. *Mol Cells*. 2010;30(4):363-8.
269. Zientz E, Bongaerts J, Uden G. Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (dcuSR genes) two-component regulatory system. *J Bacteriol*. 1998;180(20):5421-5.
270. Scheu PD, Kim OB, Griesinger C, Uden G. Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C(4)-dicarboxylates in bacteria. *Future Microbiol*. 2010;5(9):1383-402.
271. Witan J, Bauer J, Wittig I, Steinmetz PA, Erker W, Uden G. Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Mol Microbiol*. 2012;85(5):846-61.
272. Steinmetz PA, Worner S, Uden G. Differentiation of DctA and DcuS function in the DctA/DcuS sensor complex of *Escherichia coli*: function of DctA as an activity switch and of DcuS as the C4-dicarboxylate sensor. *Mol Microbiol*. 2014;94(1):218-29.
273. Worner S, Strecker A, Monzel C, Zeltner M, Witan J, Ebert-Jung A, et al. Conversion of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli* of the DcuB/DcuS sensor complex to the C4 - dicarboxylate responsive form by the transporter DcuB. *Environ Microbiol*. 2016;18(12):4920-30.
274. Golby P, Davies S, Kelly DJ, Guest JR, Andrews SC. Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C4-dicarboxylates in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1999;181(4):1238-48.
275. Worner S, Surmann K, Ebert-Jung A, Volker U, Hammer E, Uden G. Cellular Concentrations of the Transporters DctA and DcuB and the Sensor DcuS of *Escherichia coli* and the Contributions of Free and Complexed DcuS to Transcriptional Regulation by DcuR. *J Bacteriol*. 2018;200(4).
276. Davies SJ, Golby P, Omrani D, Broad SA, Harrington VL, Guest JR, et al. Inactivation and regulation of the aerobic C(4)-dicarboxylate transport (dctA) gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1999;181(18):5624-35.

277. Engel P, Kramer R, Uden G. Transport of C4-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*. Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux. Eur J Biochem. 1994;222(2):605-14.
278. Scheu PD, Witan J, Rauschmeier M, Graf S, Liao YF, Ebert-Jung A, et al. CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system in vivo. J Bacteriol. 2012;194(3):636-45.
279. Magasanik B. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. Annu Rev Genet. 1982;16:135-68.
280. Merrick MJ. A new model for nitrogen control. Nature. 1982;297(5865):362-3.
281. Kustu S, Burton D, Garcia E, McCarter L, McFarland N. Nitrogen control in *Salmonella*: regulation by the *glnR* and *glnF* gene products. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(9):4576-80.
282. Ferro-Luzzi Ames G, Nikaido K. Nitrogen regulation in *Salmonella typhimurium*. Identification of an *ntnC* protein-binding site and definition of a consensus binding sequence. EMBO J. 1985;4(2):539-47.
283. Kustu SG, McFarland NC, Hui SP, Esmon B, Ames GF. Nitrogen control of *Salmonella typhimurium*: co-regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems. J Bacteriol. 1979;138(1):218-34.
284. Makela P SM, Calcagno S, Lounatmaa K. Isolation and genetic characterization of polymyxin-resistant mutant of *Salmonella*. FEMS Microbiology Letters. 1978(3):323-6.
285. Roland KL, Martin LE, Esther CR, Spitznagel JK. Spontaneous *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence. J Bacteriol. 1993;175(13):4154-64.
286. Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. J Bacteriol. 1997;179(22):7040-5.
287. Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, et al. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. Mol Microbiol. 1998;27(6):1171-82.
288. Farley MM, Shafer WM, Spitznagel JK. Lipopolysaccharide structure determines ionic and hydrophobic binding of a cationic antimicrobial neutrophil granule protein. Infect Immun. 1988;56(6):1589-92.

