

Université de Montréal

Caractérisation du fimbriae *fim* de *Salmonella enterica* sérovar Typhi

Par

Gabrielle Cadieux

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maître
en microbiologie, infectiologie et immunologie

Décembre 2022

© Gabrielle Cadieux, 2022

Université de Montréal

Unité académique : département de microbiologie, infectiologie et immunologie,

Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Caractérisation du fimbriae *fim* de *Salmonella enterica* sérovar Typhi

Présenté par

Gabrielle Cadieux

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

George Szatmari
Président-rapporteur

France Daigle
Directeur de recherche

Richard Villemur
Membre du jury

Résumé

La bactérie *Salmonella enterica* sérovar Typhi est l'agent responsable de la fièvre typhoïde qui cause 20 millions de cas et plus de 200 000 morts annuellement. Elle possède plusieurs facteurs de virulence y compris 14 fimbriae, des structures protéiques que l'on retrouve à la surface de certaines bactéries. Plusieurs facteurs impliqués dans la chaîne de transport d'électrons (CTE) influencent l'expression du fimbriae *fim*, tel que Ndh, une NADH déshydrogénase (NADH-2), qui accepte et transmet les électrons du complexe I au pool de quinones entre le complexe II et III, et est un facteur majeur de la respiration aérobie chez les bactéries qui régite l'équilibre entre le NADH et NAD, et YqiC, une protéine multifactorielle et un facteur accessoire des ubiquinones, ont été identifiés comme activateur du fimbriae *Fim*. Notre hypothèse est que la CTE est impliquée dans la régulation du fimbriae *fim*. Nous voulions déterminer si la CTE régule l'expression du fimbriae *fim* de façon directe ou indirecte. Pour ce faire, nous avons déterminé le rôle du complexe I ; l'effet du stress oxydatif; et le rôle de l'accepteur final d'électron. Plusieurs mutants ont été créés par échange allélique et l'expression de *fim* chez ces mutants est quantifiée à l'aide d'un gène rapporteur, soit une fusion du promoteur *fim* avec le gène rapporteur *lacZ*. Pour déterminer le rôle du complexe I de la CTE, nous avons testé le mutant NDH-1 et NDH-2, qui s'avère à jouer un rôle important essentiel pour la régulation de *fim*. Pour évaluer l'effet du stress oxydatif, nous avons testé les mutants OxyR, SodB, la catalase KatG et les 3 peroxydases (Tpx, AhpC et TsaA) qui détoxifient les espèces réactives d'oxygènes (ROS) produites lors de la respiration. L'absence combinée de la catalase KatG et de la peroxydase AhpC empêche totalement l'expression de *fim*. Le rôle de l'accepteur final d'électron a été évalué par la présence ou absence d'oxygène, avec ou sans ajout de nitrate, nous suggérant un rôle important de YqiC pour la synthèse des transporteurs d'électrons, la génération d'ATP et le maintien du métabolisme bactérien en cas de stress oxydatif. Cette étude a permis d'identifier Ndh (NDH-2) comme une cible thérapeutique potentielle puisqu'elle ne se retrouve pas dans la chaîne d'électron de la mitochondrie chez les mammifères, donc chez les humains. Aussi, cette étude a permis de cibler les gènes détoxifiants essentiels à la régulation de *fim*, devenant eux aussi des cibles thérapeutiques potentielles.

Mots clés : *S. Typhi*, fimbriae, chaîne de transport d'électron, stress oxydatif.

Abstract

The bacterium *Salmonella enterica* serovar Typhi is the causative agent of typhoid fever, which causes 20 million cases and more than 200,000 deaths annually. It has several virulence factors including 14 fimbriae, protein structures found on the bacterial surface. Several factors involved in the electron transport chain (ETC) influence expression of the *fim* fimbriae, such as Ndh, an NADH dehydrogenase (NDH-2), which accepts and transports electrons from complex I to the quinone pool between the complex II and III, and is a major factor in aerobic respiration in bacteria that governs the balance between NADH and NAD, and YqiC, a multifactorial protein and an ubiquinone biosynthesis accessory factor, have been identified as an activator of Fim fimbriae. Our hypothesis is that ETC is involved in the regulation of the *fim* fimbriae. Our aim was to determine whether ETC regulates the expression of the *fim* fimbriae directly or indirectly. To do this, we determined the role of complex I; the effect of oxidative stress; and the role of the final electron acceptor. Several mutants were created by allelic exchange and *fim* expression in these mutants was quantified using a reporter gene, i.e. a fusion of the *fim* promoter with the *lacZ* reporter gene. To determine the role of ETC complex I, we tested the NDH-1 and NDH-2 mutants, which appears to play an important role essential for *fim* regulation. To assess the effect of oxidative stress, we tested mutants of OxyR, SodB, catalase KatG and the 3 peroxidases (Tpx, AhpC and TsaA) which detoxify reactive oxygen species (ROS) produced during respiration. When both the catalase KatG and the peroxidase AhpC were mutated, the *fim* expression was totally turned off. The role of the final electron acceptor was evaluated by the presence or absence of oxygen, with or without addition of nitrate, suggesting an important role of YqiC for electron carrier synthesis, the generation of ATP and the maintain bacterial metabolism in the event of oxidative stress. This study made it possible to identify Ndh (NDH-2) as a potential therapeutic target since it is not found in the electron chain of the mitochondria in mammals, therefore in humans. Also, this study made it possible to target the detoxifying genes essential to *fim* regulation, also becoming potential therapeutics targets.

Keywords : *S. Typhi*, fimbriae, electron transport chain, oxydative stress.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	5
Table des matières.....	6
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures	10
Liste des sigles et abréviations.....	12
Remerciements.....	14
Introduction	16
1. Salmonella.....	16
1.1 Généralités de <i>Salmonella</i> Typhi.....	17
1.1.1 Infection par <i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi.....	18
2. Fimbriae	20
2.1 Généralités	20
2.1.1 Fonctions des fimbriae.....	20
2.2 Fimbriae chez <i>S. Typhi</i>	21
2.2.1 Fim.....	22
3. La respiration cellulaire	26
3.1 La chaîne de transport d'électron de la mitochondrie.....	26
3.2 La chaîne de transport d'électron bactérienne	27
3.3 La chaîne de transport d'électron de <i>Salmonella</i> Typhi.....	28
3.3.1.1 <i>NADH</i> déshydrogénase de type 1 (<i>NADH-I</i>)	29
3.3.1.2 <i>NADH</i> déshydrogénase de type 2 (<i>NADH-II</i>).....	29
3.3.1.3 Inhibiteur du complexe I – Roténone.....	30
3.3.2 Complexe II – Succinate déshydrogénase	30
3.3.2.2 Inhibiteur du complexe II – Oxaloacétate	31
3.3.3 Ubiquinone et métaquinone (YqiC).....	31
3.3.4 Complexe III – Complexe cytochrome Cyo	32
3.3.4.1 Complexe III – Cytochrome bo <i>CydA</i>	32
3.3.4.2 Inhibiteur du complexe III – Antimycine A et KCN.....	33
3.4 Le stress oxydatif.....	34
3.5 Le ratio NADH/NAD.....	34

3.5.1 Les espèces réactives d'oxygènes (ROS)	35
3.5.1.2 <i>t-BHP</i>	37
3.6 La détoxification du stress oxydatif.....	38
3.6.1 Superoxyde dismutase	38
3.6.2 Senseur de peroxyde d'hydrogène	38
3.6.3 Les catalases.....	39
3.6.4 Les peroxydases	40
3.7 La détoxification du stress oxydatif chez <i>S. Typhi</i>	41
Problématique	42
Matériel et méthodes	43
Résultats	48
1. Rôle de la chaîne de transport d'électrons	48
1.1 Mutagenèse des joueurs clés de la chaîne de transport d'électron de la bactérie <i>S. Typhi</i> ISP1820	48
1.2 Effet de la quantité d'oxygène disponible dans le milieu de croissance.....	50
Rôle de l'accepteur d'électrons.....	56
Rôle du stress oxydatif.....	59
3.1 Rôle de la durée d'exposition au stress oxydatif	62
Doubles mutants.....	68
Rôle des complexes de la chaîne de transport d'électrons.....	71
Discussion	73
1. Rôle de la chaîne de transport d'électrons	74
1.1 Mutagenèse des joueurs clés de la chaîne de transport d'électrons de la bactérie <i>S. Typhi</i> ISP1820	74
1.2 Effet de la quantité d'oxygène disponible dans le milieu de croissance.....	77
2. Rôle de l'accepteur d'électrons	79
3. Rôle du stress oxydatif.....	81
3.1 Rôle de la durée d'exposition au stress oxydatif	81
3.1.1 Effet de l'exposition pendant la croissance	82
3.1.2 Effet lors d'un traitement choc	83
4. Doubles mutants.....	85
5. Rôle des complexes de la chaîne de transport d'électrons.....	88
5.1 Complexe I.....	88
Conclusion.....	89

Références bibliographiques	91
Annexes	99

Liste des tableaux

Tableau 1. – Souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude.....	44
Tableau 2. - Amorces utilisées dans cette étude	49

Liste des figures

Figure 1. – Fimbriae de <i>S. Typhi</i> observés en microscopie électronique.	21
Figure 2 - Fimbriae de <i>Salmonella Typhi</i> et leur rôle dans la virulence.....	22
Figure 3. - Identification de régulateurs de <i>fim</i> à l'aide d'un criblage par transposon.	24
Figure 4. - Expression de <i>fim</i> chez <i>S. Typhimurium</i>	25
Figure 5. - Chaîne de transport d'électron chez la mitochondrie.....	26
Figure 6. - Transport des électrons chez <i>E. coli</i>	27
Figure 7. - Chaîne de transport d'électrons chez <i>S. Typhi</i>	28
Figure 8. - Expression de <i>fim</i> chez différents mutants en condition de croissance normale; aérobie à 37°C.....	51
Figure 9. - Expression de <i>fim</i> chez différents mutants en conditions de croissance microaérobie à 37°C	52
Figure 10. - Expression de <i>fim</i> chez différents mutants en conditions de croissance anaérobie à 37°C	53
Figure 11. - Expression de différents fimbriae chez le mutant <i>ndh</i>	55
Figure 12. - Expression de <i>fim</i> en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de KNO ₃ 40mM	57
Figure 13. - Expression de <i>fim</i> en condition anaérobie 37°C avec ajout de KNO ₃ 40mM.....	58
Figure 14. - Expression de <i>fim</i> en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de H ₂ O ₂ 50 µM	60
Figure 15. - Expression de <i>fim</i> en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de <i>t</i> -BHP 50 µM	61
Figure 16 - Expression de <i>fim</i> en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de peroxyde d'hydrogène à 5 µM.....	63
Figure 17 - Expression de <i>fim</i> en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de peroxyde d'hydrogène à 1mM.....	64
Figure 18 - Expression de <i>fim</i> en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de peroxyde d'hydrogène à 2 mM.....	65

Figure 19 - Expression de <i>fim</i> en condition normale (aérobie 37°C) avec un choc oxydatif de 1 mM durant 30 minutes.....	67
Figure 20 - Expression de <i>fim</i> chez les doubles mutants de catalase et peroxydase en condition normale (aérobie 37°C).....	69
Figure 21 - Expression de <i>fim</i> chez les doubles mutants de catalase et peroxydase en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de peroxyde d'hydrogène à faible (50 µM) et forte (2 mM) concentration.....	70
Figure 22 - Expression de <i>fim</i> en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de roténone à 140 mM.....	72
Figure 23. Rôle de la chaîne de transport d'électrons de <i>Salmonella</i> Typhi sur <i>fim</i>	75

Liste des sigles et abréviations

AA : Antimycine A

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

Amp : ampicilline

ATP : adénosine triphosphate

Cm : chloramphenicol

CMI : concentration minimale inhibitrice

CTE: Chaîne de transport d'électrons

Kb : kilobase

LB : Luria-Bertani ou *lysogeny broth*

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide + hydrogène

NOS : espèces réactives de nitrate

ONPG : o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside

Q : Quinone ou métaquinone

ROS : espèces réactives d'oxygène

SEM : erreur standard de la moyenne (*standard error of the mean*)

SOD : superoxyde dismutase

S. Typhi ou STY: *Salmonella enterica* sérovar Typhi

S. Typhimurium ou STM: *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium

« Un jour j'irai vivre en Théorie, car en Théorie tout se passe bien.

-Pierre Desproges »

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, France Daigle, sans qui tout ce travail n'aurait pas été possible. Je te remercie infiniment de ta compréhension et de ta flexibilité qui m'ont permis d'atteindre mes (très nombreux) objectifs professionnels en simultanés. Ton côté humain m'a permis d'évoluer en recherche alors que moi-même, j'étais à la recherche de ma place. Malgré mes débuts en plein COVID, ton laboratoire était à ton image, aussi chaleureux que toi.

Une mention spéciale se doit d'être dite à mes collègues, Tahiana qui m'a pris sous son aile lors de mon stage, puis Camille qui m'a conseillée et remise sur le droit chemin à plusieurs reprises. L'arrivée de Magdalena a renforcé notre équipe et a permis de grandes discussions (académiques pour la grande majorité!), et ce, la bouche toujours pleine de galette. Je vous remercie d'avoir rendu cette expérience aussi enrichissante.

Je souhaite également remercier ma famille, pour le support qu'ils m'ont apporté tout au long de mon parcours académique. Un merci spécial à ma mère Nathalie et mon beau-père Martin, depuis déjà plusieurs années vous aviez droit à des mimes de bactériophages et étudiez la biologie sous toutes ses formes. Vous ne m'avez pas lâché même rendue au deuxième cycle, vous qui avez eu le droit à plusieurs soupers où je vous expliquais comment je créais mes mutants, et que très souvent rien n'avait fonctionné. Malgré tout, vous vous intéressiez toujours à savoir comment ma journée de « Frankenstein de bactéries » s'était passée ou bien « combien de bactéries as-tu électrocutées aujourd'hui? ». Je ne vous remercierai jamais assez d'avoir cru autant en moi, j'en avais bien besoin. Merci d'être dans ma vie.

Je souligne aussi mes sœurs et mon frère, qui m'ont vu travaillé d'arrache-pied et souvent semblée découragée, j'espère que vous ne redouterez pas vos études, car c'est l'un des plus beaux cadeaux que je me suis fait dans la vie. J'espère vous avoir transmis ma persévérance et un peu ma passion des sciences.

Je tiens aussi à témoigner ma reconnaissance à mon conjoint, Jérémy qui me voit avec toutes mes ambitions et ma détermination à tout faire depuis bientôt 10 ans. Tu as su me remonter le moral lorsque nécessaire et m'offrir ton épaule dans les moments les plus difficiles. Tu m'as motivé et m'as rassurée alors que j'avais tant de projets commencés: mémoire, stage d'enseignement et carrière d'enseignante qui se bousculait devant moi dans un si court laps de temps. Comme tu me l'as toujours dit, ce travail acharné va payer. Regarde-nous, les deux, enfin enseignants.

Aussi, j'aimerais dire un merci tout spécial à ma grande amie Marie-Chantale, nous avons tous deux pris des chemins différents après notre baccalauréat ensemble, mais notre complicité n'a jamais cessé et notre écoute s'est amplifiée malgré la distance qui nous séparait. Nos messages vocaux à la fin de chaque semaine me faisaient rire et tes encouragements me faisaient du bien. Toi aussi à ton tour tu termines ton long périple, nous avons de quoi être fière.

Finalement, j'aimerais remercier le département de microbiologie ainsi que le fond CSRNG qui m'ont permis d'obtenir deux bourses, celle de fin de rédaction et celle de Gabriel-Marquis, qui ont aidé à financer ma maîtrise. J'aimerais aussi souligner les membres du jury de ce mémoire, Richard Villemur et George Szatmari, votre expertise et votre avis sont précieux à mes yeux.

Introduction

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème émergeant auquel nous devons faire face et trouver des solutions alternatives afin de neutraliser les infections et les conséquences possibles. En effet, on estime que d'ici 2050, 10 millions de personnes par année décèderont si la situation n'est pas prise en main rapidement (Organisation mondiale de la santé [OMS], 2019). L'éventail d'alternatives est rempli de possibilités; il ne reste qu'à déterminer lesquelles s'appliquent à chaque bactérie. On parle souvent de la vaccination, de la phagothérapie, les peptides antimicrobiens ou du détournement du système CRISPR-Cas9 (Gholizadeh et al., 2020) pour contrer cette problématique. Ici, nous avons décidé d'apprendre à mieux connaître notre microorganisme d'intérêt dans l'optique d'attaquer directement sa constitution, afin de limiter sa prolifération ainsi que sa capacité d'infection.

1. Salmonella

Salmonella est une bactérie Gram négative qui infecte autant l'humain que les animaux, se transmettant facilement par contact avec la nourriture et l'eau, faisant d'elle un continuuel problème. Les symptômes typiques sont l'affection du système digestif ; diarrhée, vomissement, crampes, etc.

Appartenant à la famille des entérobactéries, cela fait d'elle une cousine très proche d'*Escherichia coli*. Leur patrimoine génétique et leurs gènes de ménages sont grandement similaires. Ces similitudes facilitent la recherche concernant sur *Salmonella* et aident à mieux comprendre la régulation de cette dernière puisque *E. coli* est la bactérie la plus étudiée dans le monde. *Salmonella* se divise en 2 espèces : *bongori* et *enterica*, puis en six sous-espèces et on ne dénombre pas moins de 2 500 sérovars (Brenner et al., 2000). La sous-espèce *enterica* comprend la majorité des souches pathogènes chez l'humain et contient des souches typhiques et non-typhiques (Mandal et Brennand, 1988).

À ce jour, l'agent de la fièvre typhoïde, *Salmonella enterica* sérovar Typhi (*S. Typhi*) est une bactérie peu connue du public et de la communauté scientifique, elle est souvent confondue avec les salmonelles non-typhiques que l'on retrouve chez les produits de la volaille. Pourtant, elle infecte entre 11 à 20 millions de personnes par année et tue parmi ceux-ci, entre 128 000 à 161 000 meurent (OMS, 2021). *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium est utilisé comme modèle de la typhoïde, car il existe un modèle murin d'infection systémique (Thompson, 2016). *S. Typhi* voit son étude mise de côté et les informations qui la concernent sont extrapolées du modèle murin, malgré le fait que ces deux sérovars sont très différents l'un de l'autre, autant dans leur virulence et leur régulation globale. La recherche présentée dans ce mémoire porte donc sur la régulation de *S. Typhi*.

1.1 Généralités de *Salmonella Typhi*

Tel que mentionné plus haut, *Salmonella enterica* sérovar Typhi est spécifique au genre humain et est l'agent causal de la fièvre typhoïde. Ce pathogène intracellulaire facultatif pénètre dans le tractus gastro-intestinal humain via l'eau et les aliments contaminés. L'infection de la muqueuse épithéliale intestinale engendre des symptômes comme la fièvre, l'intoxication du système nerveux, l'hémorragie intestinale causant la perforation et une infection systémique sévère pouvant causer la mort (House et al., 2001; Zhang et al., 2018). Lors de la fièvre typhoïde, l'infection atteint de façon plus agressive le foie, la rate, la vésicule biliaire et la moelle osseuse. Les rechutes et la persistance, présentent chez la plupart des convalescents, sont également des caractéristiques typiques de la fièvre typhoïde.

C'est le schéma de Kauffman-White (Popoff et al., 2001) qui permet d'identifier et diviser les salmonelles en sérovars. Ces antigènes de surfaces sont: l'antigène flagellaire « H », l'antigène oligosaccharidique « O » et l'antigène polysaccharidique capsulaire « Vi ». C'est d'ailleurs grâce à la capsule Vi que *S. Typhi* peut passer inaperçu du système immunitaire de l'hôte et avoir une infection optimale. De plus, à sa surface *S. Typhi* présente des fimbriae, facilitant son attachement spécifique aux cellules et assurant la formation de biofilms et donc la persistance chez l'hôte (Rhen, 2019) (Kolenda et al., 2019).

1.1.1 Infection par *Salmonella enterica* sérovar Typhi

S. Typhi peut seulement infecter son hôte par le biais de nourriture ou d'eau contaminées. Tout d'abord, elle doit survivre aux enzymes buccales, qui sont présentes pour dégrader les microorganismes et débiter la digestion mécanique des aliments. Cette difficulté est très minime pour la bactérie, comparée à l'acidité qui l'attend dans l'estomac. Son chemin dans le tractus digestif est facilité par le mouvement de péristaltisme de l'hôte et par les flagelles qu'elle possède, permettant une locomotion fluide et rapide. Lorsque *Salmonella* atteint l'intestin et traverse la barrière épithéliale, elle pénètre par les cellules M des cellules des plaques de Peyer. On estime que ces cellules seraient la porte d'entrée vers les macrophages (Jepson et Clark, 2001). Dans les macrophages, *S. Typhi* active différentes stratégies de virulence afin d'y survivre et de se répliquer. Grâce à la circulation lymphatique, les macrophages migrent et la bactérie rejoint les ganglions lymphatiques, le foie et la rate pour s'y multiplier. (Vazquez-Torres et al., 1999) Cette réplification durera quelques semaines et permettra un relargage massif dans le sang. L'infection devient alors systémique. Les symptômes cliniques sont la fièvre, les fibrillations cardiaques et l'encéphalopathie (House et al., 2001). Il est aussi possible que la bactérie aille rejoindre la vésicule biliaire, qui permettra un relargage vers les intestins, et éventuellement dans les selles du patient (Dougan et Baker, 2014). Cette propagation dans ces organes peut même mener à des perforations du tractus intestinal et des saignements, rendant l'infection encore plus sévère, voire mortelle (Parry et al., 2002).

Dans un cas de porteur chronique, l'hôte va continuer d'excréter des bactéries après l'infection, la bactérie va adhérer aux cellules de l'hôte pour coloniser la vésicule biliaire, et ce, à l'aide de ces 14 fimbriae et ces facteurs de virulence. C'est ce qu'on qualifie de biofilm, donc une communauté bactérienne qui tapisse l'intérieur de l'organe, permettant la prolifération et la persistance de la bactérie (Parry et al., 2002). De son côté, l'hôte aussi utilise différentes stratégies pour sa survie. L'une d'entre elles est d'utiliser les phagocytes pour tuer et éradiquer les bactéries présentes. Ce phénomène produit beaucoup d'espèces réactives d'oxygène (ROS) dans l'environnement qui sont toxiques à la fois pour la bactérie et l'hôte endommageant principalement leur ADN (Karash et al., 2017).