289. Shafer WM, Casey SG, Spitznagel JK. Lipid A and resistance of *Salmonella typhimurium* to antimicrobial granule proteins of human neutrophil granulocytes. *Infect Immun.* 1984;43(3):834-8.
290. Farizano JV, Pescaretti Mde L, Lopez FE, Hsu FF, Delgado MA. The PmrAB system-inducing conditions control both lipid A remodeling and O-antigen length distribution, influencing the *Salmonella Typhimurium*-host interactions. *J Biol Chem.* 2012;287(46):38778-89.
291. Perez JC, Groisman EA. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2007;63(1):283-93.
292. Soncini FC, Groisman EA. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol.* 1996;178(23):6796-801.
293. Gunn JS. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* 2008;16(6):284-90.
294. Gunn JS, Ryan SS, Van Velkinburgh JC, Ernst RK, Miller SI. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun.* 2000;68(11):6139-46.
295. Zhou Z, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Miller SI, Raetz CR. Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J Biol Chem.* 2001;276(46):43111-21.
296. Delgado MA, Mouslim C, Groisman EA. The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol Microbiol.* 2006;60(1):39-50.
297. Choi J, Groisman EA. The lipopolysaccharide modification regulator PmrA limits *Salmonella* virulence by repressing the type three-secretion system Spi/Ssa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(23):9499-504.
298. Alpuche Aranda CM, Swanson JA, Loomis WP, Miller SI. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):10079-83.

299. Gibbons HS, Kalb SR, Cotter RJ, Raetz CR. Role of Mg²⁺ and pH in the modification of *Salmonella* lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. *Mol Microbiol.* 2005;55(2):425-40.
300. Merighi M, Ellermeier CD, Slauch JM, Gunn JS. Resolvase-in vivo expression technology analysis of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PhoP and PmrA regulons in BALB/c mice. *J Bacteriol.* 2005;187(21):7407-16.
301. May JF, Groisman EA. Conflicting roles for a cell surface modification in *Salmonella*. *Mol Microbiol.* 2013;88(5):970-83.
302. Hughes DT, Clarke MB, Yamamoto K, Rasko DA, Sperandio V. The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLoS Pathog.* 2009;5(8):e1000553.
303. Bearson BL, Bearson SM. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog.* 2008;44(4):271-8.
304. Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15):8951-6.
305. Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(27):10420-5.
306. Bearson BL, Bearson SM, Lee IS, Brunelle BW. The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium QseB response regulator negatively regulates bacterial motility and swine colonization in the absence of the QseC sensor kinase. *Microb Pathog.* 2010;48(6):214-9.
307. Merighi M, Septer AN, Carroll-Portillo A, Bhatiya A, Porwollik S, McClelland M, et al. Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol.* 2009;9:42.
308. Moreira CG, Weinshenker D, Sperandio V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence in vitro and in vivo. *Infect Immun.* 2010;78(3):914-26.
309. Reading NC, Torres AG, Kendall MM, Hughes DT, Yamamoto K, Sperandio V. A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. *J Bacteriol.* 2007;189(6):2468-76.
310. NCBI. torR pseudo [*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. CT18] 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA2017 [

311. Baraquet C, Theraulaz L, Guiral M, Lafitte D, Mejean V, Jourlin-Castelli C. TorT, a member of a new periplasmic binding protein family, triggers induction of the Tor respiratory system upon trimethylamine N-oxide electron-acceptor binding in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2006;281(50):38189-99.
312. Mejean V, Iobbi-Nivol C, Lepelletier M, Giordano G, Chippaux M, Pascal MC. TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the tor operon. *Mol Microbiol*. 1994;11(6):1169-79.
313. Jourlin C, Ansaldi M, Mejean V. Transphosphorylation of the TorR response regulator requires the three phosphorylation sites of the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 1997;267(4):770-7.
314. Gon S, Giudici-Ortoni MT, Mejean V, Iobbi-Nivol C. Electron transfer and binding of the c-type cytochrome TorC to the trimethylamine N-oxide reductase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2001;276(15):11545-51.
315. McCrindle SL, Kappler U, McEwan AG. Microbial dimethylsulfoxide and trimethylamine-N-oxide respiration. *Adv Microb Physiol*. 2005;50:147-98.
316. Widenhorn KA, Somers JM, Kay WW. Expression of the divergent tricarboxylate transport operon (*tctI*) of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. 1988;170(7):3223-7.
317. Widenhorn KA, Somers JM, Kay WW. Genetic regulation of the tricarboxylate transport operon (*tctI*) of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. 1989;171(8):4436-41.
318. NCBI. tctE two-component system sensor kinase [*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. CT18] 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA2017 [
319. Hensel M, Hinsley AP, Nikolaus T, Sawers G, Berks BC. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*. 1999;32(2):275-87.
320. Barrett EL, Clark MA. Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiol Rev*. 1987;51(2):192-205.
321. Pollock MR, Knox R. Bacterial reduction of tetrathionate: A report to the medical research council. *Biochem J*. 1943;37(4):476-81.
322. NCBI. ttrS pseudo [*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. CT18] 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA2017 [