Salmonella va produire des protéines effectrices, localisées sur des îlots de pathogénicité de *Salmonella* (SPI1 et SPI2), qui augmentent la réaction d'inflammation en influençant à la hausse les espèces réactives d'oxygène et de nitrate. Les facteurs de virulence de la salmonelle sont contenus dans les îlots de pathogénicité ont été acquis-horizontalement par *S. Typhi* (Hansen-Wester et Hensel, 2001; Lou et al., 2019). SPI1 et SPI2, respectivement, jouent tous deux un rôle fondamental dans l'invasion de *S. Typhi*, facilitant l'invasion de l'épithélium intestinal et la réplication dans les phagocytes. Une fois bien attachées, les bactéries vont pouvoir entrer dans les cellules par ondulation, grâce au système de sécrétion type 3 (SST3) du SPI1 qui permet l'introduction forcée dans la cellule non-phagocytaire en entourant la bactérie, dans le but de se reproduire de façon intracellulaire. Le SPI2, quant à lui, permet la survie des bactéries intracellulaire dans les cellules phagocytaires comme les macrophages, ce qui permet que l'infection devienne systémique (Parkhill et al., 2001).

2. Fimbriae

2.1 Généralités

Les fimbriae sont des structures protéiques filamenteuses que l'on retrouve à la surface de plusieurs bactéries et ayant plusieurs rôles dans leur virulence. Il est important de ne pas confondre ce type de prolongement avec les pili, qui quant à eux, jouent un rôle dans la conjugaison bactérienne. On retrouve les fimbriae chez la plupart des entérobactéries et surtout chez les bactéries à Gram négatif (Duguid et al., 1955).

C'est dès le tout début du 20^e siècle que l'on remarque au microscope ces filaments. Mais c'est vers 1950, que la microscopie électronique à haute résolution va permettre une observation plus claire et que l'étude plus sérieuse débute. Les premières constatations se font chez *E. coli* et suggèrent que ces filaments servent à l'adhésion entre la bactérie et son hôte ou bien à des surfaces abiotiques (Houwink et van, 1950; Miles et Pirie, 1949).

Certains fimbriae utilisent la voie d'assemblage chaperons-placiers « CUP » qui signifie « *chaperon-usher pathway* ». Un chaperon périplasmique et un placier à la membrane externe servent à assembler les principales sous-unités dans les structures filamenteuses externes finales. Cette classe de fimbriae est la plus diversifiée. Les fimbriae de *S. Typhi* sont phylogénétiquement sous-classées en cinq clades en fonction du placier : γ_1 , γ_3 , γ_4 , π et α (Townsend et al., 2001). Éventuellement, il a été possible de regrouper les fimbriae et de les classer en se basant sur trois caractéristiques principales, soient leur spécificité, leur structure et leur phylogénie basée sur l'homologie de séquence (Fronzes et al., 2008; Nuccio et Bäumler, 2007).

2.1.1 Fonctions des fimbriae

En étant des prolongements physiques de la bactérie, les fimbriae peuvent être comparés des bras qui vont entrer en contact avec les cellules de l'hôte afin de s'y établir et de le coloniser. C'est grâce aux propriétés adhésives des fimbriae ainsi qu'à leur spécificité qu'une bactérie peut rapidement cibler un hôte à infecter (Forest et al., 2007; Kolenda et al., 2019).

2.2 Fimbriae chez *S. Typhi*

Bien que les salmonelles possèdent beaucoup de caractéristiques similaires, une des différences est le nombre ainsi que la fonction de ces fimbriae. Comme mentionné plus haut, l'étape d'adhérence assurée par les fimbriae est essentielle lors de la pathogénèse, surtout chez *S. Typhi*. Cependant, les fimbriae ne semblent pas se limiter qu'à cette étape, en ayant un rôle dans l'invasion de l'épithélium intestinal ainsi que dans la formation de biofilms (Chessa et al., 2009) (Weening et al., 2005; Wilson et al., 2008). Au nombre de 14, les multiples fimbriae de *S. Typhi* ont chacun des fonctions particulières, rendant la bactérie efficace lors de l'infection systémique (Yue et al., 2012).

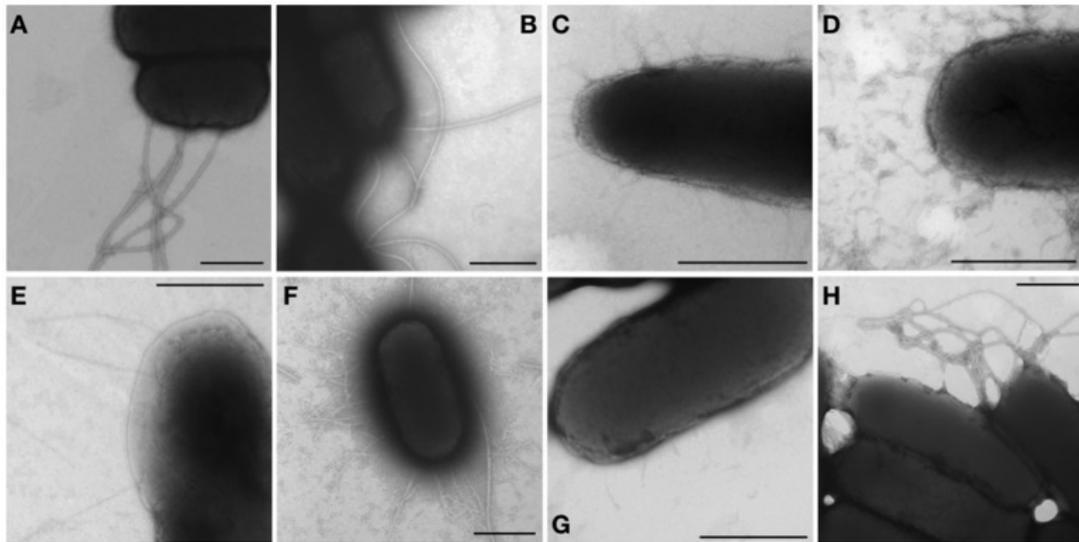


Figure 1. – Fimbriae de *S. Typhi* observés en microscopie électronique.

Tiré de (Dufresne et al., 2018) avec reproduction autorisée sans permission selon une « *creative commons license* ».

Globalement, 12 des fimbriae sont exprimés par la voie « CUP », (*bdf, fim, saf, sef, sta, stb, stc, std, ste, stg, sth* et *tcf*), un fimbriae curli de type agrégatif (*csg*) et un pilus de type IV (*pil*) (Townsend et al., 2001). Huit de ces fimbriae sont aussi retrouvés chez *S. Typhimurium*, comme *Bcf, Fim, Saf, Stb, Stc, Std, Sth* et *Csg*, tandis que cinq sont uniques à *S. Typhi* : *Sef, Sta, Ste, Stg, Tcf* et *Pil*. De plus, 5 fimbriae possèdent un ou des pseudogènes dans leur opéron (*Bcf, Sef,*

Ste, Stg et Sth) empêchant possiblement la formation d'un fimbria fonctionnel (Dufresne et al., 2018). Ces fimbriaes de *Salmonella* Typhi jouent chacun des rôles importants dans la virulence, la figure 2 résume ceux-ci.

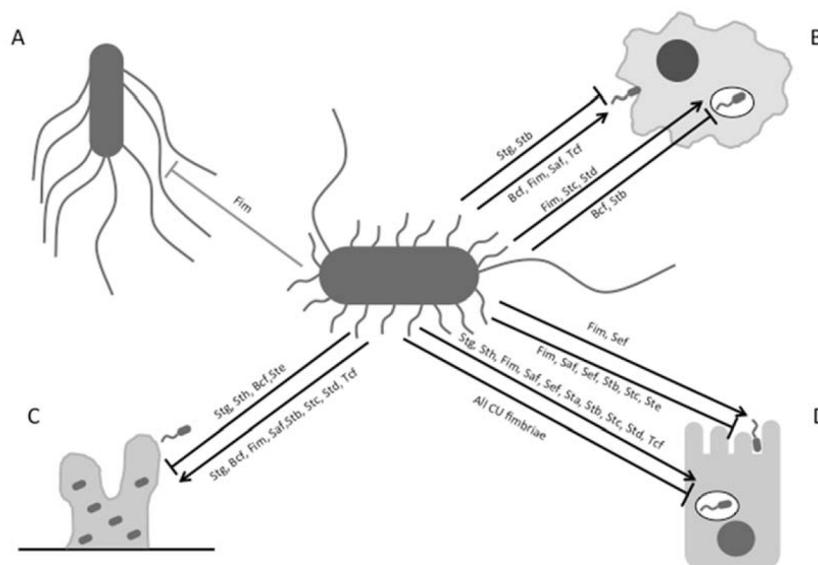


Figure 2 - Fimbriaes de *Salmonella* Typhi et leur rôle dans la virulence.

Tiré de (Dufresne et al., 2018) avec reproduction autorisée sans permission selon une « *creative commons license* ».

2.2.1 Fim

Dans l'étude qui suit, c'est le fimbriae *fim* qui sera étudié. C'est le fimbria le plus étudié chez *Salmonella enterica* dû à la conservation importante de ces gènes. Il a principalement été caractérisé chez *S. Typhimurium*, l'homologue murin de *S. Typhi*. Il est important de noter que ce fimbriae n'est pas homologue à celui d'*E. coli*, n'ayant que des ressemblances au niveau morphologiques (Humphries et al., 2001 ;(Rossolini et al., 1993). Ce fimbriae de type 1 possède plusieurs gènes codant pour des sous-unités ou des gènes de régulation, tel que *fimA*, *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimH*, *fimF*, *fimZ*, *fimY* et *fimW* (Boyd et Hartl, 1999). L'interaction hôte-pathogène est renforcée par la présence des fimbriaes, principalement le fimbria de type 1, celui qui sera principalement discuté dans cette étude. Ce dernier est l'un des prolongements adhésifs

bactériens des plus connus et des plus documenter chez les entérobactéries comme *E. coli* et *Salmonella*, puisqu'ils sont de redoutables facteurs de virulence. Chez ce fimbria, composé principalement de protéines FimA, on retrouve également l'adhésine nommée FimH se retrouvant à l'extrémité du filament protéique, permet la reconnaissance des glycoprotéines de surfaces exprimé par l'hôte, rendant la pathogenèse bactérienne très spécifique (Kolenda et al., 2019).

Sans les gènes *fimA*, *fimF* ou *fimH*, aucun fimbria ne serait produit, ce qui affecterait grandement la capacité d'adhérence et de virulence de la bactérie. Pour ce qui est des autres sous unités, leur caractérisation est encore en évolution. Pour l'instant, on attribue à FimC un rôle de chaperonne et FimD le placier jouant un rôle dans l'assemblage du fimbria. FimI aurait des propriétés influençant la longueur des fimbriae, tandis que FimZ, FimY et FimW ont des rôles dans la régulation.

Certaines recherches effectuées dans notre laboratoire ont permis de déterminer que la chaîne de transport d'électrons et les perturbations de la membrane influencent l'expression de *fim*. En effet, certains régulateurs de la chaîne, comme OxyR et Ndh sont des activateurs de *fim* (Dufresne, 2020). En effet, c'est à l'aide un criblage d'une banque de mutants par insertion de transposon réalisée par Karine Dufresne (Dufresne, 2020), qu'ils ont été identifiés comme étant important dans la modulation de *fim*. Grâce au promoteur de *fim* fusionné avec le gène rapporteur *lacZ*, (*pRS-fim-lacZ*), un criblage sur gélose contenant le substrat X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-galacto-pyranoside) a pu être réalisé. Cette méthode d'identification engendre la formation de colonies de couleurs (blanche, bleues pâles, bleues foncées) qui varient selon l'expression de *fim*.

C'est le mutant 1, présenté sur la figure 3, qui a retenu l'attention avec sa baisse d'expression significative. Après séquençage, il a été déterminé que le gène *ndh*, qui correspond à la NADH déshydrogénase 2 (NDH-II), qui joue un rôle impératif dans la chaîne de transport d'électron afin d'assurer la production d'ATP, qui est un activateur de l'expression du fimbriae *fim* de *S. Typhi*. Le mutant 76, qui démontre une surexpression importante de *fim*, n'a pas été étudié ici, mais fera l'objet d'expériences futures par notre laboratoire.

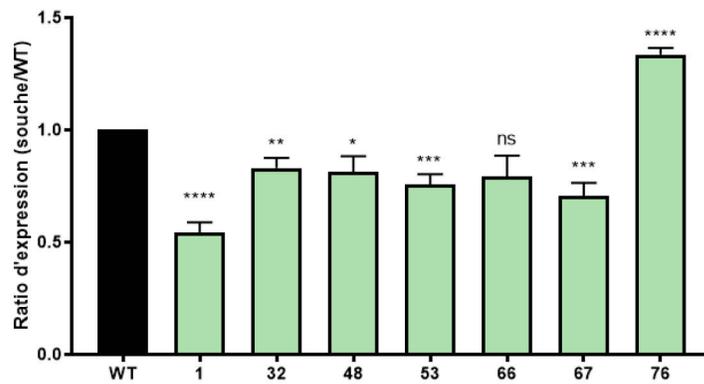


Figure 3. - Identification de régulateurs de *fim* à l'aide d'un criblage par transposon.

L'axe des X correspond au numéro donné aux mutants lors du criblage. L'axe des Y indique de ratio d'expression de *fim* selon un rapport expression du mutant / expression de la souche sauvage.

Adapté de la thèse de Karine Dufresne (Dufresne, 2020)

Comme *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Typhimurium ont des similitudes au niveau de leur génome, il était nécessaire de confirmer si les effets démontrés dans notre laboratoire (Dufresne, 2020) concernant des gènes activateurs connus de *S. Typhi*, soit *oxyR*, *katG*, *yqiC*, *sodB* et de *phoP* étaient bel et bien spécifiques à *Salmonella* Typhi et non généralisé aux autres *Salmonella*. Il n'y a pas d'effet significatif sur l'expression de *fim* lorsque ces gènes sont absents chez *S. Typhimurium* (Fig. 4).

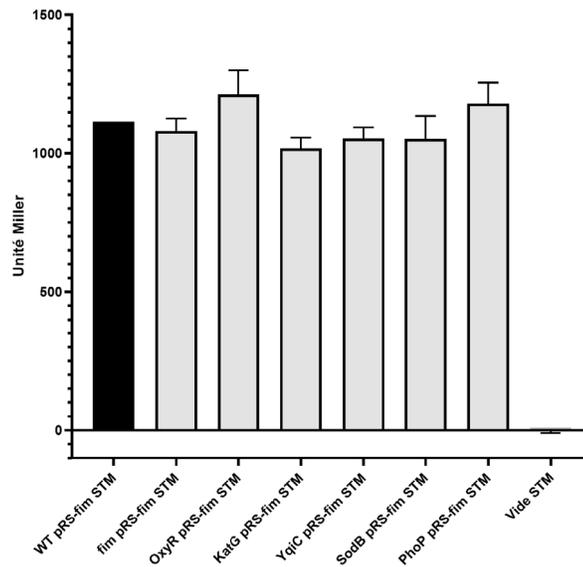


Figure 4. - Expression de *fim* chez *S. Typhimurium*.

Adapté de (Dufresne, 2020)

L'expression de *fim* chez différents mutants mesurés par essais β -galactosidase. Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

3. La respiration cellulaire

La respiration cellulaire est particulière à chaque espèce de bactéries et est différente de celle mitochondriale, en reposant toutefois sur des mécanismes de bases communs, afin de produire de l'adénosine triphosphate (ATP) en quantité suffisante. Toutefois, celle-ci ne se fait pas sans embûches, puisque des stress oxydatifs importants telle la variation du ratio NADH/NAD et la production d'espèces réactives d'oxygènes (ROS) surviennent lors du transfert d'électron d'un complexe à l'autre vers son accepteur final.

3.1 La chaîne de transport d'électron de la mitochondrie

Chez la mitochondrie, globalement, la réaction se résume comme tel : la création d'énergie fonctionne selon l'échange d'électrons par le receveur, ici l'oxygène, qui traverse la chaîne de transport reposant sur cinq complexes enzymatiques : Complexe I – NADH déshydrogénase, Complexe II – Succinate déshydrogénase, Complexe III – Cytochrome bc1, Complexe IV – Cytochrome c oxydase et le Complexe V - ATP synthase (Fig. 5). Sa caractérisation a laissé beaucoup de pistes pour décrire la CTE bactérienne et également découvrir des inhibiteurs de ces mêmes complexes. Plusieurs des inhibiteurs qui seront décrits dans cette section ont tout d'abord été décrits chez la mitochondrie, tel qu'illustré dans la figure 5.

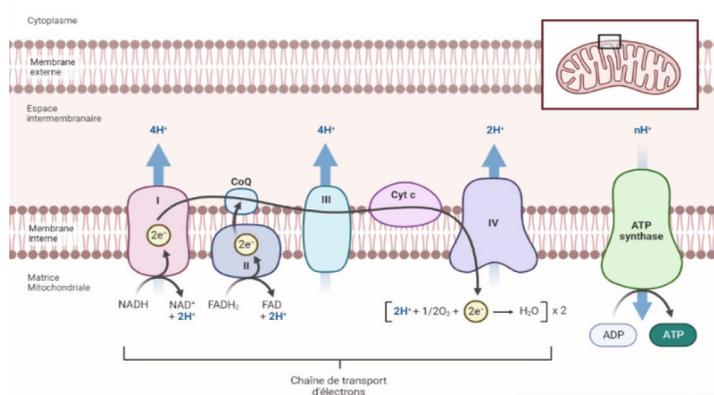


Figure 5. - Chaîne de transport d'électron chez la mitochondrie.

Adapté de (Zhao et al., 2019). Obtenu avec Biorender.

3.2 La chaîne de transport d'électron bactérienne

E. coli est la bactérie la plus utilisée pour faire avancer la recherche, elle est aussi le modèle le plus étudié concernant les mécanismes énergétiques et la régulation de la respiration bactérienne. Comme *Salmonella* fait également partie des entérobactéries, nous estimons que cette régulation est essentiellement similaire dans ces complexes, malgré la diversité et la variabilité possible d'une bactérie à l'autre. En résumé, la chaîne respiratoire est divisée en trois : le complexe NADH déshydrogénase (I et II), le complexe succinate déshydrogénase et le complexe bd1/complexe bo3, tel qu'illustré dans la figure 6. Dans cette dernière, le cytochrome c diffusible est absent. Dans la respiration aérobie, la majeure partie du flux d'électrons est dirigée par la NADH déshydrogénase II et l'oxydase de type bo3, même si la NADH déshydrogénase I (*nuo*) est également fonctionnelle. C'est plutôt dans des situations où la quantité d'oxygène environnementale est limitée que le couplage avec la NADH-I est essentiel (Uندن et Bongaerts, 1997)

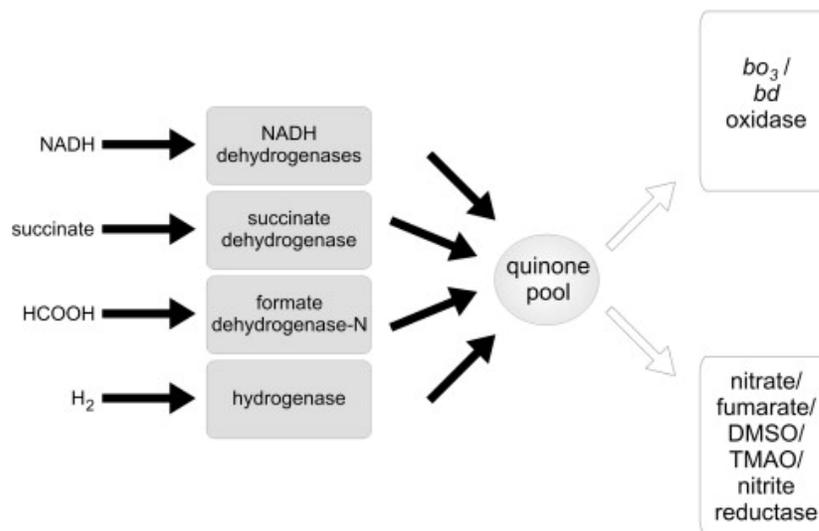


Figure 6. - Transport des électrons chez *E. coli*.

Adapté de (Price et Driessen, 2010).

En résumé, cette chaîne comprend des NADH déshydrogénases qui sont liées à la membrane et des cytochromes oxydases. Les NADH déshydrogénases, NDH-I et NDH- II, oxydent le NADH et assure le transfert des électrons aux quinones et par le coenzyme Q, qui voit son efficacité modulée par YqiC, qui sont ensuite oxydées par des cytochromes oxydases, Cytbo3 (CyoABCD) ou Cytbd-I (CydAB), transmettant des électrons à l'accepteur d'électrons terminal, ici l'oxygène, pour obtenir des molécules d'eau. L'énergie conservée dans la chaîne est convertie en gradients de protons pour alimenter la synthèse d'ATP (Liu et al., 2019).

3.3 La chaîne de transport d'électron de *Salmonella Typhi*

Sachant tout ce que nous savons concernant la CTE mitochondriale et celle bactérienne, il a été possible de décrire la chaîne comme telle, possédant trois grands complexes illustrés sur la figure 7.

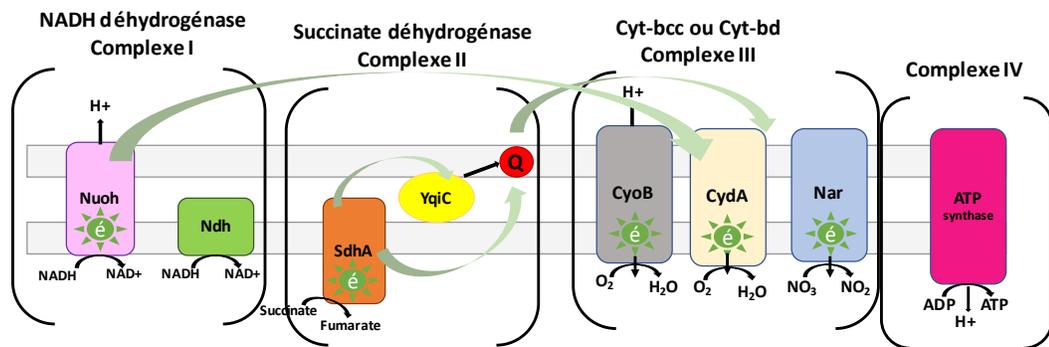


Figure 7. - Chaîne de transport d'électrons chez *S. Typhi*.

Les « é » verts dans une forme de soleil représente les électrons, leurs déplacements dans la membrane suivent les flèches vertes.

Adapté de (Price et Driessen, 2010) 3.3.1 Complexe I – NADH déshydrogénase

Globalement, la première étape de la CTE a pour but d'oxyder les substrats grâce aux coenzymes NADH, qui vont transférer deux électrons à la NADH déshydrogénase, les rendant accessibles aux quinones se retrouvant dans la deuxième étape articulée par le cycle de Krebs. Le complexe, par le biais de Nuo, va pomper, via le changement de conformation du complexe, des protons vers la membrane externe (Yagi et Matsuno-Yagi, 2003).

3.3.1.1 NADH déshydrogénase de type 1 (NADH-I)

Le premier complexe de la chaîne repose sur une NADH déshydrogénase de type I (NADH-I) qui couple l'oxydation du NADH grâce à la force engendrée par le déplacement des électrons dans la membrane. Cette NADH-I est formée du locus Nuo, qui comprend 14 sous-unités (NuoA-N). Cette première étape de la CTE est très similaire à ce que l'on retrouve dans la respiration mitochondriale (Falk-Krzesinski et Wolfe, 1998).

3.3.1.2 NADH déshydrogénase de type 2 (NADH-II)

Bien que présente chez certaines espèces bactériennes seulement, et que son rôle dans la chaîne est mitigé, la NADH déshydrogénase de type II (NADH-II), codé par *ndh* chez *S. Typhi*, est importante dans sa respiration. Comme elle ne se retrouve pas dans la respiration des mammifères, cette déshydrogénase pourrait être une cible thérapeutique lors du traitement de la pathogenèse (Heikal et al., 2014). Contrairement à la NDH-I, Ndh-II ne fonctionne pas grâce à une pompe à proton et se retrouve dans la membrane interne de la bactérie. Elle catalyse la réaction transportant l'oxygène de la phosphorylation oxydative vers le cycle de Krebs (Marreiros et al., 2016).

3.3.1.3 Inhibiteur du complexe I – Roténone

Utilisée à la base comme un pesticide, la roténone est un produit obtenu naturellement des racines de plantes tropicales et subtropicales faisant partie des espèces des *Lonchocarpus* et *Derris*. Due à sa forte toxicité, certains pays européens ont même cessé l'usage de ce produit (Heinz et al., 2017). Toutefois, certains avantages de cette toxicité ont été démontrés, comme sa capacité à affecter la chaîne de transport d'électrons ainsi que l'apoptose des cellules en contact, dû à l'excès de radicaux libres générés par le produit (Gupta, 2014).

Chez les cellules humaines, l'effet n'était pas négligeable non plus, puisque la roténone empêche la formation des microtubules nécessaire pour former le fuseau mitotique pour faire la mitose, soit la division cellulaire des cellules somatiques (Brinkley et al., 1974).

La roténone est un inhibiteur bien connu dans la chaîne de transport mitochondrial, ciblant le complexe I, de la NADH déshydrogénase. Son fonctionnement est très bien décrit chez la mitochondrie, empêchant principalement les protons de pouvoir réintégrer la membrane vers l'ubiquinone, résultant du blocage de la phosphorylation oxydative (Palmer et al., 1968).

3.3.2 Complexe II – Succinate déshydrogénase

Le complexe I, lors de son action de transfert d'électrons, crée en parallèle deux molécules de pyruvate. Elles sont donc converties en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) et elles peuvent passer par le cycle de Krebs et être clivées pour retourner hors de la membrane sous forme de dioxyde de carbone (CO₂). Le rôle principal du complexe II est de catalyser l'oxydation du succinate en fumarate et par le fait même réduire l'ubiquinone dans la membrane. (Maklashina et al., 1998).

3.3.2.1 Succinate déshydrogénase (*SdhA*)

La succinate déshydrogénase est une oxydoréductase qui a pour but de catalyser l'oxydation du succinate en fumarate. Cette enzyme est ubiquitaire, c'est-à-dire qu'on la retrouve dans toutes les cellules aérobiques. L'enzyme FAD (flavine adénine dinucléotide), un cofacteur d'oxydoréduction que l'on retrouve dans le complexe II de la chaîne respiratoire, se lie à *SdhA*,

permettant de transmettre les électrons et les protons à l'ubiquinone, soit la prochaine étape de la CTE (Anraku, 1988).

3.3.2.2 Inhibiteur du complexe II – Oxaloacétate

L'oxaloacétate est principalement un intermédiaire nécessaire dans le cycle de Krebs pour obtenir l'acide citrique, utilisant la citrate synthase comme enzyme. L'oxaloacétate est aussi un inhibiteur du cycle lui-même, lorsqu'en quantité plus élevée que celle nécessaire lors de la formation de l'acide citrique (Krebs et Johnson, 1980). En effet, l'oxaloacétate inhibe un autre intermédiaire du cycle, soit la succinate déshydrogénase, aussi connu comme deuxième complexe de la chaîne de transport d'électron. La régulation de l'activité de ce complexe n'est pas encore très bien détaillée, mais il est évident que l'oxaloacétate empêche l'oxydation du succinate en fumarate et rend alors impossible l'envoi des électrons vers le complexe cytochrome bc 1 (Armstrong et Staples, 2010).

3.3.3 Ubiquinone et métaquinone (YqiC)

Le gène *yqiC* est impliqué dans la synthèse des ubiquinones, comme le coenzyme Q, qui sont nécessaires pour transporter les électrons dans la chaîne vers l'accepteur final (Loiseau et al., 2017) (Garcia-Gutierrez et al., 2016). Aussi appelé UbiK par certains chercheurs, ce facteur est un multirégulateur de *Salmonella*, et impacte également la CTE. En effet, UbiK se lie avec UbiJ pour créer un complexe régulant l'ubiquinone UQ, servant de principal porteur d'électrons dans la respiration aérobie (Unden et Dünwald, 2008). D'autres articles suggèrent qu'YqiC, chez *E. coli* et *Bacillus*, pourrait aussi être impliqué dans la synthèse des métaquinones, qui agissent en tant qu'antioxydants qui réduisent le stress oxydatif comme le feraient des peroxydases et des catalases (Julsing et al., 2007; Kitagawa et al., 2000; Nowicka et Kruk, 2010).

De plus, de récentes recherches indiquent que YqiC régule le fimbriae de type 1, tel que Fim. (Kolenda et al., 2019). Même si elle ne fait pas partie d'un grand complexe, YqiC est très intéressante dans la recherche due à son aspect multifactoriel et son exclusivité chez les bactéries, principalement chez celle anaérobie facultative et Gram+. En effet, elle pourrait être

une cible potentielle dans le développement d'antibactériens thérapeutiques, sans toutefois causer d'effets secondaires néfastes pour les cellules humaines (Paudel et al., 2016).

3.3.4 Complexe III – Complexe cytochrome Cyo

Le cytochrome Cyo est l'oxydase d'ubiquinone principale dans la respiration aérobie chez les entérobactéries comme *E. coli* et *S. Typhi*. Cela serait probablement dû au fait que ce cytochrome ne possède pas de mécanisme de pompes à protons, lui permettant d'utiliser beaucoup plus rapidement l'oxygène (Borisov et al., 2021). Cette enzyme utilise les électrons présents dans la membrane cytoplasmique pour oxyder l'ubiquinone et réduire de 4 électrons de l'oxygène moléculaire en eau (Chepuri et al., 1990). Le complexe Cyo, qui regroupe 5 gènes, *cyoABCDE*, contient deux sites d'attachement pour les quinones, ce qui pourrait être utilisé dans le développement de cibles thérapeutiques (Fisher et al., 2020).

3.3.4.1 Complexe III – Cytochrome bo *CydA*

Le cytochrome bo est une oxydase terminale, qui agit comme une oxydase de quinone, donc couple l'ubiquinone oxydée avec l'oxygène moléculaire réduit. Ce complexe est produit de 4 gènes : *cydA*, *cydB*, *cydC* et *cydD*, qui s'assemblent pour former ce complexe que l'on retrouve dans la membrane interne bactérienne (Guest et al., 2017). Ce sont *cydA* et *cydB* qui codent pour la partie oxydase de cette enzyme (Jünemann, 1997). Plusieurs études suggèrent que chez certaines entérobactéries, tel que *E. coli*, utilisent ce cytochrome dans des situations où l'oxygène est limité. En effet, en condition microaérobie ou anaérobie, *cyoAD* produisent une oxydase avec une grande affinité empêchant l'inhibition de la respiration par manque d'oxygène (Hill et al., 1990).

3.3.4.2 Inhibiteur du complexe III – Antimycine A et KCN

L'antimycine est produit par *Streptomyces* (Nakayama et al., 1956). Ce composé agit principalement comme un antifongique qui induit l'apoptose des cellules. De plus, l'antimycine agit comme un inhibiteur de la chaîne de transport d'électrons, atteignant plus précisément le troisième complexe. En effet, cet antifongique empêche le transfert d'électrons par le cytochrome bc 1. Elle est connue pour se lier au cytochrome c réductase du complexe III dans le but d'inhiber l'oxydation de l'ubiquinone dans la chaîne, ce qui bloque le transfert d'électrons entre les cytochromes b et c (Alexandre et Lehninger, 1984). Cette inhibition a pour conséquence l'augmentation des ROS produits et la diminution d'ATP produite, menant ultimement à l'apoptose cellulaire.

En plus de l'antimycine, un autre composé est bien connu pour affecter la fin de la chaîne, soit le cyanure, un produit toxique, souvent utilisé sous forme de gaz. Dans plusieurs études, le cyanure de potassium (KCN) est une alternative plus facile d'utilisation que la forme gazeuse, ayant les mêmes effets sur le transport. Le cyanure se combine avec le cytochrome oxydase du complexe III, ce qui prévient le transfert des électrons vers l'oxygène accepteur (Nůsková et al., 2010).

3.4 Le stress oxydatif

La réponse au stress est essentielle pour la survie bactérienne. Les effets du stress oxydatif sont très importants sur l'entièreté de l'organisme. En effet, il s'agit de la détérioration des membranes, des macromolécules, y compris l'ADN, l'ARN, des protéines et des lipides, mettant en péril la viabilité cellulaire. Quoique contradictoire au premier abord, il est nécessaire pour un organisme de vivre du stress afin d'assurer sa capacité d'adaptation ainsi que l'amélioration de sa pathogénèse selon les conditions dans lesquels il se retrouve (Riboulet et al., 2007). Bien qu'encore à l'étude, l'effet des ROS semble aussi important pour les organismes non pathogènes comme les bactéries formant le microbiote intestinal humain. En effet, ces bactéries essentielles au bon fonctionnement du système digestif et excréteur de l'hôte, sont aussi en condition de stress oxydatif généré par le métabolisme. Toutefois, ce stress n'affecte pas directement leur régulation, ce qui pourrait suggérer des effets bénéfiques concernant leur apport en nutriment ainsi que la signalisation au cœur de leur environnement (Jones et al., 2012). Lors de la production d'énergie dans la CTE, le NADH permet la production d'ATP, tout en créant des molécules instables et très réactives, soit les ROS. Pourtant, ce sont ces mêmes molécules de NADH ainsi que plusieurs enzymes qui assurent la détoxification de la cellule (Dong et al., 2022). Plusieurs mécanismes de défense sont mis en place par les bactéries dans l'optique de combattre les stress environnementaux tels que le stress oxydatif, ici le ratio NADH/NAD et la détoxification des ROS par les catalases et les peroxydases seront abordés.

3.5 Le ratio NADH/NAD

Tel que mentionné plus haut, le but de la respiration bactérienne est de récolter des électrons à partir de sources de carbone réduites via la NADH déshydrogénase pour générer un gradient de protons, menant à la production d'énergie, l'ATP. Tout au long de ces réactions, les NADH déshydrogénase (NDH-I et NDH-II) produisent des groupements NAD⁺ ainsi qu'un proton (H⁺). Il est possible de faire le ratio entre le nombre de NADH et de NAD produit au terme de la chaîne de transport d'électron. C'est le rapport NADH/NAD⁺ qui est le principal indicateur de l'état métabolique des bactéries, permettant de déterminer le stress exercé sur cette dernière.

. L'inhibition de n'importe laquelle des 4 étapes de la chaîne devrait faire augmenter le nombre de NADH (Bhat et al., 2016). L'homéostasie du NAD(H) est essentielle à la survie des agents pathogènes et représente une cible thérapeutique potentielle pour de nombreuses bactéries comme *E. coli* et *Salmonella*, puisqu'elles sont des bactéries anaérobies facultatives, possédant donc une chaîne de transport d'électrons efficace dans le but d'assurer leur réplication et la production de leur énergie peu importe les conditions dans lesquelles elles se trouvent (Rodionova et al., 2014).

3.5.1 Les espèces réactives d'oxygènes (ROS)

En condition aérobie, l'oxygène, qui passe interagit avec le complexe III, change de conformation vers un oxygène négativement chargé, ce qui crée des molécules qu'on appelle des espèces réactives d'oxygène, contribuant grandement au stress oxydatif d'une cellule. En d'autres termes, les composés générés, principalement l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles ($HO\bullet$) sont très instables et causent des dommages chez les cellules eucaryotes et les bactéries (Karash et al., 2017). La détérioration atteint principalement les macromolécules, y compris l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides, et interfère avec la viabilité cellulaire. Comme la toxicité du H_2O_2 est très élevée, les bactéries se dotent d'enzymes qui piègent et décomposent la molécule afin de toujours maintenir une concentration intracellulaire de l'ordre des nanomoles (Mishra et Imlay, 2012). Pour limiter les impacts, le senseur superoxyde dismutase SodB détecte les anions instables, les transforme en ROS, et stimule les régulateurs de stress oxydatif comme OxyR et SoxRS. Ces régulateurs se lient aux enzymes comme les catalases et les peroxydases pour enclencher leur activation et donc la réduction des ROS en une forme plus stable comme l'eau (H_2O) et l'oxygène (O_2) (Vazquez-Torres et Fang, 2001). Les catalases et les peroxydases sont de loin les plus étudiées quant à la détoxification des ROS, mais depuis tout récemment, des recherches indiquent que certaines des oxydases terminales, comme Cyo et Cyd, faisant partie du complexe III de la chaîne de respiration bactérienne pourraient aussi jouer un rôle important dans la protection contre les ROS (Borisov et al., 2021). En effet, les espèces réactives d'oxygène sont aussi un produit de la respiration aérobie, ils ne sont pas exclusivement produits par l'hôte, donc exogène pour le pathogène. Pour cette raison, les ROS ont souvent été qualifiés de « *double-edged swords of*

life » (Mittler, 2017), c'est-à-dire de couteau à double tranchant de la vie. Un avantage à ce qui semble être un désavantage flagrant pour le pathogène, est la capacité d'adaptation nécessaire pour survivre dans un environnement réactif et dangereux pour sa survie. Les bactéries sont donc en mesure d'exploiter cette toxicité envers l'hôte en créant encore plus d'énergie, faisant des ROS et de ces mécanismes de détoxification une possible cible thérapeutique lors d'infection (Li et al., 2021).

D'autres conditions sont possibles comme la respiration microaérobie et anaérobie. Il faut savoir que toutes les réactions peuvent se produire avec ou sans oxygène. C'est l'accepteur final d'électrons qui se voit changer. Par exemple, lors de la respiration anaérobie chez *S. Typhi*, le nitrate peut agir comme accepteur. Il y aura toujours des résidus de la respiration toxiques comme les ROS et les espèces réactives de nitrate (NOS), faisant référence au stress nitroxydatif. Dans le même ordre d'idée, il existe 3 types d'enzymes détoxifiantes, comme la famille des Nar, qui sont des récepteurs d'électrons alternatifs, qui fonctionnent comme des nitrates réductases, qui ont une pompe à proton qui va transférer les électrons vers le pool de quinone ou au cytochrome dans le but de réduire les NOS produits (Lopez et al., 2015).

Aussi, un autre accepteur final d'électron qui a longtemps été étudié chez *Salmonella Typhimurium* est le tétrathionate, suggérant que la respiration peut très bien se dérouler et être régulée avec les complexes de la CTE présente chez les entérobactéries. *S. Typhimurium* utilise les ROS exogènes de l'hôte lors de l'inflammation intestinale. Les ROS produits convertissent le thiosulfate en tétrathionate, qui peut être utilisé comme accepteur final d'électron par la bactérie lorsque le milieu est pauvre en oxygène, comme le tractus intestinal, cela confère un avantage majeur et accentue ses chances de survie lors d'un processus qui se devait être au détriment de cette dernière (Winter et al., 2010; Bäumlér and Sperandio, 2016). Cela confère d'ailleurs un grand avantage pour les salmonelles lors de l'infection chez l'humain, là où l'oxygène n'est pas toujours disponible (Thiennimitr et al., 2011).

3.5.1.1 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène a été isolé pour la première fois par Thénard en 1818 (Janoff, 1990) et il a été rapidement reconnu que des concentrations élevées de H_2O_2 entraînaient des lésions cellulaires en endommageant des molécules cellulaires importantes comme que l'ADN et les lipides membranaires. Plus les recherches avancèrent, plus on s'est rendu compte que des niveaux élevés de ROS créaient plus d'instabilité génomique menant à la non-viabilité des cellules ou à leur apoptose.

Les ROS endogènes, tels que le peroxyde d'hydrogène, sont considérés depuis longtemps comme des molécules très dommageables à la membrane et à la viabilité de la cellule. Même s'il est dommageable et instable, le peroxyde d'hydrogène se décompose facilement en oxygène et en eau avec dégagement de chaleur, le rendant moins réactif que le radical libre comme O_2^- . Sachant que le superoxyde est rapidement converti en H_2O_2 dans la cellule, nous nous sommes concentrés sur H_2O_2 comme principal ROS dans nos expériences.

Au cours de la phosphorylation oxydative et du transfert d'énergie le long de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie, 1 à 5% des électrons s'échappent des complexes I et III, formant prématurément du superoxyde en présence d'oxygène, (St-Pierre et al., 2002) pouvant causer des dommages importants à la cellule et à celles qui l'entourent. Ce phénomène est très similaire chez la bactérie, formant principalement du peroxyde d'hydrogène lors de l'activité du complexe I. Cependant, le danger chez la bactérie se voit diminuer grâce aux diverses méthodes de détoxification qu'elle a mise en place comme la superoxyde dismutase, les peroxydases, les catalases, etc. la protégeant des dommages cellulaires causés par les ROS qu'elle produit elle-même (Gough et Cotter, 2011).

3.5.1.2 *t*-BHP

Le *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) est un peroxyde organique qui peut être métabolisé en radicaux libres, comme les ROS, et qui affecte l'intégrité et la stabilité cellulaire. En effet, ce type de radicaux va enclencher l'oxydation des lipides des cellules, surtout chez le foie, créant une toxicité importante chez les hépatocytes. Il est souvent utilisé comme un modèle de stress

oxydatif dû à cet effet chez le foie pour étudier les mécanismes de détoxification (Wang et al., 2017).

3.6 La détoxification du stress oxydatif

Le peroxyde d'hydrogène endogène produit par les superoxydes dismutases (SodB) et tout le peroxyde d'hydrogène exogène à proximité immédiate de bactérie se diffuse à travers des bicouches lipidiques et est aussi transporté par les aquaporines dans le cytosol. Lorsque ces ROS sont rencontrés à l'intérieur de la cellule, des enzymes cytoplasmiques comme les 3 catalases (KatE, KatG, et KatN) et les 3 peroxydases (AhpC, Tpx, et TsaA), dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (M. Rhen, 2019).

3.6.1 Superoxyde dismutase

Dans les années 80, le stress oxydatif est au cœur des recherches scientifiques, ce qui a permis la découverte des superoxydes dismutases (SOD). Ces enzymes catalysent spécifiquement la dismutation des radicaux superoxydes comme O_2^- en H_2O_2 et O_2 dits moléculaires, donc beaucoup plus stables que l'anion, signifiant une réaction chimique où une molécule joue à la fois le rôle d'oxydant et de réducteur. En somme, il a été démontré que les SOD protégeaient les cellules contre les effets nocifs des ROS en les mettant sous forme plus stable, pouvant facilement être détoxifiés par les enzymes mises en place par la bactérie dans son évolution (Hassan, 1988; Miller, 2012).

3.6.2 Senseur de peroxyde d'hydrogène

Afin de déterminer à quel instant activer ces enzymes détoxifiantes, la bactérie s'est dotée d'un senseur de peroxyde d'hydrogène, nommé OxyR qui va induire l'expression de différentes protéines, comme des catalases et des peroxydases (Gyan et al., 2006).

C'est la forme oxydée, mais non réduite d'OxyR qui va activer la transcription des gènes codant pour des protéines enzymatiques, en envoyant un signal de stress oxydatif à l'ARN polymérase (Mikael Rhen, 2019; Storz et al., 1990). Le senseur se voit rapidement interpellé alors qu'il ne faut qu'une concentration 0,1 μ M de peroxyde d'hydrogène présent dans la bactérie pour oxyder

la protéine. Des études approfondies sur le rôle de OxyR dans la régulation et la détoxification du stress oxydatif ont permis également d'établir que chez *S. Typhi*, OxyR régule positivement l'expression du gène codant pour l'antigène capsule Vi, et ce, de manière directe (Zhang et al., 2018).

3.6.3 Les catalases

Les catalases sont des enzymes antioxydantes, qui réduisent le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire, dans le but de stabiliser la cellule qui est affectée par le stress oxydatif. À des concentrations plus faibles d' H_2O_2 , il est possible d'utiliser un autre donneur d'électrons que le peroxyde (Hillar et al., 2000). Ces enzymes sont présentes dans tous les organismes faisant de la respiration pour assurer sa survie, on les retrouve autant chez les eucaryotes que les procaryotes (Lenton, 2003). Très souvent on les nomme Cat ou Kat dans le jargon protéique. Dans le domaine bactérien, chez *E. coli* par exemple, on retrouve deux catalases distinctes, qui sont aussi retrouvées chez *S. Typhi*, soit KatE et KatG (Liu et Kokare, 2017; Panek et O'Brian, 2004). Ces catalases sont distinctes l'une de l'autre, en effet KatE est une enzyme monofonctionnelle, alors que KatG est bifonctionnelle (Loewen et Switala, 1986). En d'autres termes, KatE agit uniquement à titre de catalase alors que KatG possède les fonctions de catalase et de peroxydase à fois. Dans ce qui suivra, nous considérons KatG principalement comme une catalase, puisqu'elle est la première à agir dans la détoxification du stress oxydatif. KatE fait partie du régulon de RpoS (Loewen, 1984; Zheng et al., 2001) alors que KatG est dépendante du senseur de stress oxydatif OxyR qui a été vu plus haut (Morgan et al., 1986; Zheng et al., 2001).