323. Chopra AK, Peterson JW, Prasad R. Cloning and sequence analysis of hydrogenase regulatory genes (hydHG) from *Salmonella typhimurium*. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1129(1):115-8.
324. Leonhartsberger S, Huber A, Lottspeich F, Bock A. The *hydH/G* Genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *J Mol Biol*. 2001;307(1):93-105.
325. Appia-Ayme C, Hall A, Patrick E, Rajadurai S, Clarke TA, Rowley G. ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR. *Biochem J*. 2012;442(1):85-93.
326. Huang Y, Leming CL, Suyemoto M, Altier C. Genome-wide screen of *Salmonella* genes expressed during infection in pigs, using *in vivo* expression technology. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(23):7522-30.
327. Chaudhuri RR LN, Snyder LA, Bailey CM, Stekel DJ, Pallen MJ. xBASE2: a comprehensive resource for comparative bacterial genomics *Jan*;36(Database issue):D543-6. : PMID: 17984072; 2008 [
328. Richards SM, Strandberg KL, Gunn JS. *Salmonella*-regulated lipopolysaccharide modifications. *Subcell Biochem*. 2010;53:101-22.
329. Majdalani N, Gottesman S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:379-405.
330. Huang YH, Ferrieres L, Clarke DJ. The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol*. 2006;157(3):206-12.
331. Pescaretti Mde L, Farizano JV, Morero R, Delgado MA. A novel insight on signal transduction mechanism of RcsCDB system in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *PLoS One*. 2013;8(9):e72527.
332. Detweiler CS, Monack DM, Brodsky IE, Mathew H, Falkow S. *virK*, *somA* and *rscC* are important for systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection and cationic peptide resistance. *Mol Microbiol*. 2003;48(2):385-400.
333. Pando JM, Karlinsey JE, Lara JC, Libby SJ, Fang FC. The Rcs-Regulated Colanic Acid Capsule Maintains Membrane Potential in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *MBio*. 2017;8(3).

334. Farizano JV, Torres MA, Pescaretti Mde L, Delgado MA. The RcsCDB regulatory system plays a crucial role in the protection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against oxidative stress. *Microbiology*. 2014;160(Pt 10):2190-9.
335. Latasa C, Garcia B, Echeverz M, Toledo-Arana A, Valle J, Campoy S, et al. *Salmonella* biofilm development depends on the phosphorylation status of RcsB. *J Bacteriol*. 2012;194(14):3708-22.
336. Wong VK, Pickard DJ, Barquist L, Sivaraman K, Page AJ, Hart PJ, et al. Characterization of the *yehUT* two-component regulatory system of *Salmonella enterica* Serovar Typhi and Typhimurium. *PLoS One*. 2013;8(12):e84567.
337. Miold S, Ehrbar K, Weissmuller A, Prager R, Tschape H, Russmann H, et al. *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and *sopE2*. *J Bacteriol*. 2001;183(7):2348-58.
338. Richardson AR, Soliven KC, Castor ME, Barnes PD, Libby SJ, Fang FC. The Base Excision Repair system of *Salmonella enterica* serovar typhimurium counteracts DNA damage by host nitric oxide. *PLoS Pathog*. 2009;5(5):e1000451.
339. Dizdaroglu M, Laval J, Boiteux S. Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry*. 1993;32(45):12105-11.
340. Zhang H, Du H, Ji X, Ni B, Mao L, Xu S, et al. OmpR may regulate the putative YehU/YehT two-component system in *Salmonella enterica* serovar Typhi under hypotonic growth condition. *Curr Microbiol*. 2012;64(3):283-9.
341. Island MD, Wei BY, Kadner RJ. Structure and function of the *uhp* genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. 1992;174(9):2754-62.
342. Merkel TJ, Nelson DM, Brauer CL, Kadner RJ. Promoter elements required for positive control of transcription of the *Escherichia coli uhpT* gene. *J Bacteriol*. 1992;174(9):2763-70.
343. Sheng X, Huang X, Li J, Xie X, Xu S, Zhang H, et al. Regulation of sulfur assimilation pathways in *Salmonella enterica* serovar Typhi upon up-shift high osmotic treatment: the role of UhpA revealed through transcriptome profiling. *Curr Microbiol*. 2009;59(6):628-35.