Ces deux enzymes partagent la capacité de détoxifier la cellule et ce rôle s'illustre principalement lorsque la concentration de peroxyde se situe dans les millimolaires, car elles n'ont pas nécessairement besoin d'un réducteur pour agir. Cette caractéristique apporte à la bactérie un grand avantage évolutif, lui permettant de « s'auto-détoxifier » sans dépendre de la disponibilité d'un facteur extérieur. En bref, elles sont capables d'agir rapidement et efficacement lors de vagues plus importantes de stress oxydatif, comme on peut en retrouver lors des étapes de la pathogenèse (Hébrard et al., 2009; Seaver et Imlay, 2001).

Des recherches ont permis la découverte d'une troisième catalase présente chez *S. Typhi*, soit KatN. Dû à la redondance des catalases et de l'activité des peroxydases présentes chez *S. Typhi*, la bactérie est capable de compenser même lorsqu'on l'empêche d'utiliser une ou plusieurs enzymes détoxifiantes (Robbe-Saule et al., 2001) ;(Mishra et Imlay, 2012)

3.6.4 Les peroxydases

Les peroxydases, aussi nommées peroxirédoxines, se divisent principalement en deux catégories, celle avec un groupement thiol et celle qui n'en possède pas. Toutes les peroxirédoxines contiennent une cystéine peroxydatique conservée qui réagit avec le H₂O₂ ou des hydroperoxydes organiques et forme une cystéine acide sulfénique. Le résidu d'acide sulfénique réagit ensuite avec un autre thiol et forme un pont disulfure avant d'être réduit en thiol libre. Des variations dans le mécanisme de régénération des thiols et dans l'architecture de la protéine permettent de classer les peroxyrédoxines en deux groupes présents chez *Salmonella Typhi* : les alkylhydroperoxyde réductases (AhpCF), les thiols peroxydases (Tpx), (Mishra et Imlay, 2012)

L'alkylhydroperoxyde réductase AhpCF est un système composé de deux protéines cytoplasmiques. Ce système a été isolé de *Salmonella Typhimurium* en 1989 et a été caractérisé comme un membre important du régulon de stress OxyR (Jacobson et al., 1989; Seaver et Imlay, 2001); Zhang et al., 2018). La présence d'AhpC a été documentée dans environ 3000 espèces bactériennes. Son rôle dans la capture du peroxyde d'hydrogène s'est concrétisé lorsqu'il a été prouvé que son système, AhpCF et les deux catalases KatE/KatG doivent être obligatoirement retirés du génome pour empêcher la détoxification chez *E. coli* (Seaver et Imlay, 2001).

La thiol peroxydase Tpx a été découverte pour la première fois comme un facteur dans les lysats de cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, permettant protéger la glutamine synthétase de la toxicité du H₂O₂ (Chae et al., 1994). Toutefois, cette découverte n'indiquait pas la localisation cellulaire des thiols peroxydases. En effet, Tpx a été isolé pour la première fois chez *E. coli* après un choc osmotique; il semblait probable pour les chercheurs, qu'il s'agisse davantage d'une protéine périplasmique (Cha et al., 1995) et en tant que telle, elle pourrait sembler avoir une fonction distincte de celle du système Ahp cytoplasmique. Toutefois, la présence d'homologues

de Tpx dans les bactéries Gram positives suggère que sa localisation est bel et bien cytoplasmique.

Une autre thiol peroxydase, thiol-spécifique antioxydant (TSA), a été identifiée en 1988 chez la levure. Elle a été reconnue comme une enzyme qui pouvait protéger la glutamine synthétase de l'oxydation produite par l'exposition soit au dithiothreitol ou au Fe^{2+} et à l' O_2 (Kim et al., 1988). La caractérisation de TSA a été plus difficile chez les bactéries puisqu'elle ne fonctionnait que dans les extraits cellulaires, car elle était capable d'employer le dithiothréitol comme donneur d'électrons artificiel. Cette expérience avec un donneur d'électrons que l'on ne retrouvait pas habituellement dans l'environnement bactérien a permis d'identifier plus tard d'autres peroxydases à l'aide d'approche biochimique similaire.

Avec les années, d'autres peroxirédoxines ont été identifiées, laissant croire que ces enzymes pourraient être plus répandues que la catalase (Kat), qui elle, est pratiquement exprimée dans toutes les bactéries (Mishra et Imlay, 2012).

3.7 La détoxification du stress oxydatif chez *S. Typhi*

En bref, si l'on se base sur le modèle *E. coli*, il a été démontré que les catalases utilisées pour dégrader le peroxyde d'hydrogène in vivo sont KatG et KatN ainsi que la peroxydase AhpCF. À l'aide de ces données, il a été possible de déterminer que chez *Salmonella Typhi*, on dénombre trois catalases (KatE, KatG et KatN) ainsi que trois peroxydases (AhpC, TsaA et TpX) (Borisov et al., 2021). Respectivement, le rôle de ces enzymes antioxydantes est la dégradation ou de la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Marín-García, 2014). Chez plusieurs bactéries, KatG et AhpC sont les médiateurs clés pour la réduction de peroxyde d'hydrogène lors de la respiration, sans quoi OxyR s'active pour stimuler les autres catalases et peroxydases présentes (Wan et al., 2021).

Problématique

La bactérie *Salmonella enterica* sérovar Typhi est l'agent responsable de la fièvre typhoïde chez le genre humain. Cette bactérie possède plusieurs facteurs de virulence y compris 14 fimbriae. Les fimbriae sont des structures protéiques que l'on retrouve à la surface de certaines bactéries. Cette particularité est très avantageuse pour ces bactéries puisqu'elle leur confère plusieurs atouts dans la virulence de ces bactéries comme l'adhésion spécifique aux cellules, la formation de biofilm, etc. Nous avons démontré l'importance du fimbriae *fim* dans plusieurs étapes de la pathogenèse comme l'adhésion aux cellules, lui permettant de mieux résister aux stress.

Puisque que plusieurs facteurs impliqués dans la chaîne de transport d'électrons (CTE) influencent l'expression du fimbriae *fim*, tel que Nuo et Ndh, des NADH déshydrogénase (NDH-I et NDH-II), des facteurs majeurs de la respiration aérobie chez les bactéries qui régite l'équilibre entre le NADH et NAD. Aussi, YqiC, un super-régulateur chez *Salmonella* a été identifié comme activateur du fimbriae Fim. De plus, la CTE produit dans son activité des espèces réactives d'oxygène qui influence la régulation de *fim*. Chez *Salmonella*, comme chez plusieurs bactéries, des mécanismes efficaces de détoxification sont mis en place. Parmi ceux-ci on retrouve des senseurs de stress, des antioxydants, des catalases et des peroxydases. Ceux-ci seront aussi au cœur de nos expériences afin de mieux comprendre la CTE.

Notre hypothèse est que la CTE joue un rôle dans l'expression de Fim. Pour ce faire, nous voulons déterminer si la chaîne de transport d'électron régule l'expression du fimbriae *fim* de façon directe ou indirecte. Notre but était de déterminer: le rôle des membres de la CTE; l'effet du stress oxydatif; et le rôle de l'accepteur final d'électron.

Matériel et méthodes

Souches et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont énumérés et décrits au tableau 1. Les souches étaient cultivées sur milieu Luria-Bertani (LB) (LB bouillon ou LB agar) et incubées à 37°C, sauf indications contraires. Les bouillons étaient incubés avec ou sans agitation et à différentes concentrations d'oxygène. Les géloses ou les bouillons étaient supplémentés d'un antibiotique si nécessaire selon les concentrations suivantes : ampicilline 100 µg/mL et chloramphénicol 34 µg/mL. Des suppléments de KNO₃ à 40 mM ont été ajoutés pour changer l'accepteur d'électron de notre chaîne de transport d'électron (ETC) Des suppléments de H₂O₂ à 5 µM, 50 µM, 1 mM et 2 mM ou de *t*-BHP de 50 µM ont été ajoutés pour simuler un stress oxydatif.

La souche clinique ISP1820 fut isolée au début des années 1980 dans la ville de Santiago au Chili. À partir de cette souche, notre laboratoire a créé des mutants tels que *fim*, *oxyR*, *sodB*, *yqiC*, *nuoH*, *ndh*, ainsi que les mutants peroxydases (*ahpC*, *tpX*, *tsaA*) et un mutant catalase (*katG*).

Tableau 1. – Souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude

Souche ou plasmide	Nom	Caractéristique et résistance	Source ou référence
S. Typhi			
DEF1045	WT	ISP1820 wild-type	R. Curtiss III, U. Florida
DEF154	Δfim	ISP1820 $\Delta fimAICDHFZYXW$ Ampiciline	(Dufresne et al, 2018)
DEF1153	pRS vide (ori pBR322)	WT(pRS415) Ampiciline	(Dufresne et al, 2018)
DEF1160	pRS <i>fim</i> (ori pBR322)	WT (pSIF474) Ampiciline	(Daigle, U.Montréal)
PSIF004	pMEG375 (ori R6K)	Vecteur suicide Ampiciline Chloramphénicol	R. Curtiss III, U. Florida
TRASH44	STY1251	ISP1820 <i>ndh::Tn10</i> (pSIF519) Chloramphénicol	(Dufresne et al, 2020)
TRASH73	STY2552	ISP1820 <i>nuoh::Tn10</i> Ampiciline	(Dufresne et al, 2020)
DEF1265	Δfim /pRS <i>fim</i>	Δfim (pSIF474) Ampiciline	(Dufresne et al, 2020)
DEF1530	$\Delta oxyR$ /pRS <i>fim</i>	$\Delta oxyR$ (pSIF474) Ampiciline	(Dufresne et al, 2020)
DEF1345	$\Delta fimZ$ /pRS <i>fim</i>	$\Delta fimZ$ (pSIF474) Ampiciline	(Dufresne et al, 2020)

DEF1346	<i>ΔfimY/pRSfim</i>	<i>ΔfimY</i> (pSIF474) Ampiciline	(Dufresne et al, 2020)
DEF1347	<i>ΔfimYZ/pRSfim</i>	<i>ΔfimYZ</i> (pSIF474) Ampiciline	(Dufresne et al, 2020)
DEF1350	<i>ΔyqiC/pRSfim</i>	<i>ΔyqiC</i> (pSIF474) Ampiciline	(Dufresne et al, 2020)
DEF1818	<i>ΔkatG/pRSfim</i>	<i>ΔkatG</i> (pSIF474) Ampiciline	Cette étude
DEF1819	<i>ΔsodB/pRSfim</i>	<i>ΔsodB</i> (pSIF474) Ampiciline	Cette étude
DEF1912	<i>ΔahpC/pRSfim</i>	<i>ΔahpC</i> (pSIF474) Ampiciline	Cette étude
DEF1913	<i>ΔtsaA/pRSfim</i>	<i>ΔtsaA</i> (pSIF474) Ampiciline	Cette étude
DEF1927	<i>Δtpx/pRSfim</i>	<i>Δtpx</i> (pSIF474) Ampiciline	Cette étude
DEF1921	<i>ΔahpCTsaA/pRSfim</i>	<i>ΔahpCTsaA</i> (pSIF474) Ampiciline	Cette étude
DEF1922	<i>ΔKatGAhpC/pRSfim</i>	<i>ΔKatGAhpC</i> (pSIF474) Ampiciline	Cette étude
DEF1923	<i>ΔKatGTsaA/pRSfim</i>	<i>ΔKatGTsaA</i> (pSIF474) Ampiciline	Cette étude

Mutagenèse par la méthode d'échange allélique

Pour étudier les joueurs directs et indirects de la chaîne de transport d'électron de *S. Typhi*, nous avons supprimé ces gènes du chromosome de la souche ISP1820. La méthode de mutagenèse par échange allélique a permis de retirer le gène de façon non-polaire, n'engendrant aucune différence quant à l'expression des gènes l'entourant. En effet, la délétion du gène s'est faite par des multiples de 3 (codons), dans le but de ne pas changer le cadre de lecture, n'altérant pas l'expression des gènes faits en aval.

Brièvement, la méthode consiste à faire deux réactions PCR avec des amorces F1-R2 et F3-R4 dans le but d'amplifier les séquences spécifiques encadrant le gène. Ces fragments de PCR sont fusionnés par une 3^e réaction de PCR (F1-R4). Ce fragment contient la séquence avec le gène délété (allèle mutant), qui sera cloné dans un vecteur suicide pMEG375 (Curtiss III, U. Florida) et inséré dans la souche *E. coli* X7213 (Kaniga, 1998 ; Daigle, 2008). L'allèle mutant sera transféré par conjugaison bactérienne chez la souche de *S. Typhi* receveuse et le vecteur suicide ne fera plus partie du génome, car il est retiré lors de la contre-sélection sur sucrose des mutants. Les informations détaillées sont décrites dans cette publication (Forest, 2007) et un exemple du processus est mis en annexe (page 96)

Chaque mutation a été validée par PCR afin de visualiser la présence de l'opéron tronqué et de s'assurer que l'opéron sauvage était absent du chromosome.

Aussi, une vérification par amplification par PCR du gène *VexA* (un gène unique à *S. Typhi*) a été réalisée afin de s'assurer qu'il s'agit bien d'une souche de *S. Typhi* ne possédant plus le gène en question.

Électroporation chez *S. Typhi*

Nous avons introduit le plasmide libre pRS-fim, dont le nombre de copies est de 15 à 20 (Simons et al., 1987), qui contient le promoteur du fimbriae *fim* couplé au gène rapporteur *lacZ*, chez les mutants de *S. Typhi* par électroporation. Les bactéries étaient cultivées de nuit à 37°C sur des géloses d'agar LB ou en agitation dans du milieu liquide LB. L'ampicilline 100 µg/ml a été

ajoutée au milieu. La transformation des bactéries a été réalisée selon la méthode d'électroporation dans *S. Typhi* (O'Callaghan et Charbit, 1990).

Essai d'activité β -galactosidase

L'expression du promoteur *fim* dans différentes souches a été mesurée par des essais d'activité β -galactosidase tel que décrit par Miller en 1972 (Miller, 1972). Des cultures de nuit de 18 h dans le milieu liquide LB avec ou sans agitation à 37°C ont été lysées et le substrat o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) a été ajouté. La densité optique à 420 et 550 nm a été prise et utilisée pour calculer les unités Miller. Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins trois différents inoculums de culture opérés en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0.05$ (*), déterminés par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

Sensibilité aux espèces réactives d'oxygènes (peroxyde d'hydrogène)

La concentration minimale d'inhibition (CMI) au peroxyde d'hydrogène fut calculée à l'aide de cultures de nuit dans le milieu liquide LB avec agitation à 37°C. Les cultures ont été diluées dans une plaque 96 puits contenant du milieu frais et de la supplémentation de peroxyde d'hydrogène de concentration allant de 16 mM à 31,25 μ M. Les plaques ont été incubées 24 h à 37°C puis la densité optique à 600 nm a été prise avec le spectramax pro 7 (VWR). Pour observer la sensibilité au peroxyde d'hydrogène chez les mutants d'intérêts, nous avons mesuré des diamètres d'inhibition. Cette méthode, de diffusion sur gélose (Boyer et al., 2002), nécessitait de nouvelles cultures de nuit dans le milieu liquide LB avec agitation à 37°C. Elles ont été diluées 1/100 pour être inoculées dans du milieu LB frais jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne 0,6. Ensuite, 100 μ l de chaque culture a été ajouté à 3 mL d'agar mou 0,7% et ajouté sur gélose LB agar. Le disque de papier 6 mm, contenant 10 μ l de la CMI de peroxyde d'hydrogène, fut placé sur la gélose. Les géloses ont été incubées de nuit à 37°C et par la suite le diamètre des zones d'inhibitions a été mesuré (Wan et al., 2021). Les données ont été réalisées en triplicatas techniques et les résultats sont présentés en annexe (page 99).

Résultats

1. Rôle de la chaîne de transport d'électrons

1.1 Mutagenèse des joueurs clés de la chaîne de transport d'électron de la bactérie *S. Typhi* ISP1820

Nous avons démontré que la régulation de *fim* était modulée par certains joueurs de la chaîne de transport d'électron. Afin de caractériser si l'effet est direct ou indirect, une mutation de ces gènes est généralement nécessaire. Nous avons sélectionné les joueurs clés de la CTE de *S. Typhi* avec pour but de supprimer ces gènes, tel que : *oxyR*, *sodB*, *nuoH*, *ndh*, *yqiC*, *tsaA*, *ahpC*, *tpx* et *katG*.

Certains d'entre eux étaient déjà disponibles dans la banque de notre laboratoire, pour les autres, une méthode de mutagenèse par échange allélique fut effectuée. Chaque mutation a été validée par PCR afin de visualiser la présence du gène tronqué et de s'assurer que le gène sauvage était absent du chromosome. Les amorces créées pour ce faire se retrouvent dans le tableau 2. Par la suite, un plasmide portant le promoteur de *fim* fusionné avec le gène rapporteur *lacZ*, (*pRS-fim-lacZ*) a été ajouté par électroporation dans les mutants pour comparer l'activité du gène *fim* dans les souches.

Tableau 2. - Amorces utilisées dans cette étude

Amorces	Séquence
Fim_Prom_F_Long_EcoRI	AGGAATTCCTTCAAGTCAAAGGGGATAACGCT
lacZ alpha R	GGCTGCGCAACTGTTGGG
VEXA.F2283	AAT ACC GTT CAG GTG CCT TAT GC
VEXA.R2711	ATG TTT CCC CTG AAC ACC TGC TGC
TsaA F1	cgggatccTGATTGTCAAGACCGCATTG
TsaA R2	TGTTACGACACGGGCAAACAAAAGTGAAG
TsaA F3	TTTGCCCGTGTCTGTAACATCGACGAAATG
TsaA R4	gctctagaCGAGGTGGTTCATAATACCTCAC
TpX F1	cgggatccACGCGGCTTGCTACAAATAG
TpX R2	TCGTCAAGCTATTGGCTGAGGGAAACGTC
TpX F3	CAGCCAATAGCTTGACGAAAACGACAAC
TpX R4	gctctagaGCTGGGGGTTTTCCATAGAC
AhpC F1	cgggatccAAACGCATTAGCCGAATCAG
AhpC R2	AGGTCAGACGTCTGGGCAAACAAAGGTAAA
AhpC F3	TTGCCCGACGTCTGACCTGCTGCGTAAAA
AhpC R4	gctctagaACGTCAGAGTAAGGCGGCTA

1.2 Effet de la quantité d'oxygène disponible dans le milieu de croissance

Sachant que *S. Typhi* est une bactérie anaérobie facultative, il est possible d'observer sa croissance en condition oxique, microoxique ainsi qu'anoxique. Ces conditions représentent soit la présence totale, la présence partielle ou l'absence d'oxygène. Nous avons sélectionné ces conditions, car elles sont rencontrées lors de l'invasion chez l'hôte infecté et parce que l'oxygène agit comme accepteur final d'électron dans la chaîne de transport d'électron de *S. Typhi*. L'expression du fimbria Fim a été évaluée dans différentes conditions d'accessibilité à l'oxygène. En comparant les résultats sur la souche sauvage seulement, et l'effet de la quantité d'oxygène, on remarque que c'est dans la condition aérobie que *fim* est le plus exprimé. La concentration d'oxygène est alors proportionnelle à l'expression de ce fimbria.

Lors de la croissance dans un bouillon LB riche en oxygène, l'expression de *fim* est significativement diminuée chez les mutants *oxyR*, *ahpC*, *ndh*, *yqiC* et *tsaA*, ce qui suggère des activateurs de *fim*, alors que l'expression de *fim* est significativement augmentée chez les mutants *sodB* et *katG*, suggérant qu'ils sont des inhibiteurs de *fim* (Fig. 8). Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les mutants *nuoH* et *tpx*. La croissance dans un bouillon LB modéré en oxygène, ne provoque qu'une expression significative, à la baisse, seulement chez *oxyR*, suggérant un activateur de *fim* (Fig. 9). La croissance dans un bouillon LB sans oxygène, provoque l'expression à la baisse du mutant *ndh* (Fig. 10).

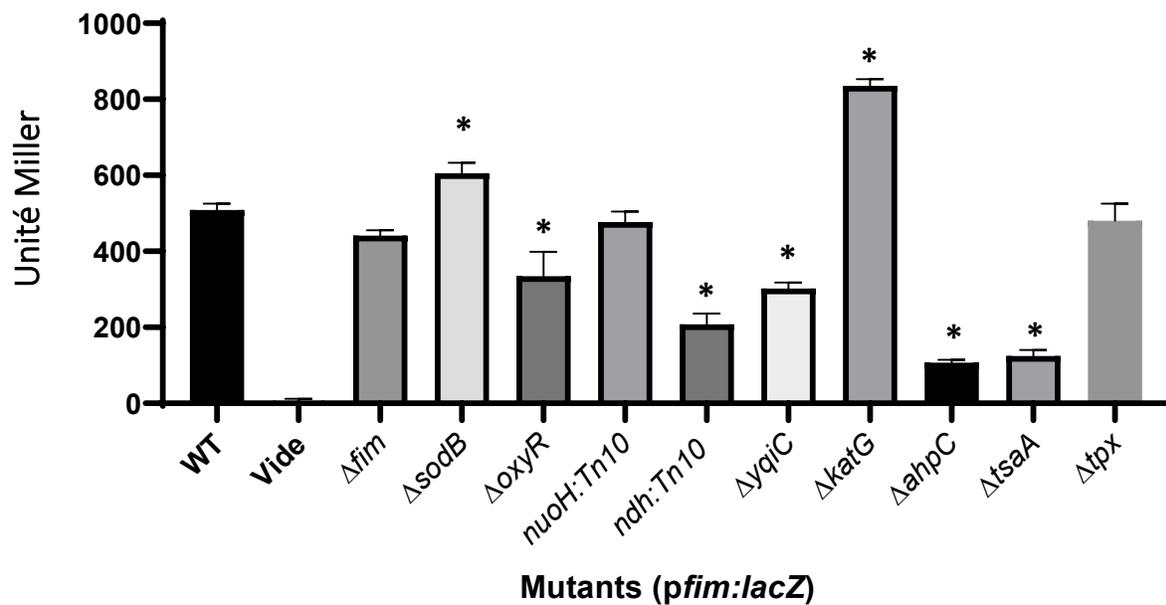


Figure 8. - Expression de *fim* chez différents mutants en condition de croissance normale; aérobie à 37°C.

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

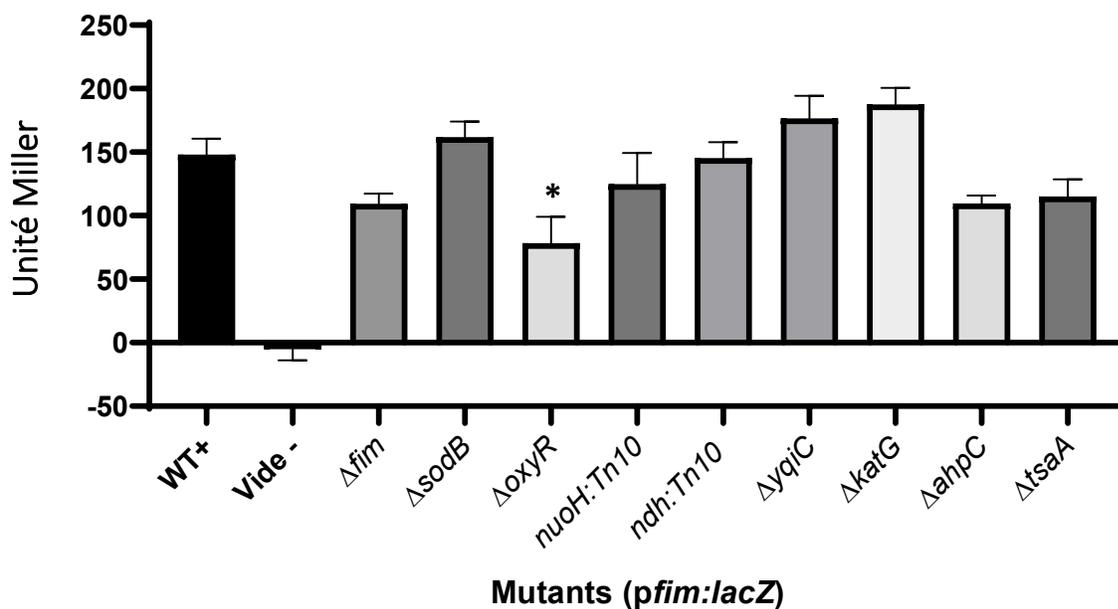


Figure 9. - Expression de *fim* chez différents mutants en conditions de croissance microaérobie à 37°C

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

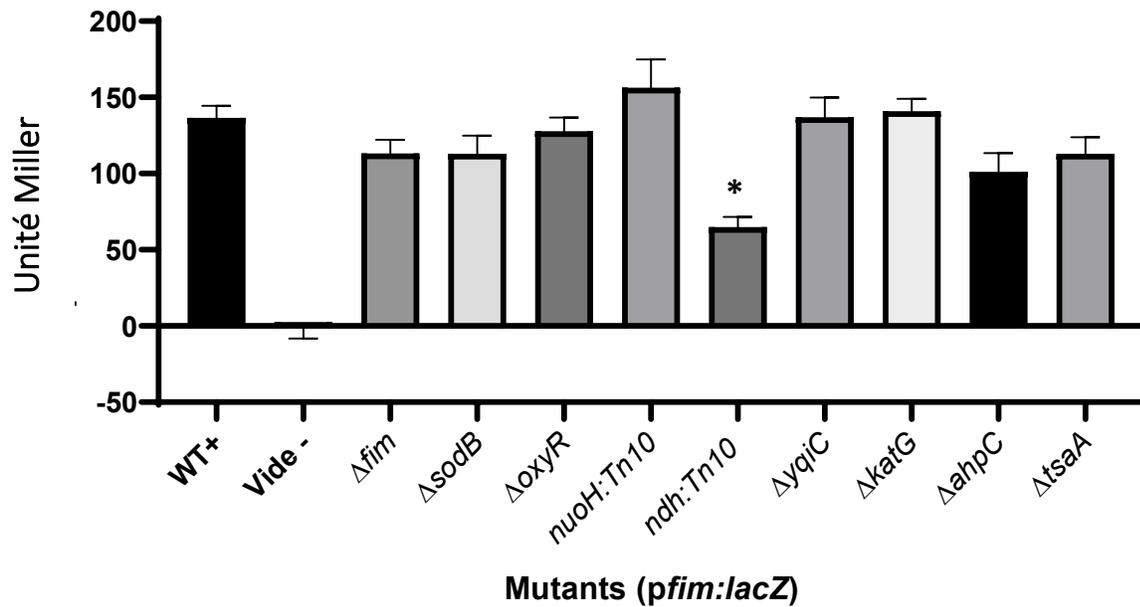


Figure 10. - Expression de *fim* chez différents mutants en conditions de croissance anaérobie à 37°C

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

Comme mentionné dans l'introduction, la première étape de la CTE a pour but d'oxyder les substrats grâce aux coenzymes NADH, qui vont transférer deux électrons à la NADH déshydrogénase, les rendant accessibles aux quinones se retrouvant dans la deuxième étape articulée par le cycle de Krebs. Le complexe, par le biais de Nuo, va pomper, via le changement de conformation du complexe, des protons vers la membrane externe (Yagi et Matsuno-Yagi, 2003).

Ce premier complexe repose sur une NADH déshydrogénase de type I (NDH-I) qui couple l'oxydation du NADH grâce à la force engendrée par le déplacement des électrons dans la membrane. Cette NDH-I est représentée dans nos expériences par *nuoH*. Chez certaines bactéries, comme *S. Typhi*, il existe la NADH déshydrogénase de type II (NDH-II), qui est aussi importante dans sa respiration. Contrairement à la NADH-I, *ndh* ne fonctionne pas grâce à une pompe à proton et se retrouve dans la membrane interne de la bactérie.

La protéine encodée par le gène *ndh*, associé à la NDH-II, s'est avéré être un activateur significatif de *fim*, autant en condition aérobie qu'anaérobie. Afin de déterminer si son effet était spécifique aux fimbriae Fim, nous avons évalué l'expression de différents fimbriae, tels que *stb* et *std*, afin de déterminer si c'était un effet de la mutation ou bien un effet spécifique à *fim*. Un plasmide comportant le promoteur fimbriaire en fusion avec le gène rapporteur *lacZ* a été introduit chez le mutant *ndh* par électroporation. La croissance dans un bouillon LB du mutant *ndh* avec le promoteur de différents fimbriae induit seulement l'expression de *fim*. Cela confirme que seul *fim* est affecté par la mutation dans *ndh* (Fig. 11).

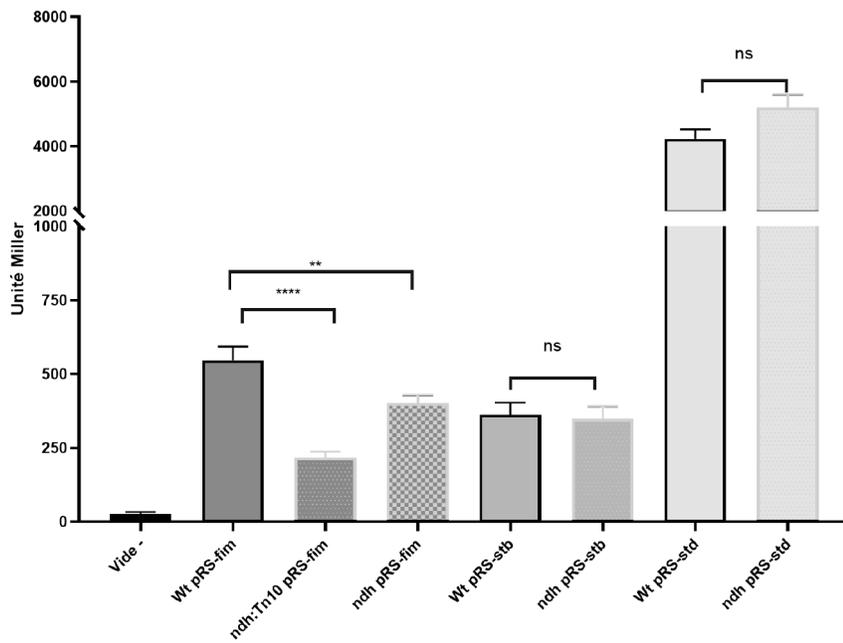


Figure 11. - Expression de différents fimbriae chez le mutant *ndh*

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

Rôle de l'accepteur d'électrons

L'expression de *fim* a été évaluée en offrant un autre accepteur final d'électrons. Sachant que *S. Typhi* est une bactérie ayant la capacité d'utiliser d'autre accepteur que l'oxygène, nous avons décidé d'ajouter du nitrate à une concentration finale de 40 mM.

Le nitrate de potassium a été choisi comme accepteur alternatif d'électron, car il est connu de la littérature puisqu'il se retrouve dans la nature et aussi dans le corps, car le microbiote en produit (Stuehr et al., 1991; Tenopoulou et Doulias, 2020). Ce supplément n'a pas d'effet sur la croissance de *S. Typhi*.

La croissance dans un bouillon LB avec oxygène et avec le nitrate comme accepteur final réprime significativement l'expression de *fim* chez les mutants *ndh*, *yqiC*, *ahpC* et *tsaA*, qui codent pour des activateurs de *fim*. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les mutants *sodB*, *oxyR*, *nuoH* et *tpx* (Fig. 12).

La croissance dans un bouillon LB sans oxygène et avec le nitrate comme accepteur final réprime significativement l'expression de *fim* chez les mutants *nuoH* et *ahpC*, qui codent pour des activateurs de *fim*. Les mutants *oxyR* et *tsaA* indiquent ici une surexpression de *fim*. Pour le mutant de la peroxydase TsaA, le profil d'expression de *fim* se voit complètement inversé. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les mutants *sodB*, *ndh*, *yqiC* et *katG* (Fig. 13). Les résultats concernant le *tpx* ne sont pas affichés puisque l'expérience n'a pas été réalisée sur ce mutant, faute de temps. Il serait intéressant de le mettre dans ces conditions, puisque lorsque l'on compare le milieu avec oxygène et nitrate avec celui-ci, on se rend compte que *oxyR*, *nuoH* et *yqiC* ont un profil d'expression complètement différent. Il sera donc pertinent de vérifier si c'en est de même pour *tpx*.

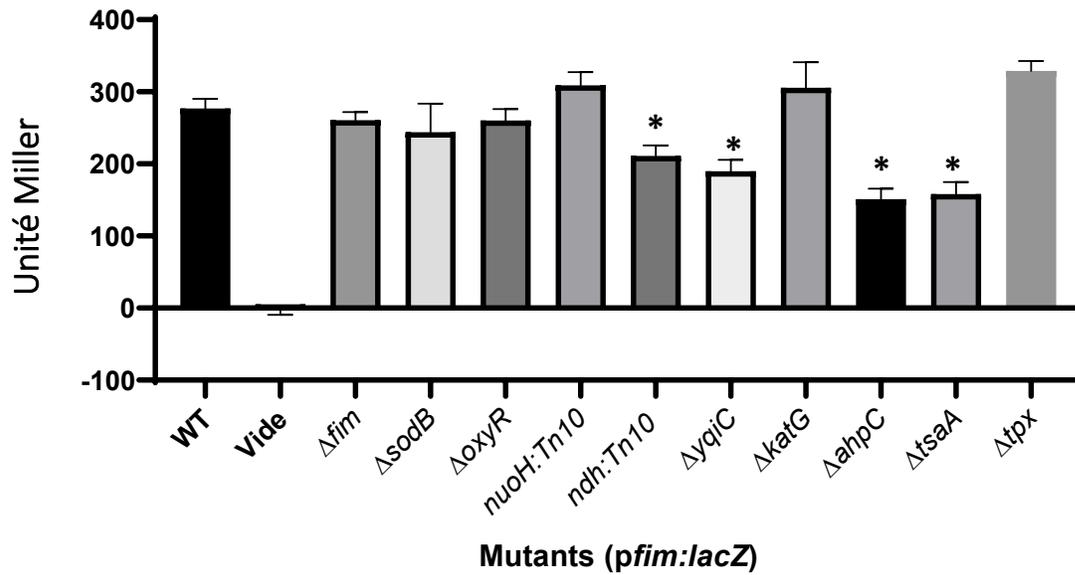


Figure 12. - Expression de *fim* en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de KNO₃ 40mM

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

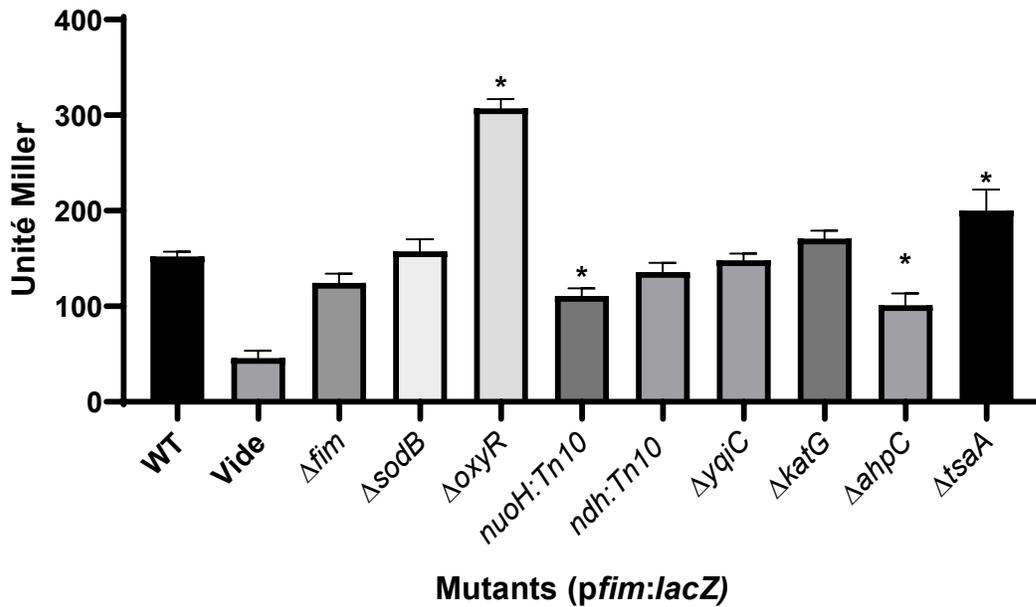


Figure 13. - Expression de *fim* en condition anaérobie 37°C avec ajout de KNO₃ 40mM

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

Rôle du stress oxydatif

Sachant que *S. Typhi* est une bactérie qui rencontre beaucoup de stress oxydatif, comme le peroxyde d'hydrogène lors de l'infection de son hôte, nous voulions déterminer sa capacité à détoxifier son milieu et conserver sa capacité d'expression dans différentes conditions. Tout comme le peroxyde d'hydrogène, le *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP), est un type de stress oxydatif que l'on peut retrouver lors de l'infection de l'hôte (Alía et al., 2005).

Nous avons donc décidé de modifier notre choix de stress afin de déterminer lequel influence plus l'expression de *fim* de *S. Typhi*, entre le H₂O₂ et le *t*-BHP. Des essais pour ces deux sources de stress (Alía et al., 2005; Zhao et al., 2017) étant efficaces à 50 µM, nous avons choisi cette concentration pour réaliser nos expérimentations.

La croissance dans un bouillon LB avec du peroxyde réprime l'expression de *fim* chez les mutants *oxyR*, *nuoH*, *ndh*, *yqiC* et *ahpC*. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les mutants *sodB*, *katG*, *tsaA* et *tpx* (Fig. 14).

La croissance dans un bouillon LB avec oxygène et avec le *t*-BHP réprime significativement l'expression de *fim* chez le mutant *yqiC*, tandis que l'expression est augmentée significativement chez le mutant *oxyR*. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les mutants *sodB*, *nuoH*, *ndh*, *katG*, *tsaA*, *ahpC* et *tpx* (Fig. 15).

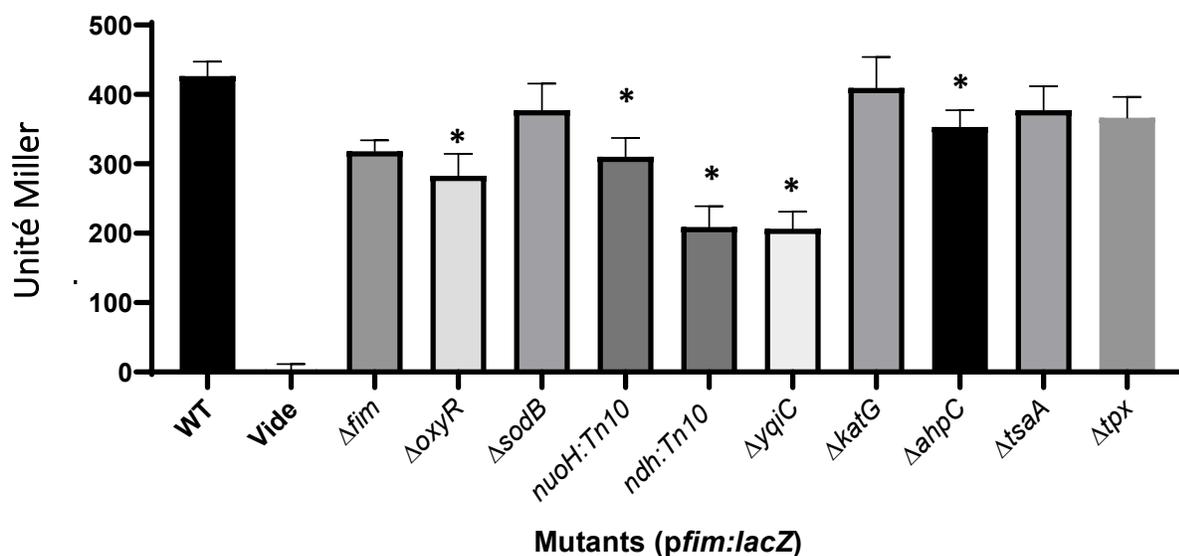


Figure 14. - Expression de *fim* en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de H₂O₂ 50 μM

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

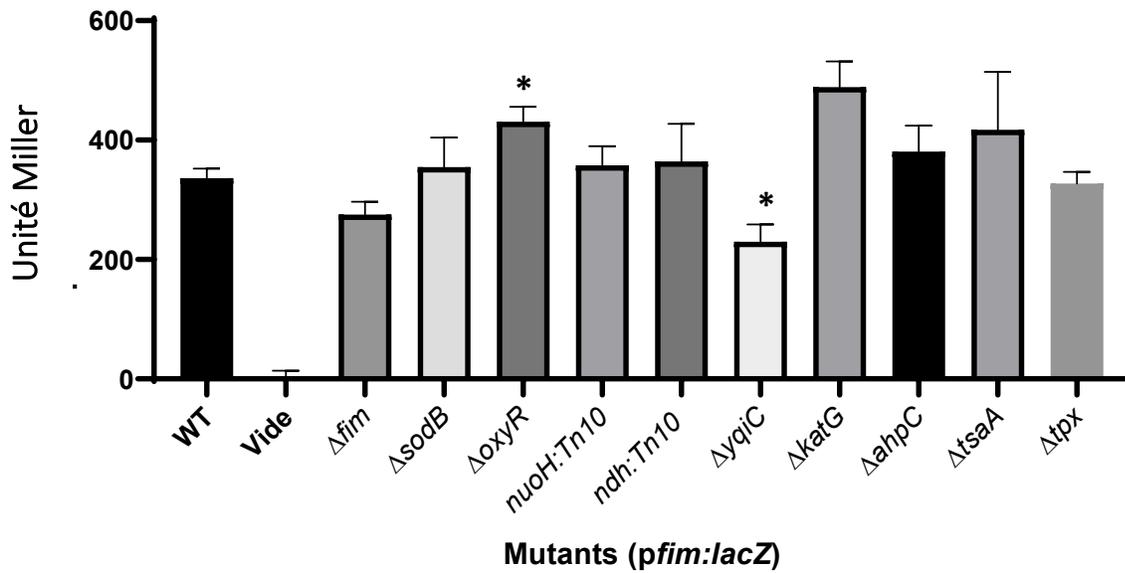


Figure 15. - Expression de *fim* en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de *t*-BHP 50 μM. Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminés par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

3.1 Rôle de la durée d'exposition au stress oxydatif

Comme les résultats étaient très similaires entre la condition sans stress, versus celle avec le stress oxydatif généré par le *t*-BHP, nous avons porté notre attention plus particulièrement sur le H₂O₂. Les faibles concentrations étudiées sont 5 µM et 50 µM. Pour les fortes concentrations, nous avons déterminé que 3 mM était la concentration inhibitrice minimale (CMI) à ne pas dépasser puisqu'après une croissance de nuit, il n'y avait plus de bactérie viable, nous laissant avec un bouillon translucide. Donc, nous avons fait nos expériences avec des concentrations fortes de 1 mM et 2 mM. Le temps d'exposition au stress a été évalué par l'ajout du supplément pendant la culture de nuit, ou par un traitement choc où l'ajout du supplément se faisait lorsque la culture avait atteint la concentration bactérienne désirée, durant un temps précis de 30 minutes.

3.1.1 Effet de l'exposition pendant la croissance

La croissance dans un bouillon LB avec supplément de peroxyde d'hydrogène à 5 µM provoque significativement la diminution de l'expression de *fim* chez le mutant *ndh*. Plus on ajoute une forte concentration de peroxyde, l'expression de *fim* chez la souche sauvage se voit légèrement s'éloigner du taux d'expression sans peroxyde. Bien que la croissance bactérienne ne soit pas significativement atteinte par le stress oxydatif, on peut voir une corrélation négative entre l'ajout et l'expression de *fim*. Aucune différence du niveau d'expression de *fim* n'est observée chez les mutants *oxyR*, *sodB*, *nuoH*, *ndh*, *katG*, *tsaA*, *ahpC* et *yqiC* (Fig. 16). La croissance dans un bouillon LB avec du peroxyde à 50 µM réprime l'expression de *fim* chez les mutants *oxyR*, *nuoH*, *ndh*, *yqiC* et *ahpC*. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les mutants *sodB*, *katG*, *tsaA* et *tpx* (Fig. 14). La croissance dans un bouillon LB avec supplément de peroxyde d'hydrogène à 1 mM provoque la répression de l'expression de *fim* chez le mutant *ndh* et la surexpression chez les mutants *sodB* et *katG*. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les mutants *oxyR*, *nuoH*, *tsaA*, *ahpC* et *yqiC* (Fig. 17). La croissance dans un bouillon LB avec supplément de peroxyde d'hydrogène à 2 mM provoque la répression de l'expression de *fim* chez le mutant *ndh*. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les mutants *oxyR*, *sodB*, *nuoH*, *ndh*, *katG*, *tsaA*, *ahpC* et *yqiC* (Fig. 18).