344. Yamamoto K, Matsumoto F, Oshima T, Fujita N, Ogasawara N, Ishihama A. Anaerobic regulation of citrate fermentation by CitAB in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008;72(11):3011-4.
345. Yamamoto K, Matsumoto F, Minagawa S, Oshima T, Fujita N, Ogasawara N, et al. Characterization of CitA-CitB signal transduction activating genes involved in anaerobic citrate catabolism in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73(2):346-50.
346. Hone DM, Harris AM, Chatfield S, Dougan G, Levine MM. Construction of genetically defined double aro mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine*. 1991;9(11):810-6.
347. Lee CA, Jones BD, Falkow S. Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(5):1847-51.
348. Ganjali Dashti M, Abdesahian P, Sudesh K, Phua KK. Optimization of *Salmonella Typhi* biofilm assay on polypropylene microtiter plates using response surface methodology. *Biofouling*. 2016;32(4):477-87.
349. Tremblay YD, Vogeeler P, Jacques M, Harel J. High-throughput microfluidic method to study biofilm formation and host-pathogen interactions in pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(8):2827-40.
350. Miller SI, Mekalanos JJ. Constitutive expression of the phoP regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J Bacteriol*. 1990;172(5):2485-90.
351. Romling U. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(11):1234-46.
352. Romling U, Sierralta WD, Eriksson K, Normark S. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol*. 1998;28(2):249-64.
353. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*. 2001;413(6858):852-6.
354. Dagan T, Blekhman R, Graur D. The "domino theory" of gene death: gradual and mass gene extinction events in three lineages of obligate symbiotic bacterial pathogens. *Mol Biol Evol*. 2006;23(2):310-6.

355. Pullinger GD, van Diemen PM, Dziva F, Stevens MP. Role of two-component sensory systems of *Salmonella enterica* serovar Dublin in the pathogenesis of systemic salmonellosis in cattle. *Microbiology*. 2010;156(Pt 10):3108-22.
356. Oshima T, Aiba H, Masuda Y, Kanaya S, Sugiura M, Wanner BL, et al. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*. 2002;46(1):281-91.
357. Chekabab SM, Harel J, Dozois CM. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. *Virulence*. 2014;5(8):786-93.
358. Pratt JT, McDonough E, Camilli A. PhoB regulates motility, biofilms, and cyclic di-GMP in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*. 2009;191(21):6632-42.
359. Ogasawara H, Yamamoto K, Ishihama A. Regulatory role of MlrA in transcription activation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;312(2):160-8.
360. Romling U, Bokranz W, Rabsch W, Zogaj X, Nimtz M, Tschape H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int J Med Microbiol*. 2003;293(4):273-85.
361. White AP, Gibson DL, Kim W, Kay WW, Surette MG. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *J Bacteriol*. 2006;188(9):3219-27.
362. Njoroge JW, Nguyen Y, Curtis MM, Moreira CG, Sperandio V. Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *MBio*. 2012;3(5):e00280-12.
363. Leclerc JM, Dozois CM, Daigle F. Role of the *Salmonella enterica* serovar Typhi Fur regulator and small RNAs RfrA and RfrB in iron homeostasis and interaction with host cells. *Microbiology*. 2013;159(Pt 3):591-602.
364. Rohmer L, Hocquet D, Miller SI. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol*. 2011;19(7):341-8.
365. Hohmann EL, Oletta CA, Killeen KP, Miller SI. *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J Infect Dis*. 1996;173(6):1408-14.

Annexes

Tableau VII. Listes d'amorces utilisées pour la création des mutants dans cette étude

Gène	Amorces	Séquence
<i>cpxR</i>	CpxR F1	cgggatccGCCATAACAGCAGCGGTAAC
	CpxR R2	AAACCACGGCAGCTCTCGGTCATCATCAA
	CpxR F3	CGAGAGCTGCCGTGGTTTAAAACATTGCGT
	CpxR R4	gctctagaTCTCTACGCGGCCATATTTT
<i>arcA</i>	ArcA F1	cgggatccCCCACGACCAAGCTAATGAT
	ArcA R2	CCGTGAATGATAAGAATGTGCGGGGTCTG
	ArcA F3	CATTCTTATCATTACGGCGAAGGTTATC
	ArcA R4	gctctagaGTCCTGTGAGCATCCCCTTA
<i>kdpE</i>	KdpE F1	cgggatccATAATGGGCCGGGTATTCCT
	KdpE R2	GGCGTGGGCGGATGGCCTGTTTCATCTTCA
	KdpE F3	AGGCCATCCGCCACGCCATTTTATTATC
	KdpE R4	gctctagaGCAATCTGTGAACCAGATCAAC
<i>phoP</i>	PhoP F1	cgggatccTGACGCCGGCAAATTATATC
	PhoP R2	CGTGCGGATTCAGGTGGTGGCGTAATAA
	PhoP F3	ACCACCTGAATCCGCACGATGTCATTACC
	PhoP R4	gctctagaGCAGACGAAACGTGGTTTTA
<i>sirA</i>	SirA F1	cgggatccAAATAGCAGCCCGGAACAG
	SirA R2	CTCCGCATTCACCAGTTCGTGGTCATCAA
	SirA F3	GAACTGGTGAATGCGGAGACGTTAACAAGC
	SirA R4	gctctagaATGCGTTACCGTGACATCAA
<i>baeR</i>	BaeR F1	cgggatccACGGAAGTGTCCCGTAACC
	BaeR R2	CGTATAAATCTGTCCCAGCTTGGGTTCAT
	BaeR F3	CTGGGACAGATTTATACGCGCGGTCTACG
	BaeR R4	gctctagaTAGCGGTGAGATGACGTTTC
<i>dpiA</i>	DpiA F1	cgggatccAAGTACCCGAGCTGACGAAC
	DpiA R2	AATCAGGTGGCGGATATATTCTGCGTGAT
	DpiA F3	TATATCCGCCACCTGATTGTGCGAGAGAT
	DpiA R4	gctctagaCCGGGATGGCTAAAATATCA
<i>creB</i>	CreB F1	cgggatccCAGGGAGAGGTGGTTTTCAA
	CreB R2	TAGTTTAGCTCCCTGTTTCATCCTCGACTA
	CreB F3	GAACAGGGAGCTAAACTACGCGCGATCA
	CreB R4	gctctagaGGTTGCCGGAAAGGAGAT
<i>narL</i>	NarL F1	cgggatccAAACGCCGAACGCAGTAAT