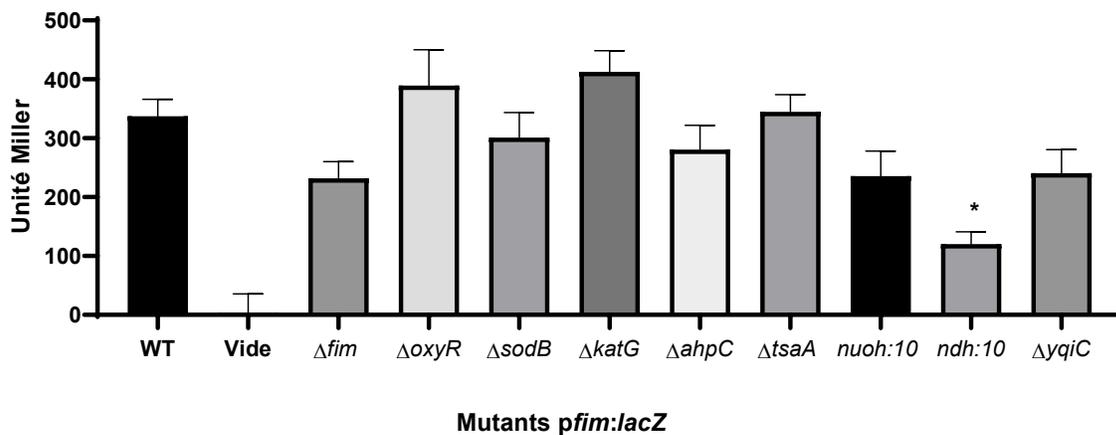


Figure 16 - Expression de *fim* en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de peroxyde d'hydrogène à 5 μ M.

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

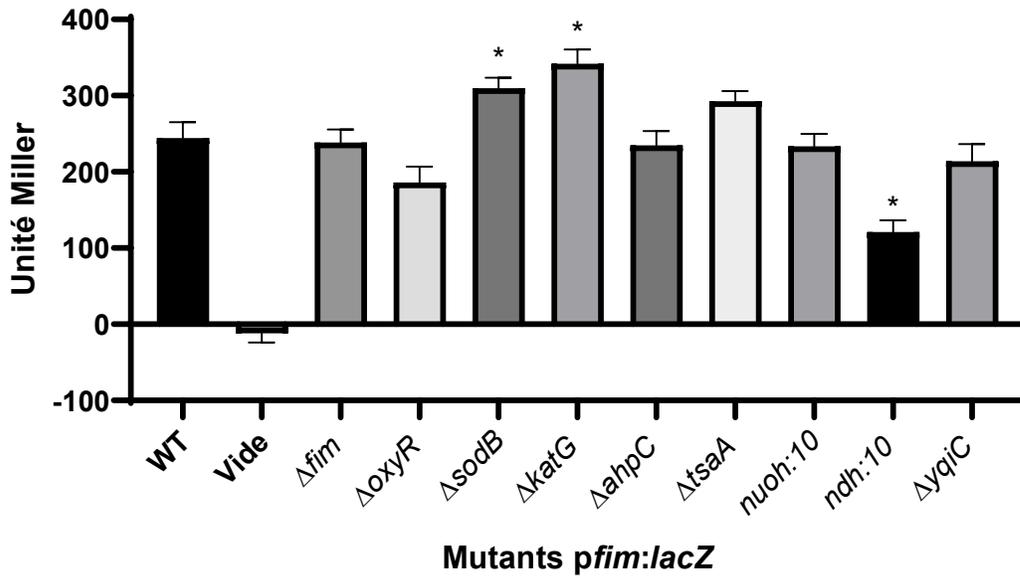


Figure 17 - Expression de *fim* en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de peroxyde d'hydrogène à 1mM.

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

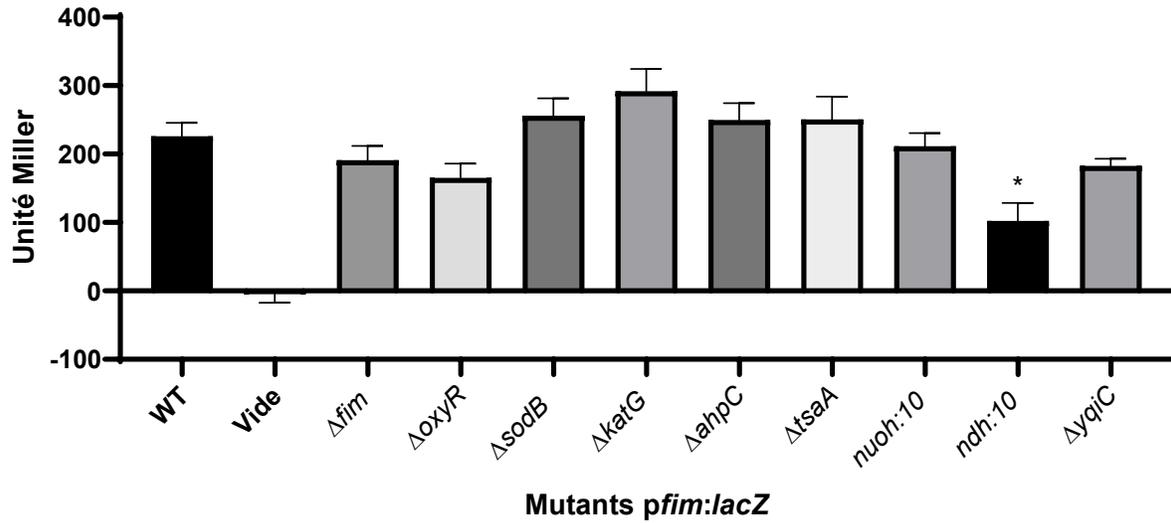


Figure 18 - Expression de *fim* en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de peroxyde d'hydrogène à 2 mM.

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0.05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

3.1.2 Effet lors d'un traitement choc

Après avoir évalué l'expression des différents gènes en croissance de nuit avec du peroxyde, nous avons décidé d'observer l'expression après un choc à forte concentration, comme celle pouvant être rencontrée chez l'hôte lorsque l'infection persiste. Notre choix s'est donc arrêté à une exposition de 30 minutes à la concentration de 1 mM, puisque la différence entre la densité optique mesurée à 600 nm pour la croissance de nuit à 1 mM et 2 mM n'était pas significativement différente, les deux se situant entre 0,7 et 0,9.

La croissance dans un bouillon LB avec supplément de peroxyde d'hydrogène à 1 mM durant 30 minutes réprime significativement l'expression de *fim* chez le mutant *nuoH* et augmente à la hausse chez le mutant *yqiC*. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les mutants *oxyR*, *sodB*, *ndh*, *katG*, *tsaA* et *ahpC* (Fig. 19).

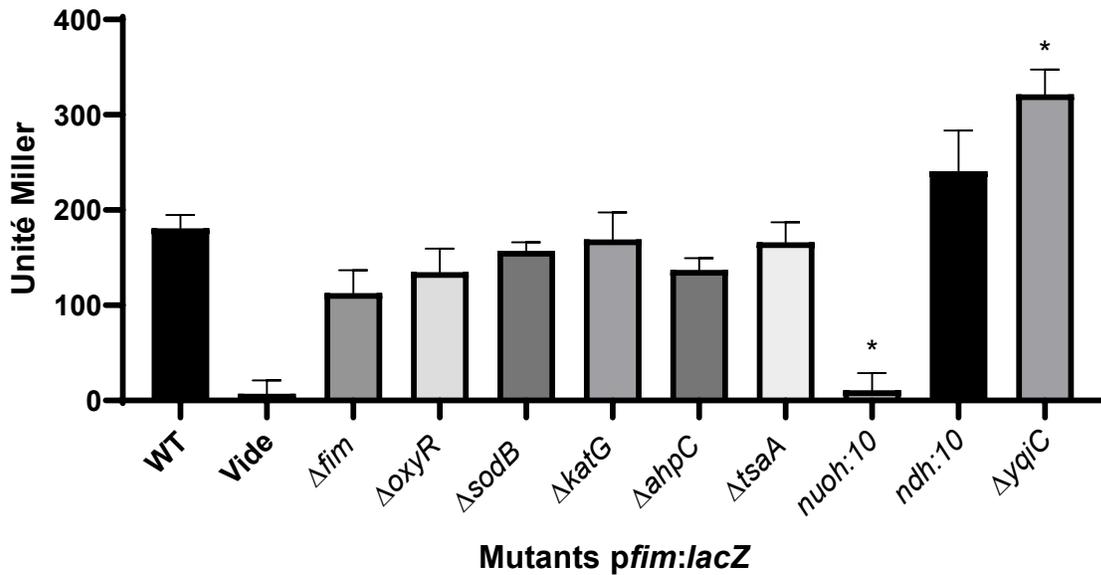


Figure 19 - Expression de *fim* en condition normale (aérobie 37°C) avec un choc oxydatif de 1 mM durant 30 minutes.

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

Doubles mutants

Comme plusieurs gènes peuvent coder pour des peroxydases et des catalases, et qu'ils sont considérés comme redondants (Hébrard et al., 2009) c'est-à-dire que plusieurs gènes peuvent jouer un rôle similaire, nous avons décidé de déterminer si la perte de plusieurs gènes en même temps avait un effet sur l'expression de la bactérie. Pour ce faire, nous avons construit les doubles mutants *katG/tsaA*, *katG/ahpC* et *ahpC/tsaA*.

Dans le but de déterminer l'effet de ces doubles mutants, nous avons fait nos expériences en conditions normales pour des fins comparatives avec la souche sauvage et nos contrôles. Ensuite, une fois ces données obtenues, nous avons testé les différentes conditions de stress oxydatifs qui avaient été significatives chez notre catalase *katG* et nos peroxydases *ahpC* et *tsaA*. Ces concentrations sont 50 μ M (faible) et 2 mM (forte).

La croissance dans un bouillon LB provoque significativement l'expression à la hausse de *fim* chez le double mutant *katG/tsaA*. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les autres doubles mutants, *katG/ahpC* et *ahpC/tsaA* (Fig.20). Pourtant, lorsque nous avons fait nos premières expériences avec les simples mutants *katG*, *ahpC* et *tsaA*, ceux-ci avaient des patrons d'expression chez *fim* très différents (Fig.8). En effet, *katG* présentait une forte surexpression de *fim*, alors que les peroxydases *ahpC* et *tsaA*, une répression significative de l'expression de *fim*.

La croissance dans un bouillon LB avec induction d'un stress oxydatif (faible ou fort) ne provoque pas d'expression différente de la souche sauvage chez les doubles mutants. Leur niveau d'expression reste le même que leur double mutant respectif en condition normale (Fig. 21).

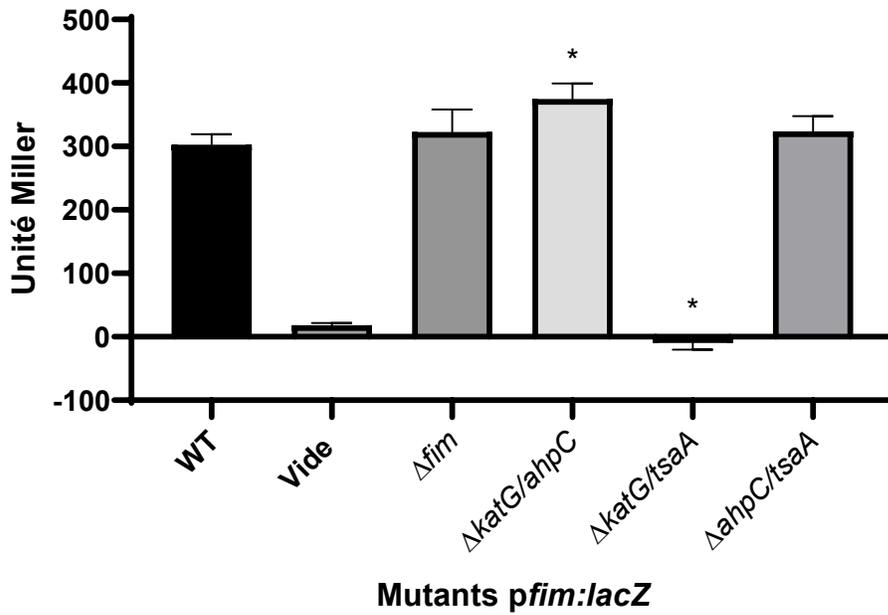


Figure 20 - Expression de *fim* chez les doubles mutants de catalase et peroxydase en condition normale (aérobie 37°C).

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

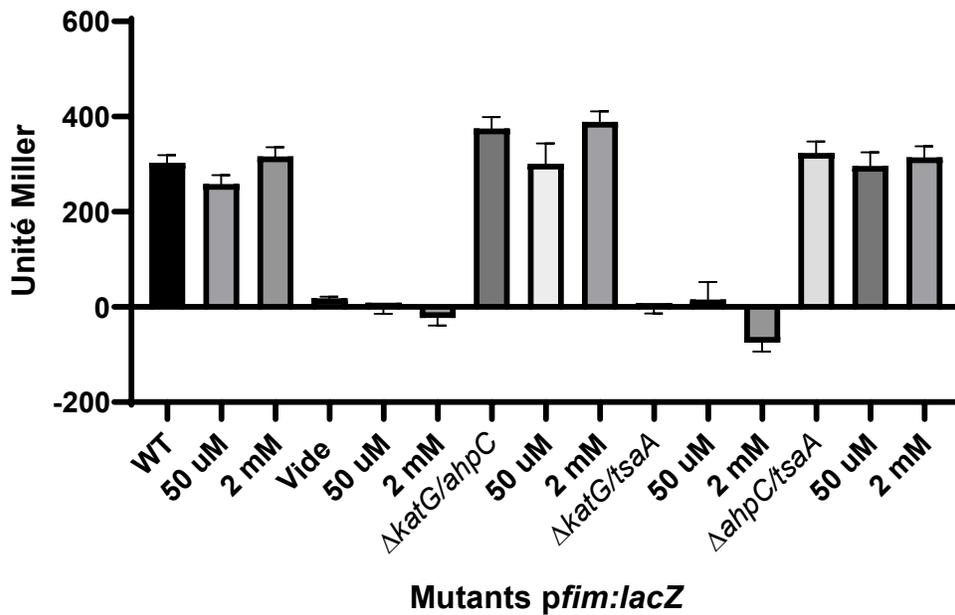


Figure 21 - Expression de *fim* chez les doubles mutants de catalase et peroxydase en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de peroxyde d'hydrogène à faible (50 μM) et forte (2 mM) concentration.

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

Rôle des complexes de la chaîne de transport d'électrons

La roténone est un inhibiteur bien connu de la chaîne de transport d'électron mitochondrial, ciblant la NADH déshydrogénase du complexe I en empêchant les protons de pouvoir réintégrer la membrane vers l'ubiquinone, résultant du blocage de la phosphorylation oxydative (Palmer et al., 1968). Nous avons utilisé la roténone dans nos expériences pour cibler le complexe I de la CTE. Chez *S. Typhi* les gènes *nuoH* et *ndh* représentent les joueurs du complexe I, NADH déshydrogénase.

La croissance dans un bouillon LB avec supplément de roténone à 140 mM réprime significativement l'expression de *fim* chez les mutants *nuoH* et *ndh*. L'ajout de roténone ne modifie pas significativement l'expression chez la souche sauvage, puisqu'en condition aérobie sans ajout, l'expression de *fim* se situe aux alentours de 400 (Fig.10), ce qui est similaire à l'expression observée ici (Fig.21). Cela nous prouve l'efficacité de l'inhibiteur choisi quant au complexe I de la CTE. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les autres mutants *oxyR*, *sodB*, *katG*, *ahpC*, *tsaA* et *yqiC*, qui eux, ne font pas partie du complexe ciblé (Fig. 22).

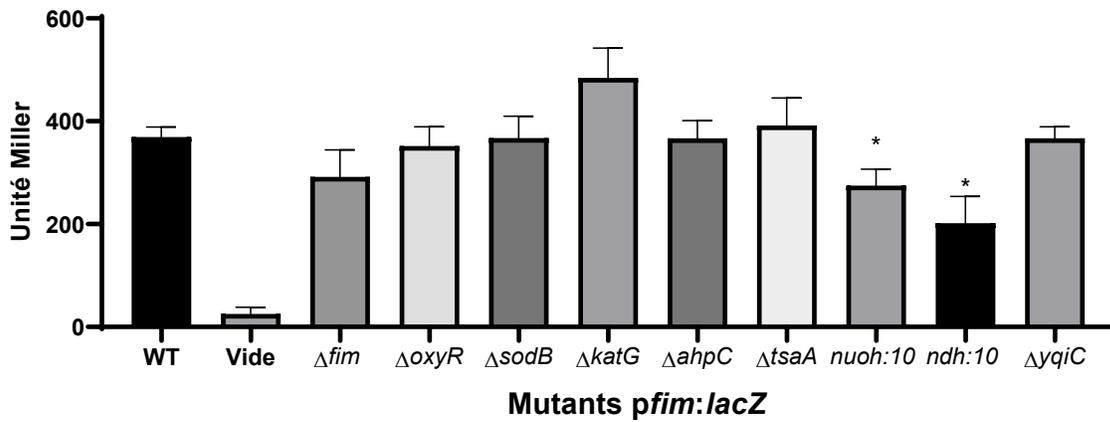


Figure 22 - Expression de *fim* en condition normale (aérobie 37°C) avec ajout de roténone à 140 mM.

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* est utilisé comme un contrôle interne.

Discussion

Salmonella Typhi possède plusieurs facteurs de virulence y compris 14 fimbriae. Les fimbriae sont des structures protéiques que l'on retrouve à la surface de certaines bactéries. Cette particularité est très avantageuse pour ces bactéries puisqu'elle leur confère plusieurs atouts dans la virulence chez l'humain. Les fimbriae sont donc au cœur de plusieurs études, afin de trouver des cibles thérapeutiques pouvant être efficaces contre l'infection. Certains vaccins existent déjà, mais ne sont pas efficaces chez une population vivant au quotidien avec la bactérie dans leur environnement.

Le but de ce projet était de mieux connaître la relation entre le fimbria *fim* de *Salmonella* Typhi et la chaîne de transport d'électrons (CTE). Ainsi, la caractérisation des joueurs clés de la chaîne était essentielle, autant en conditions normales qu'en conditions de stress rencontrées chez son hôte.

Les objectifs étaient de mieux comprendre la spécificité des gènes régulant l'expression de *fim* chez *S. Typhi*, l'effet d'un milieu avec des variations de la quantité d'oxygène, le rôle de l'accepteur d'électrons dans la CTE, le rôle du stress oxydatif, sous différentes intensités, ainsi que le rôle de la durée de l'exposition à ce stress. Finalement, le rôle des gènes détoxifiants le stress oxydatif et les différents complexes formant la chaîne ont été étudiés.

1. Rôle de la chaîne de transport d'électrons

1.1 Mutagenèse des joueurs clés de la chaîne de transport d'électrons de la bactérie *S. Typhi* ISP1820

La création par mutagenèse de nouveaux mutants était essentielle pour élucider le rôle de la chaîne de transport d'électrons de *Salmonella Typhi* dans la régulation de *fim*. Les joueurs clés ciblés sont présentés dans la figure 23.

Nous avons déjà les mutants *oxyR*, *sodB*, *nuoH*, *ndh*, *yqiC* et *ahpC* (Dufresne, 2020). Nous avons pour objectif de créer les peroxydases *ahpC*, *tsaA*, *tpx*, les catalases *katN* et *katE*, et les autres complexes de la CTE SdhA, CyoB et CydA. Toutefois, nous avons réussi à obtenir seulement les mutants des peroxydases. Nous avons donc orienté le reste des expériences sur le rôle de celles-ci et de la catalase majeure KatG. Nous avons également porté une attention particulière au complexe I fonctionnel de la CTE. Les autres gènes mentionnés ici restent toujours d'intérêt, dans l'optique de mieux comprendre la pathogenèse de *Salmonella Typhi*.

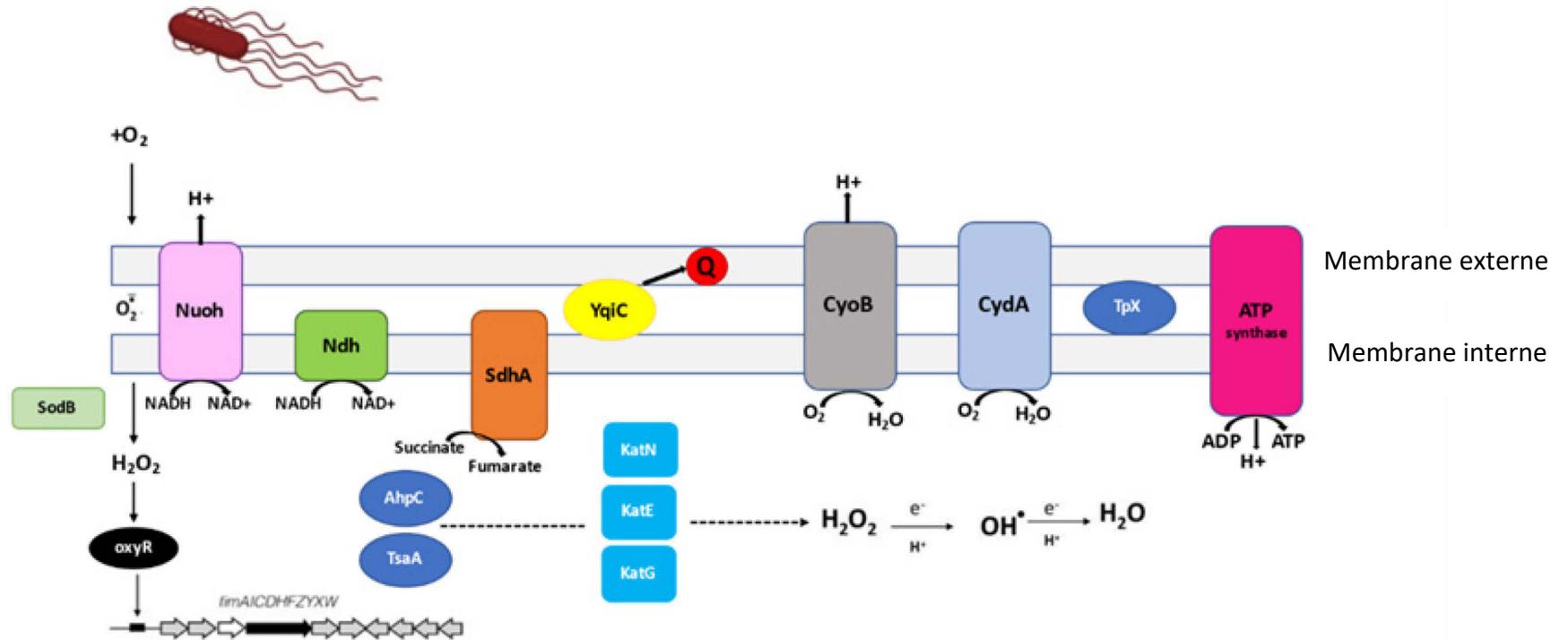


Figure 23. Rôle de la chaîne de transport d'électrons de *Salmonella Typhi* sur *fim*.

Adaptée de (Price, 2010).