	NarL R2	CCAGACGCCTTACACCCGTGCGTAGCAT
	NarL F3	CGGGTGTAAAGGCGTCTGGATATCACCGAAA
	NarL R4	gctctagaCAGCGTGTCTCTTCCAATGA
<i>narP</i>	NarP F1	cgggatccGCAGCTACATATGCCCACT
	NarP R2	AGCCCCTGCATACCTCGCCGCATAAGTGG
	NarP F3	GCGAGGTATGCAGGGGCTTTCTAACAAAC
	NarP R4	gctctagaTGGCGCAGGAGAAATAAGAC
<i>dcuR</i>	DcuR F1	cgggatccGGTTACGGTGCTGATTACGG
	DcuR R2	GCTGAACGCCGACATAGCGGCGATTTAAC
	DcuR F3	GCTATGTCGGCGTTCAGCCGGAACATTAC
	DcuR R4	gctctagaCACTCTCGGCATGGGATAAT
<i>glnG</i>	GlnG F1	cgggatccGCTGTTCTACCCGATGGTCA
	GlnG R2	ACCCTGCGTCACCCAACGGATGGAECTAT
	GlnG F3	CGTTGGGTGACGCAGGGTCATAAACAGGA
	GlnG R4	gctctagaCGCTCCACTCGATACCAGAT
<i>pmrA</i>	PmrA F1	cgggatccACATGTCCCGATGCTCATTT
	PmrA R2	GTTCGTTATGCGTGTCGTCCTTCAACAATC
	PmrA F3	ACGACACGCATAACGAACCCTCGACCAA
	PmrA R4	gctctagaTTTGCTCAGTGCTTTCATGC
<i>yfhA</i>	YfhA F1	cgggatccTGGGGAGTTTAACCGACATT
	YfhA R2	GAGAGTAGCTTCAGTAATCCGGGATCGTC
	YfhA F3	ATTACTGAAGCTACTCTCCCGTCACGAA
	YfhA R4	gctctagaCTTCAGTGACCGTCATAACCG
<i>rstA</i>	RstA F1	cgggatccGGGCAGCTTTAATCACGAGT
	RstA R2	TCAGCAGCGTAAGCGGCAATGAGAGAACC
	RstA F3	TGCCGCTTACGCTGCTGAGCCCTATCGTAT
	RstA R4	gctctagaAAGGGGCTGTTCCGACTAAT
<i>qseB</i>	QseB F1	aaggaaaaagcgccgcTCCCTTTCATGTCGTTTCAG
	QseB R2	TTCCACTGCACGTCCCTCGGTAAACCAGT
	QseB F3	GAGGGACGTGCAGTGGAAGTCCATGTTCA
	QseB R4	gctctagaGGCGAACAACATCAACTGTG
<i>torR</i>	TorR F1	cgggatccAACGCTCTCCAGAGTTTTTCG
	TorR R2	AAGCGGCGAGATACCCCTCCTGCTCAAAA
	TorR F3	AGGGGTATCTCGCCGTTACGTCATAAAAT
	TorR R4	gctctagaCAACCGGTGCCTGAAAATA
<i>tctD</i>	TctD F1	aaggaaaaagcgccgcTGCTTGCAGTAAGGGTACGA
	TctD R2	CTTCCCTGAGCCAGCTCACGGTTATCTTC
	TctD F3	TGAGCTGGCTCAGGGAAGCGATGTACGAAT
	TctD R4	gctctagaAGGGCACGTTAACTTCCAGA
<i>ttrR</i>	TtrR F1	cgggatccATTACGTCAGGCGTTTCAGC
	TtrR R2	AATCAGTTCCGCGTATCATCATCCAGTA
	TtrR F3	GATACGGCGGAACTGATTAGGCGTTTTTCG

	TtrR R4	gctctagaATCTCGCGGTACAGTTCGTC
<i>hydG</i>	2-HydG R4	gctctagaTGGCTGACGGTAAGGTTTTTC
	2-HydG F3	CGCTGCTTCTGGAGAAAGAGGTGATTCTGG
	2-HydG R2	CTTTCTCCAGAAGCAGCGCCTGTAAAATC
	2-HydG F1	cgggatccGAACGCTATTCATGCGATTG
<i>rcsB</i>	RcsB F1	cgggatccGGGTGTTTTGCCATGCTTAAT
	RcsB R2	ATTTCTTCTCAAGTGATTTGCGAATACCG
	RcsB F3	AATCACTTGAGAAGAAATCGGCCGATGATG
	RcsB R4	gctctagaCTGTTTGTCTGAAGCCTGTGA
<i>copR</i>	CopR F1	cgggatccTCGTTTCATGCTTCACTCCTT
	CopR R2	ACTTTGGCGCCCTGACGTACCCACTCAAT
	CopR F3	ACGTCAGGGCGCCAAAGTAGACGATCCAT
	CopR R4	gctctagaGCCCCGATTTATTAGCGTCAT
<i>uhpA</i>	UhpA F1	cgggatccGGAACCTTGCTTCAACTGGA
	UhpA R2	ACCGCCATATCGCAGATACACACCTGTACG
	UhpA F3	TATCTGCGATATGGCGGTAAAAGAGATTGC
	UhpA R4	gctctagaAGGCCGAAGGGAAAGAGTAG
<i>yehT</i>	YehT F1	cgggatccTAATGCGGGACTGTATCAGC
	YehT R2	GCGACGGCTTAACGGCTCATCATCCACAA
	YehT F3	GAGCCGTTAAGCCGTCGCTATCTGAAAA
	YehT R4	gctctagaGCTGAAACCCCTCTTCCTCT
<i>citB</i>	CitB F1	cgggatccATTTTCGAGCGTGGAGTGAC
	CitB R2	TAGCTGATCGCTAGCATCGGTTTCGTCTTC
	CitB F3	GATGCTAGCGATCAGCTACGGGAAAGTGG
	CitB R4	gctctagaACCCTGCAATCCTGTTTTGT