1.2 Effet de la quantité d'oxygène disponible dans le milieu de croissance

Nous avons fait varier la quantité d'oxygène disponible dans le milieu de croissance LB, puisque lors de son infection de l'hôte, la bactérie remplit ce type de condition. Étant une bactérie anaérobie facultative, elle peut proliférer avec ou sans oxygène. De plus, l'oxygène agissant comme accepteur final d'électron, nous pouvions explorer deux avenues en une seule expérience.

Dans l'ensemble, les résultats d'expression de *fim* nous permettent de conclure que la réduction de la disponibilité en oxygène, de façon partielle n'a que d'effet significatif que chez le mutant *oxyR* (Fig. 9), alors qu'en absence totale, l'effet sur l'expression de *fim* n'est observé que chez le mutant *ndh* (Fig.10).

Tout d'abord, sans la présence d'*oxyR* dans le chromosome de *S. Typhi*, dans un milieu faible en oxygène, l'expression de *fim* est fortement diminuée comparée à sa souche sauvage. Cependant, si on compare à son expression en milieu aérobie, elle est également à la baisse. Ces résultats suggèrent que ce gène code pour un activateur de *fim* lorsque l'oxygène est présent dans le milieu. Sachant qu'OxyR est un senseur du peroxyde d'hydrogène, un produit d'oxygène et d'hydrogène, il est logique que sans oxygène dans le milieu, la quantité de peroxyde soit plus faible et donc la faible concentration n'ait aucun effet sur la bactérie. Il pourrait être intéressant de mesurer le peroxyde d'hydrogène contenu dans chacun des milieux aérobie, microaérobie et anaérobie afin de quantifier l'effet de ce senseur de peroxyde par rapport à la concentration de H₂O₂ retrouvée dans le milieu. Il serait intéressant de faire des expériences futures évaluant l'interaction OxyR avec un promoteur *fim*.

En conditions aérobies ou anaérobies, l'expression de *fim* sans le gène *ndh* est diminuée, suggérant qu'il est un activateur de *fim*. Puisque *ndh* n'est pas essentiel au complexe I de la CTE, il est intéressant de constater une variation aussi importante lorsqu'il n'est pas présent dans le chromosome bactérien. En parallèle, il est pertinent de comparer l'expression de *fim* sans *nuoH*, un gène clé dans le complexe I chez plusieurs organismes. Peu importe le milieu, *fim* est fortement exprimé chez le mutant *nuoH*. Cela peut s'expliquer par le fait que chez *S.*

Typhi, le complexe I contient à la fois Nuo et Ndh. Une certaine redondance permet que lorsque Nuo n'est pas présent, Ndh compense en rééquilibrant le ratio NADH/NAD. Il serait pertinent de créer un double mutant, donc de retirer à la fois *nuoH* et *ndh*, afin d'évaluer totalement l'effet du complexe I chez *fim*. Pour ce qui est des autres gènes testés, la disponibilité de l'oxygène dans le milieu n'a pas influencé l'expression de *fim*.

Puisque l'expression de *fim* chez le mutant *ndh* est affectée, nous avons décidé de confirmer si l'effet était propre au fimbria *fim*. Pour ce faire, nous avons testé le promoteur des fimbriae *stb* et *std* chez le mutant *ndh*. Cela a confirmé que l'effet était spécifique à *fim*, puisque c'est le seul dont l'expression était induite comparée à sa souche sauvage (Fig.11).

2. Rôle de l'accepteur d'électrons

La chaîne de transport d'électrons typique propose l'oxygène comme accepteur final puisqu'il est présent dans notre environnement. En revanche, *S. Typhi* a la particularité de pouvoir utiliser un autre accepteur d'électron, comme le nitrate. Étant connus dans la littérature comme un accepteur alternatif, nous avons exploré le rôle du nitrate comme accepteur d'électron, puisque celui-ci se retrouve également chez l'hôte. Dans un milieu où à la fois, l'oxygène et le nitrate sont présents, l'expression de *fim* chez certains mutants se voit significativement réprimer. Ceux-ci sont *ndh*, *yqiC*, *ahpC* et *tsaA* (Fig.12). Pour ce qui est du mutant *ndh*, le patron d'expression de *fim* est similaire avec la condition normale aérobie, il ne semble donc pas être affecté par la présence de nitrate.

L'expression de *fim* est très faible lorsque *yqiC* est absent, qui a pour rôle d'influencer l'efficacité des transporteurs d'électrons à leurs accepteurs. Cela va dans la même direction que les conclusions tirées dans l'article de Kolenda et al., qui rappelons-nous, indiquaient que YqiC régule négativement les fimbriae de type 1 tel que Fim. (Kolenda et al., 2019). Il pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour l'humain, puisque le tractus digestif offre d'autres accepteurs que l'oxygène, donc sans ce gène, *fim* verrait son expression grandement réprimée, empêchant la virulence.

En présence de nitrate, mais en condition anoxique, le patron d'expression de *fim* concernant les mutants OxyR et NuoH s'est vu changer. En effet, lorsque dans un milieu ayant à la fois différents accepteurs d'électrons, il n'y avait aucune différence avec la souche sauvage. On remarque la surexpression de *fim* lorsqu'OxyR n'est pas présent dans la bactérie. Ce gène, codant pour la détoxification des ROS, n'étant pas présent, diminue la production du fimbria. Quant à NuoH, faisant partie du complexe I de NADH déshydrogénase, sert à pomper les ions H⁺ hors de la membrane. Lorsqu'absent, il y a la répression de *fim*, suggérant que Nuo est un activateur de *fim*.

Lorsqu'on observe les mutants des peroxydases, tel que AhpC, on remarque que l'expression de *fim* est similaire en présence de nitrate, peu importe l'oxygène dans le milieu. D'un autre côté, la peroxydase TsaA voit une baisse de l'expression de *fim* en condition oxygène avec nitrate, mais augmenter en condition anoxique avec nitrate. Cela peut suggérer que cette peroxydase

agit différemment sur l'expression de *fim* selon l'accepteur final d'électron. En parallèle, lorsqu'on observe la peroxydase Tpx et la catalase KatG, *fim* à une expression semblable en présence de nitrate. KatG ne varie pas l'expression de *fim* peu importe l'oxygène contenu dans le milieu avec nitrate. Sachant que ces protéines détoxifiantes sont redondantes dans le génome de *Salmonella* Typhi, nous pouvons conclure qu'en l'absence d'au moins un de ces gènes, la détoxification est tout de même assurée. Nous avons donc créé de doubles mutants de peroxydases ou de peroxydase/catalase, afin de déterminer l'ampleur de la redondance de ces gènes. Les résultats ainsi que leur analyse seront discutés dans la discussion entourant les doubles mutants créés dans le cadre de cette recherche.

3. Rôle du stress oxydatif

Le stress oxydatif est omniprésent à la fois dans la bactérie, chez l'hôte et dans son environnement. Ce stress a un rôle sur l'expression de certains gènes et sur la survie bactérienne. Nous avons étudié l'effet de deux stress oxydatifs bien connus, le H₂O₂ et le *t*-BHP, ajoutés au milieu de croissance à la concentration de 50 μM, considérée comme faible. Cet ajout nous a permis d'observer l'expression à la baisse de *fim* chez mutant *yqiC* dans les deux conditions, à un niveau très similaire. Cela nous indique que peu importe le type de stress, sans la présence de *yqiC*, il y a un facteur qui réprime *fim*. Nous pouvons également faire un lien avec la répression abordée plus tôt dans un milieu ayant un autre accepteur final d'électrons, suggérant que YqiC n'est peut-être pas impliqué dans la chaîne de transport nécessaire pour la pathogenèse de la bactérie, mais plutôt dans la régulation de *fim* puisqu'en étant un régulateur de la synthèse de la ménaquinone, il pourrait servir d'antioxydant, faisant alors diminuer le niveau de superoxyde potentiellement produit par Ndh.

Les autres mutants de *fim* n'ont pas eu de variation d'expression significative lors de nos tests portant sur le rôle du stress oxydatif.

3.1 Rôle de la durée d'exposition au stress oxydatif

La durée d'exposition au stress oxydatif est une variante importante à considérer dans l'infection de l'hôte. En effet, lors de son arrivée dans le tractus digestif, la bactérie rencontre une multitude de variations de stress environnementaux comme la disponibilité en oxygène et le stress oxydatif. Nous avons tout d'abord exploré la diminution et l'absence d'oxygène, l'exposition aux ROS devient donc un sujet d'intérêt assez novateur.

Comme les ROS affectent les bactéries qui font leur entrée dans le tractus digestif, elles ont déjà des précédents de croissance sans être touchées par ce stress. Il était donc intéressant de comparer l'effet momentané du stress oxydatif, mais aussi l'effet sur une bactérie en croissance, comme celles qui se répliquent dans le but d'obtenir une infection systémique.

3.1.1 Effet de l'exposition pendant la croissance

De faibles concentrations, soit 5 μM , 50 μM et de fortes concentrations, 1 mM et 2 mM, ont été ajoutées durant environ 18 heures, pour voir l'effet sur la croissance en présence de stress, comme il en serait le cas pour des bactéries qui se répliquent lors de l'infection de l'hôte.

Peu importe une faible ou une forte concentration, le mutant *ndh* a toujours le même patron d'expression. Ce dernier est la NADH-déshydrogénase qui a habituellement pour rôle de catalyser la réaction du complexe I de la CTE. L'expression de *fim* s'est vue réprimée, peu importe la condition dans laquelle le mutant *ndh* se retrouvait. Autant à plus faible concentration qu'à la plus forte testée, le mutant est le seul à avoir un effet significatif sur l'expression de *fim*, suggérant une grande sensibilité en présence de stress oxydatif omniprésent lors du développement bactérien. Il est important de noter que l'ajout de stress oxydatif, comme le peroxyde d'hydrogène, n'a pas influencé significativement la poussée bactérienne, la densité optique mesurée à 600 nm se situant entre 0,6 et 0,8 autant avec ou sans supplément.

Lorsque combiné, les résultats obtenus concernant deux grands facteurs environnementaux dans l'infection de l'hôte, soit la variation de la concentration d'oxygène et celle de peroxyde d'hydrogène lors de la croissance bactérienne, il est indéniable que le mutant *ndh* a un rôle important dans la régulation de *fim*. D'autres expériences, comme la quantification du ratio NADH/NAD⁺ produit en absence et en présence de stress oxydatif durant la croissance bactérienne pourrait permettre de mieux comprendre l'effet de *ndh*, une NADH-déshydrogénase, sur l'expression de *fim*. En effet, comme ce gène produit des groupements NAD⁺ et H⁺, le ratio NADH/NAD⁺ devient alors le principal indicateur métabolique des bactéries, permettant de déterminer le stress oxydatif exprimé sur cette dernière. Donc en absence du gène *ndh*, il serait possible de quantifier le NADH, qui est aussi assuré par *nuo* dans le complexe I, et le NAD⁺ et H⁺ produits. Selon ce que nous savons présentement sur *ndh*, nous estimons qu'il y aurait une baisse de NADH, mais que le NAD⁺ et les H⁺ produits seraient considérables, d'autant plus avec l'ajout de protons d'hydrogène sous la forme de H₂O₂. Il sera d'autant plus intéressant d'étudier la régulation de *fim* avec le double mutant suggéré plus haut, *nuoH/ndh*, afin de diminuer au maximum le NADH présent.

Pour ce qui est des autres mutants étudiés, leur profil d'expression concernant *fim* est très variable d'une condition à une autre. Rappelons que pour la plus faible et les deux plus fortes concentrations, seul *ndh* avait un effet significatif réprimant l'expression de *fim*. À 50 μ M de peroxyde, outre *ndh*, les mutants *oxyR*, *nuoH*, *yqiC* et *ahpC* réprime *fim* (Fig. 13). Aucune surexpression de *fim* n'est notable dans cette condition. Pour ce qui est de 1 mM de peroxyde, seul *ndh* réprime *fim*, mais deux mutants surexpriment ce dernier, soit *sodB* et *katG* (Fig. 16). Toutefois, cette surexpression ne s'applique pas à 2 mM, ces mutants ayant une expression similaire à la souche sauvage de référence (Fig. 17). L'expression des autres mutants discutés ici ne semble pas être significative et substantielle dans l'optique de tirer des conclusions sur leur effet dans la régulation de *fim*.

3.1.2 Effet lors d'un traitement choc

Lorsque le stress est induit après la croissance, comme c'est le cas durant l'infection de l'hôte, certains mutants, dont *ndh*, n'ont pas d'effet significatif sur l'expression de *fim*, alors que ce mutant avait un profil d'expression à la baisse chez *fim*, ce qui était très distinct (Fig 18). Toujours en gardant en tête que *ndh* est une NADH-déshydrogénase qui a pour but de produire du NAD⁺ et des électrons pouvant rejoindre l'accepteur final, il était logique que lors de la croissance de la bactérie, l'expression de *fim* soit réprimée, car la quantité de NADH produite était plus basse que la quantité d'électrons, donc la quantité de stress était plus élevée. Suivant ce raisonnement, il aurait été normal de voir le même patron lors d'un traitement choc. Il serait encore pertinent de mesurer le ratio NADH/NAD⁺ dans la situation de choc et de le comparer la situation de croissance. Cela permettrait d'établir un lien clair entre la présence des ions H⁺ produits par la NADH-déshydrogénase, les ions H⁺ provenant du stress oxydatif induit et la régulation du fimbria *fim*.

Toujours dans le même ordre d'idée, le mutant *nuoH*, également une NADH-déshydrogénase du complexe I de la CTE, entraîne la répression de *fim*. Cela suggère qu'elle aussi, régulerait *fim* de la même façon que *ndh*, selon la durée d'exposition au stress oxydatif. Nous pouvons donc en conclure que *nuo* régule négativement *fim* lorsque le stress est de courte durée et qu'il

survient après la croissance normale de la bactérie. En parallèle, *fim* est également réprimé par son autre NADH-déshydrogénase, soit *ndh*, lorsque le stress généré tout au long de la croissance. Cela confère un rôle très important au complexe I de la CTE quant à la régulation de *fim*, puisque tout au long de l'infection de l'hôte, donc dès son arrivée dans le tractus et lors de sa réplication, la bactérie nécessite la présence du complexe I. Afin de confirmer cette hypothèse, la création du double mutant *nuoH/ndh* serait essentielle pour caractériser l'importance du complexe I de la CTE sur la régulation de *fim*.

Finalement, un autre mutant qui s'est illustré lors des expériences portant sur le traitement choc est *yqiC*, qui engendre la surexpression de *fim*. Selon les autres expériences discutées plus haut, *yqiC* avait toujours un effet de régulation négative chez *fim*. L'expression n'était pas significative lors des traitements de longue exposition, alors qu'une exposition très courte, elle est fortement à la hausse. Il est possible que cet effet soit attribuable à son rôle dans la synthèse des métaquinones, qui agissent comme transporteurs d'électrons dans le complexe III, mais aussi comme antioxydants dans le but de baisser le stress oxydatif et faciliter la production d'ATP. Afin d'élucider cette hypothèse, la création des mutants des complexes II (SdhA) et III (Cyo et Cyd) est nécessaire pour mieux comprendre la régulation de *fim* par rapport à ces autres complexes.

4. Doubles mutants

La création de doubles mutants permet d'obtenir plus de précisions concernant un groupe de gènes comme les catalases, les peroxydases ou bien les différents complexes de la chaîne de transport d'électrons et l'effet, direct ou indirect qu'ils pourraient avoir sur la régulation du fimbria *fim*.

Bien que plusieurs doubles mutants aient été proposés dans notre analyse, seulement *katG/ahpC*, *katG/tsaA* et *ahpC/tsaA* ont été obtenus par notre laboratoire. Comme il existe trois catalases et trois peroxydases dans le génome de *Salmonella* Typhi, il était pertinent de déterminer l'effet de leur redondance. Donc, en créant des paires entre notre catalase *katG* et les premières peroxydases obtenues, *ahpC* et *tsaA*, ainsi qu'un mutant de ces deux peroxydases, nous pouvions mieux évaluer leur effet sur la régulation de *fim* qu'en étudiant seulement de simples mutants.

Tout d'abord nous avons étudié l'expression de *fim* en condition aérobie, afin d'avoir une référence pouvant être comparée avec nos autres mutants discutés plus haut. Seul le double mutant *ahpC/tsaA* n'a pas influencé l'expression de *fim*. En revanche, *katG/tsaA* a régulé positivement *fim* alors que *katG/ahpC* le régule de façon négative, voire nulle (Fig. 20).

Pour ce qui est du double mutant exclusif aux peroxydases, cela suggère qu'elles n'ont pas de rôle essentiel, puisque lors que toutes deux absentes, elles n'influencent pas la régulation de *fim*. Parallèlement, lorsque nous les avons étudiées en tant que simple mutant, les deux peroxydases réprimaient fortement l'expression de *fim* (Fig. 8) Il semblerait que, lorsque seule, elles ont un rôle important quant à la régulation du fimbria, mais lorsque combinée, leur absence chez *fim* module possiblement l'autre peroxydase du chromosome, soit *tpx* ou bien ces catalases *katG*, *katE* ou *katN*. Éventuellement, il serait intéressant d'obtenir un triple mutant peroxydases, incluant aussi *tpx*, afin de déterminer si les peroxydases ont un effet chez *fim*. Sans quoi, cela nous indiquerait que ce sont les catalases qui ont effet déterminant sur la détoxification du stress oxydatif qui influence la régulation de *fim*. Donc, la création d'un triple mutant, incluant c'est deux peroxydases et une des trois catalases du chromosome pourrait aussi élucider ces hypothèses.

La littérature nous indiquait déjà que les catalases, comme *katG*, ont des rôles très importants dans la détoxification des ROS, et ce chez plusieurs bactéries, comme *E. coli*, qui présente beaucoup de ressemblance de régulation avec *Salmonella*. Lorsque nous avons produit la mutation de la catalase, couplées avec la mutation d'une peroxydase, nous avons pour hypothèse que l'expression de *fim* serait diminuée de façon très significative, n'ayant plus de système de défense efficace contre le stress oxydatif rencontré. Pour le double mutant *katG/tsaA*, *fim* présente une surexpression importante. Celle-ci pourrait s'expliquer par les résultats préliminaires qui nous ont poussés à la construction de ce double mutant, indiquant que *katG*, lorsque simple mutant, entraîne la surexpression de *fim*. Cette surexpression pourrait se justifier par la redondance des systèmes de détoxification, suggérant que *katG* n'est pas essentiel à la réduction du stress oxydatif. En effet, lorsque *katG* ne se retrouve pas dans le chromosome, en plus d'une peroxydase jouant un rôle similaire, la tendance d'expression reste la même.

Toutefois, cette hypothèse a été réfutée par les résultats obtenus avec le double mutant *katG/ahpC* (Fig.8). Ici, la logique attendue était la même que celle décrite plus haut. Pourtant, lorsque ni *katG*, ni *ahpC* sont simultanément présents, l'expression de *fim* est nulle. Il est important de souligner que la croissance bactérienne de nuit obtenue était similaire à celle attendue, offrant une densité optique à 600 nm étant supérieure à 0,6. Nous ne pouvons donc pas attribuer de défaut de croissance influençant l'expression de *fim*. Ces résultats confèrent un rôle important à *katG* ainsi qu'à *ahpC* lorsque combinés. Ce résultat très intéressant pourrait rendre la mutation de ces deux gènes des cibles thérapeutiques, empêchant totalement l'expression du fimbria *fim* et de la virulence.

Afin de porter l'expérience plus loin, nous avons comparé l'expression de *fim*, dans ces doubles mutants, en présence de stress oxydatif induit à faible et à forte concentration lors de la croissance de nuit. Le but de ce test était de déterminer si les bactéries, rendues dans un stade avancé de croissance, comme celui observé lors de prolifération dans les organes clés, verraient leur expression de *fim* varier. En d'autres mots, est-ce que l'absence de ces gènes détoxifiants dans le chromosome serait capable de se répliquer efficacement et de conserver et/ou modifier son patron d'expression de *fim*? Peu importe la quantité de stress oxydatifs, 5 μ M ou 2 mM, le patron d'expression de *fim* reste inchangé chez nos trois doubles mutants testés (Fig. 21). Cela nous indique que l'ajout de ROS dans le milieu n'influence pas l'expression de *fim* alors que

ses tactiques détoxifiantes sont atteintes. Cependant, cette information se veut un avantage pour la recherche de cible thérapeutique dirigée vers *katG/ahpC*, car les gènes détoxifiants restants, comme *katE*, *katN* et *tpx* n'ont pas pris le dessus lorsqu'une forte concentration de stress est survenue dans le milieu. Ayant des rôles similaires, ces gènes auraient pu nécessiter une activation selon la quantité de ROS rencontrée dans son milieu de croissance. Toutefois, comme l'expression de *fim* reste nulle, nous pouvons suggérer autrement.

Nous pouvons donc tirer cette conclusion évidente, les mutations de *katG/ahpC* empêchent l'expression de *fim*, un fimbria essentiel pour la virulence de *Salmonella* Typhi et d'autant plus pour ces capacités d'adhésion et d'infection nécessaire pour la colonisation des organes de l'hôte, et assurer la prolifération vers une infection systémique mortelle. Cela confirme donc l'hypothèse discutée dans la section 3.7 (La détoxification du stress oxydatif chez *S. Typhi*), mentionnant de récentes recherches ciblant *katG* et *ahpC* comme des médiateurs clés pour la réduction des ROS (Wan et al., 2021).

5. Rôle des complexes de la chaîne de transport d'électrons

La chaîne de transport d'électrons étant au cœur de notre analyse, il était pertinent d'explorer l'importance de chacun des complexes de celle-ci. Aussi, les inhibiteurs des complexes étant des cibles thérapeutiques envisageables, il devenait impératif de déterminer leur effet sur les complexes. Ici, seulement le premier complexe a été étudié, mais afin d'obtenir un portrait global de la régulation de *fim* dans la CTE, il serait pertinent de créer les mutants des complexes II et III ainsi que de tester leur inhibiteur respectif.

5.1 Complexe I

Notre étude se concentre sur le complexe I de la CTE de *Salmonella* Typhi, et donc le rôle des NADH-déshydrogénase, *nuo* et *ndh*, discuté plus haut. La roténone est un inhibiteur du complexe I bien connu et bien documenté chez la mitochondrie (Palmer et al., 1968) et c'est celui que nous avons choisi de supplémenter à 140 mM dans nos croissances bactériennes de nuit.

L'inhibiteur ajouté réprime significativement l'expression de *fim* chez les mutants *nuoH* et *ndh*. Cela nous prouve l'efficacité de l'inhibiteur choisi quant au complexe I de la CTE. Le même niveau d'expression de *fim* que chez la souche sauvage est observé chez les autres mutants *oxyR*, *sodB*, *katG*, *ahpC*, *tsaA* et *yqiC*, qui eux, ne font pas partie du complexe ciblé (Fig. 22). La roténone devient donc un bon choix pour cibler le complexe I et donc empêcher la régulation de *fim*, et par le fait même la capacité de la bactérie de produire de l'énergie pour assurer sa survie et sa virulence. Toutefois, comme l'effet de la roténone sur les cellules humaines agit de la même façon que la chimiothérapie, donc elle empêche la formation des microtubules nécessaire pour former le fuseau mitotique pour faire la mitose (Brinkley et al., 1974), le traitement se vaudrait très invasif et dommageable pour l'individu. L'investigation d'autres inhibiteurs du complexe I de la CTE serait favorable pour limiter l'effet sur l'hôte, tout en lui assurant une efficacité contre la virulence de *Salmonella* Typhi.

Conclusion

Les objectifs de notre étude ont partiellement été atteints, laissant place à plusieurs autres projets portant sur la redondance des enzymes détoxifiantes de stress oxydatif, les complexes II et III de la chaîne de transport d'électrons et leur inhibiteur respectif, concernant la régulation de *fim*, un fimbria essentiel à l'adhésion et la formation de biofilm, deux facteurs de virulence essentiels pour l'infection et la colonisation de son hôte.

Nos expériences ont d'abord démontré le rôle de la chaîne de transport d'électron, principalement le complexe I, avec la NADH-déshydrogénase encodée par *ndh* qui possède des effets spécifiques concernant la régulation de *fim*. Ce complexe est aussi composé d'une autre NADH-déshydrogénase *nuo*. Nous proposons des pistes de recherches ciblant totalement la régulation de *fim* par le complexe I par la mutation complète par le biais du double mutant *nuo/ndh*. Nous avons déjà prouvé l'efficacité de la roténone, un inhibiteur du complexe I. Toutefois, étant très néfaste pour l'humain, il serait pertinent de cibler d'autres inhibiteurs.

En discutant toujours du rôle de la CTE, YqiC stimule un grand intérêt puisque c'est un super-régulateur de *Salmonella* qui agit dans la synthèse des transporteurs d'électrons comme les ubiquinones et les métaquinones, dans la génération d'ATP et dans le maintien du métabolisme bactérien lorsqu'en présence de stress oxydatif. Lorsqu'en condition forte en oxygène, *yqiC* n'est pas essentiel pour la régulation de *fim*, mais tout ceci change lorsque l'accepteur final d'électron n'est plus l'oxygène, comme c'est le cas dans le tractus intestinal. Cette caractéristique de *S. Typhi* s'explique par le fait que la bactérie est anaérobie facultative et peut utiliser différents accepteurs finals autres que l'oxygène. Ce gène devient lui aussi une cible thérapeutique dans la régulation de *fim*, ce qui limiterait sa capacité d'adhérence et de prolifération lors de l'infection de l'hôte.

Finalement, la caractérisation des catalases et des peroxydases s'est avérée pertinente, indiquant que *katG* et *ahpC*, lorsque toutes deux absentes, réprime totalement l'expression de *fim*. De plus, en ajoutant un stress oxydatif dans le milieu de croissance de ces bactéries, nous avons pu ne constater aucun changement au patron d'expression de *fim*. Ces changements non significatifs peuvent sembler non concluants. Au contraire, les gènes détoxifiants restants, comme *katE*, *katN*

et *tpx* n'ont pas pris le dessus lorsqu'une forte concentration de stress est survenue dans le milieu. Ayant des rôles similaires, ces gènes auraient pu nécessiter une activation selon la quantité de ROS rencontrée dans son milieu de croissance.

Somme toute, cette étude a permis de contribuer à la caractérisation de la chaîne de transport d'électrons et à la compréhension des patrons de régulation du fimbria *fim*, lui procurant de nombreux avantages dans la virulence de *Salmonella enterica* sérovar Typhi. Ces expériences laissent des pistes évidentes et de nombreuses opportunités de recherche.

Références bibliographiques

- Alexandre, A. et Lehninger, A. L. (1984, Oct 26). Bypasses of the antimycin a block of mitochondrial electron transport in relation to ubisemiquinone function. *Biochimica Biophysica Acta*, 767(1), 120-129. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(84\)90086-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90086-0)
- Alía, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L. et Goya, L. (2005). Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19(2), 119-128. <https://doi.org/10.1002/jbt.20061>
- Anraku, Y. (1988). BACTERIAL ELECTRON TRANSPORT CHAINS. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 101-132. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.000533>
- Bhat, S. A., Iqbal, I. K. et Kumar, A. (2016, 2016-November-08). Imaging the NADH:NAD⁺ Homeostasis for Understanding the Metabolic Response of *Mycobacterium* to Physiologically Relevant Stresses [Original Research]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00145>
- Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Nastasi, M. R. et Forte, E. (2021, May 24). ROS Defense Systems and Terminal Oxidases in Bacteria. *Antioxidants (Basel)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antiox10060839>
- Boyd, E. F. et Hartl, D. L. (1999, Feb). Analysis of the type 1 pilin gene cluster *fim* in *Salmonella*: its distinct evolutionary histories in the 5' and 3' regions. *J Bacteriol*, 181(4), 1301-1308. <https://doi.org/10.1128/jb.181.4.1301-1308.1999>
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. et Swaminathan, B. (2000, Jul). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465-2467. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.7.2465-2467.2000>
- Cha, M. K., Kim, H. K. et Kim, I. H. (1995, Dec 1). Thioredoxin-linked "thiol peroxidase" from periplasmic space of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28635-28641. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28635>
- Chae, H. Z., Chung, S. J. et Rhee, S. G. (1994, Nov 4). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 269(44), 27670-27678.
- Chepuri, V., Lemieux, L., Au, D. C. et Gennis, R. B. (1990, 1990/07/05/). The sequence of the *cyo* operon indicates substantial structural similarities between the cytochrome *o* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the aa3-type family of cytochrome *c* oxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 11185-11192. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38574-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38574-6)
- Chessa, D., Winter, M. G., Jakomin, M. et Bäumlner, A. J. (2009, Feb). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha(1,2) fucose residues in the cecal mucosa. *Molecular Microbiology*, 71(4), 864-875. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06566.x>
- Dong, R., Liang, Y., He, S., Cui, Y., Shi, C., He, Y. et Shi, X. (2022, Feb 23). DsrA Modulates Central Carbon Metabolism and Redox Balance by Directly Repressing *pflB* Expression in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e0152221. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01522-21>

- Dougan, G. et Baker, S. (2014). *Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annual Review of Microbiology*, 68, 317-336. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103739>
- Dufresne, K., Saulnier-Bellemare, J. et Daigle, F. (2018). Functional Analysis of the Chaperone-Usher Fimbrial Gene Clusters of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 26. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00026>
- Duguid, J. P., Smith, I. W., Dempster, G. et Edmunds, P. N. (1955, Oct). Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 70(2), 335-348. <https://doi.org/10.1002/path.1700700210>
- Falk-Krzesinski, H. J. et Wolfe, A. J. (1998, Mar). Genetic analysis of the nuo locus, which encodes the proton-translocating NADH dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(5), 1174-1184. <https://doi.org/10.1128/jb.180.5.1174-1184.1998>
- Fisher, N., Meunier, B. et Biagini, G. A. (2020, Sep). The cytochrome bc(1) complex as an antipathogenic target. *FEBS Letters*, 594(18), 2935-2952. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13868>
- Forest, C., Faucher, S. P., Poirier, K., Houle, S., Dozois, C. M. et Daigle, F. (2007, Nov). Contribution of the *stg* fimbrial operon of *Salmonella enterica* serovar Typhi during interaction with human cells. *Infection and Immunity*, 75(11), 5264-5271. <https://doi.org/10.1128/iai.00674-07>
- Fronzes, R., Remaut, H. et Waksman, G. (2008, Sep 3). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO Journal*, 27(17), 2271-2280. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.155>
- Garcia-Gutierrez, E., Chidlaw, A. C., Le Gall, G., Bowden, S. D., Tedin, K., Kelly, D. J. et Thompson, A. (2016). A Comparison of the ATP Generating Pathways Used by *S. Typhimurium* to Fuel Replication within Human and Murine Macrophage and Epithelial Cell Lines. *PLoS One*, 11(3), e0150687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150687>
- Gholizadeh, P., Köse, Ş., Dao, S., Ganbarov, K., Tanomand, A., Dal, T., Aghazadeh, M., Ghotaslou, R., Ahangarzadeh Rezaee, M., Yousefi, B. et Samadi Kafil, H. (2020). How CRISPR-Cas System Could Be Used to Combat Antimicrobial Resistance. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1111-1121. <https://doi.org/10.2147/idr.S247271>
- Gough, D. R. et Cotter, T. G. (2011, 2011/10/01). Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death & Disease*, 2(10), e213-e213. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.96>
- Guest, R. L., Wang, J., Wong, J. L. et Raivio, T. L. (2017). A Bacterial Stress Response Regulates Respiratory Protein Complexes To Control Envelope Stress Adaptation. *Journal of Bacteriology*, 199(20), e00153-00117. <https://doi.org/10.1128/jb.00153-17>
- Gupta, R. C. (2014). Rotenone. Dans P. Wexler (dir.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (p. 185-187). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00194-9>
- Gyan, S., Shiohira, Y., Sato, I., Takeuchi, M. et Sato, T. (2006, Oct). Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD(+) ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7062-7071. <https://doi.org/10.1128/JB.00601-06>

- Hansen-Wester, I. et Hensel, M. (2001, Jun). *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect*, 3(7), 549-559. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01411-3](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01411-3)
- Hassan, H. M. (1988, 1988/01/01/). Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radical Biology and Medicine*, 5(5), 377-385. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90111-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90111-6)
- Hébrard, M., Viala, J. P., Méresse, S., Barras, F. et Aussel, L. (2009, Jul). Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4605-4614. <https://doi.org/10.1128/jb.00144-09>
- Heikal, A., Nakatani, Y., Dunn, E., Weimar, M. R., Day, C. L., Baker, E. N., Lott, J. S., Sazanov, L. A. et Cook, G. M. (2014, Mar). Structure of the bacterial type II NADH dehydrogenase: a monotopic membrane protein with an essential role in energy generation. *Molecular Microbiology*, 91(5), 950-964. <https://doi.org/10.1111/mmi.12507>
- Hill, S., Viollet, S., Smith, A. T. et Anthony, C. (1990). Roles for enteric d-type cytochrome oxidase in N₂ fixation and microaerobiosis. *Journal of Bacteriology*, 172(4), 2071-2078. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.172.4.2071-2078.1990>
- Hillar, A., Peters, B., Pauls, R., Loboda, A., Zhang, H., Mauk, A. G. et Loewen, P. C. (2000, May 16). Modulation of the activities of catalase-peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 39(19), 5868-5875. <https://doi.org/10.1021/bi0000059>
- House, D., Bishop, A., Parry, C., Dougan, G. et Wain, J. (2001, Oct). Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 14(5), 573-578. <https://doi.org/10.1097/00001432-200110000-00011>
- Houwink, A. L. et van, I. W. (1950, Mar). Electron microscopical observations on bacterial cytology; a study on flagellation. *Biochimia and Biophysica Acta*, 5(1), 10-44. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(50\)90144-2](https://doi.org/10.1016/0006-3002(50)90144-2)
- Jacobson, F. S., Morgan, R. W., Christman, M. F. et Ames, B. N. (1989, 1989/01/25/). An Alkyl Hydroperoxide Reductase from *Salmonella typhimurium* Involved in the Defense of DNA against Oxidative Damage: Purification and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 264(3), 1488-1496. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)94214-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94214-6)
- Janoff, L. E. (1990, Jan-Mar). Origin and development of hydrogen peroxide disinfection systems. *Clao j*, 16(1 Suppl), S36-42.
- Jones, R. M., Mercante, J. W. et Neish, A. S. (2012). Reactive oxygen production induced by the gut microbiota: pharmacotherapeutic implications. *Current Medecinal Chemistry*, 19(10), 1519-1529. <https://doi.org/10.2174/092986712799828283>
- Julsing, M. K., Rijpkema, M., Woerdenbag, H. J., Quax, W. J. et Kayser, O. (2007, Jul). Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of isoprene in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(6), 1377-1384. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0953-5>
- Jünemann, S. (1997, Aug 22). Cytochrome bd terminal oxidase. *Biochimia and Biophysica Acta*, 1321(2), 107-127. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(97\)00046-7](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(97)00046-7)
- Karash, S., Liyanage, R., Qassab, A., Lay, J. O. et Kwon, Y. M. (2017, 2017/12/06). A Comprehensive Assessment of the Genetic Determinants in *Salmonella Typhimurium*

- for Resistance to Hydrogen Peroxide Using Proteogenomics. *Scientific Reports*, 7(1), 17073. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17149-9>
- Kim, K., Kim, I. H., Lee, K. Y., Rhee, S. G. et Stadtman, E. R. (1988, Apr 5). The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *Journal of Biology and Chemistry*, 263(10), 4704-4711.
- Kitagawa, M., Matsumura, Y. et Tsuchido, T. (2000, Mar 15). Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 184(2), 165-171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09009.x>
- Kolenda, R., Ugorski, M. et Grzymajlo, K. (2019). Everything You Always Wanted to Know About *Salmonella* Type 1 Fimbriae, but Were Afraid to Ask. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01017>
- Lenton, T. M. (2003). 3 - The coupled evolution of life and atmospheric oxygen. Dans L. J. Rothschild et A. M. Lister (dir.), *Evolution on Planet Earth* (p. 35-53). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012598655-7/50030-6>
- Li, H., Zhou, X., Huang, Y., Liao, B., Cheng, L. et Ren, B. (2021, 2021-February-04). Reactive Oxygen Species in Pathogen Clearance: The Killing Mechanisms, the Adaption Response, and the Side Effects [Mini Review]. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622534>
- Liu, X. et Kokare, C. (2017). Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry. Dans G. Brahmachari (dir.), *Biotechnology of Microbial Enzymes* (p. 267-298). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Liu, Y., Landick, R. et Raman, S. (2019, 2019/02/15). A Regulatory NADH/NAD⁺ Redox Biosensor for Bacteria. *ACS Synthetic Biology*, 8(2), 264-273. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00485>
- Loewen, P. C. (1984, Feb). Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of katE, a locus that affects catalase activity. *Journal of Bacteriology*, 157(2), 622-626. <https://doi.org/10.1128/jb.157.2.622-626.1984>
- Loewen, P. C. et Switala, J. (1986, Jul). Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. *Biochemistry and Cellular Biology*, 64(7), 638-646. <https://doi.org/10.1139/o86-088>
- Loiseau, L., Fyfe, C., Aussel, L., Hajj Chehade, M., Hernández, S. B., Faivre, B., Hamdane, D., Mellot-Draznieks, C., Rascalou, B., Pelosi, L., Velours, C., Cornu, D., Lombard, M., Casadesús, J., Pierrel, F., Fontecave, M. et Barras, F. (2017, Jul 14). The UbiK protein is an accessory factor necessary for bacterial ubiquinone (UQ) biosynthesis and forms a complex with the UQ biogenesis factor UbiJ. *Journal of Biological Chemistry*, 292(28), 11937-11950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.789164>
- Lopez, C. A., Rivera-Chávez, F., Byndloss, M. X. et Bäumlér, A. J. (2015). The Periplasmic Nitrate Reductase NapABC Supports Luminal Growth of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium during Colitis. *Infection and immunity*, 83(9), 3470-3478. <https://doi.org/10.1128/IAI.00351-15>
- Lou, L., Zhang, P., Piao, R. et Wang, Y. (2019). Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, 9, 270. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00270>

- Maklashina, E., Berthold, D. A. et Cecchini, G. (1998, Nov). Anaerobic expression of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase: functional replacement of fumarate reductase in the respiratory chain during anaerobic growth. *Journal of Bacteriology*, 180(22), 5989-5996. <https://doi.org/10.1128/jb.180.22.5989-5996.1998>
- Mandal, B. K. et Brennand, J. (1988, Nov 12). Bacteraemia in salmonellosis: a 15 year retrospective study from a regional infectious diseases unit. *The Bmj*, 297(6658), 1242-1243. <https://doi.org/10.1136/bmj.297.6658.1242>
- Marín-García, J. (2014). Chapter 14 - Oxidative Stress and Cell Death in Cardiovascular Disease: A Post-Genomic Appraisal. Dans J. Marín-García (dir.), *Post-Genomic Cardiology (Second Edition)* (p. 471-498). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404599-6.00014-7>
- Marreiros, B. C., Sena, F. V., Sousa, F. M., Batista, A. P. et Pereira, M. M. (2016). Type II NADH:quinone oxidoreductase family: phylogenetic distribution, structural diversity and evolutionary divergences. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4697-4709. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.13352>
- Miles, A. A. et Pirie, N. W. (1949). The Nature of the Bacterial Surface. A Symposium of the Society for General Microbiology April, 1949. Dans. The Nature of the Bacterial Surface. A Symposium of the Society for General Microbiology April, 1949.
- Miller, A. F. (2012, Mar 9). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*, 586(5), 585-595. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.048>
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mishra, S. et Imlay, J. (2012, Sep 15). Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 145-160. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.014>
- Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Storz, G. et Ames, B. N. (1986, Nov). Hydrogen peroxide-inducible proteins in Salmonella typhimurium overlap with heat shock and other stress proteins. (*PNAS*) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(21), 8059-8063. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.21.8059>
- Nakayama, K., Okamoto, F. et Harada, Y. (1956, Mar). Antimycin A: isolation from a new Streptomyces and activity against rice plant blast fungi. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 9(2), 63-66.
- Nowicka, B. et Kruk, J. (2010, Sep). Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1797(9), 1587-1605. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.06.007>
- Nuccio, S. P. et Bäumlér, A. J. (2007, Dec). Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 71(4), 551-575. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00014-07>
- Nůsková, H., Vrbacký, M., Drahotka, Z. et Houštek, J. (2010, Oct). Cyanide inhibition and pyruvate-induced recovery of cytochrome c oxidase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 42(5), 395-403. <https://doi.org/10.1007/s10863-010-9307-6>
- Palmer, G., Horgan, D. J., Tisdale, H., Singer, T. P. et Beinert, H. (1968, Feb 25). Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbiturates, and piericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 243(4), 844-847.

- Panek, H. R. et O'Brian, M. R. (2004, Dec). KatG is the primary detoxifier of hydrogen peroxide produced by aerobic metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 7874-7880. <https://doi.org/10.1128/jb.186.23.7874-7880.2004>
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K. L., Bentley, S. D., Holden, M. T., Sebaihia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R. M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T. T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T. S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. et Barrell, B. G. (2001, Oct 25). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, 413(6858), 848-852. <https://doi.org/10.1038/35101607>
- Parry, C. M., Hien, T. T., Dougan, G., White, N. J. et Farrar, J. J. (2002, Nov 28). Typhoid fever. *New England Journal of Medicine*, 347(22), 1770-1782. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020201>
- Paudel, A., Hamamoto, H., Panthee, S. et Sekimizu, K. (2016). Menaquinone as a potential target of antibacterial agents. *Drug Discoveries and Therapeutics*, 10(3), 123-128. <https://doi.org/10.5582/ddt.2016.01041>
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J., Brenner, F. W. et Gheesling, L. L. (2001, Dec). Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, 152(10), 907-909. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01274-8](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01274-8)
- Rhen, M. (2019). *Salmonella* and Reactive Oxygen Species: A Love-Hate Relationship. *Journal of innate immunity*, 11(3), 216-226. <https://doi.org/10.1159/000496370>
- Rhen, M. (2019). *Salmonella* and Reactive Oxygen Species: A Love-Hate Relationship. *Journal of Innate Immunity*, 11(3), 216-226. <https://doi.org/10.1159/000496370>
- Riboulet, E., Verneuil, N., La Carbona, S., Sauvageot, N., Auffray, Y., Hartke, A. et Giard, J. C. (2007). Relationships between oxidative stress response and virulence in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(1-3), 140-146. <https://doi.org/10.1159/000103605>
- Robbe-Saule, V., Coynault, C., Ibanez-Ruiz, M., Hermant, D. et Norel, F. (2001, Mar). Identification of a non-haem catalase in *Salmonella* and its regulation by RpoS (sigmaS). *Molecular Microbiology*, 39(6), 1533-1545. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02340.x>
- Rodionova, I. A., Schuster, B. M., Guinn, K. M., Sorci, L., Scott, D. A., Li, X., Kheterpal, I., Shoen, C., Cynamon, M., Locher, C., Rubin, E. J., Osterman, A. L. et Drusano, G. L. (2014). Metabolic and Bactericidal Effects of Targeted Suppression of NadD and NadE Enzymes in *Mycobacteria*. *mBio*, 5(1), e00747-00713. <https://doi.org/doi:10.1128/mBio.00747-13>
- Rossolini, G. M., Muscas, P., Chiesurin, A. et Satta, G. (1993, Dec 15). Analysis of the *Salmonella* fim gene cluster: identification of a new gene (fimI) encoding a fimbrin-like protein and located downstream from the fimA gene. *FEMS Microbiology Letters*, 114(3), 259-265. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06583.x>
- Seaver, L. C. et Imlay, J. A. (2001, Dec). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7173-7181. <https://doi.org/10.1128/jb.183.24.7173-7181.2001>

- Simons, R. W., Houman, F. et Kleckner, N. (1987). Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, 53(1), 85-96.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90095-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90095-3)
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. et Brand, M. D. (2002, Nov 22). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44784-44790.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207217200>
- Storz, G., Tartaglia, L. A. et Ames, B. N. (1990, Oct). The OxyR regulon. *Antonie van Leeuwenhoek*, 58(3), 157-161. <https://doi.org/10.1007/bf00548927>
- Stuehr, D. J., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. F. et Nathan, C. F. (1991, Sep 1). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), 7773-7777.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7773>
- Tenopoulou, M. et Doulias, P. T. (2020). Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Res*, 9.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.19998.1>
- Thiennimitr, P., Winter, S. E., Winter, M. G., Xavier, M. N., Tolstikov, V., Huseby, D. L., Sterzenbach, T., Tsolis, R. M., Roth, J. R. et Bäuml, A. J. (2011, Oct 18). Intestinal inflammation allows Salmonella to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42), 17480-17485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107857108>
- Townsend, S. M., Kramer, N. E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., Stevens, K., Maloy, S., Parkhill, J., Dougan, G. et Bäuml, A. J. (2001, May). *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infectiology and Immunology*, 69(5), 2894-2901. <https://doi.org/10.1128/iai.69.5.2894-2901.2001>
- Uden, G. et Bongaerts, J. (1997, 1997/07/04/). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320(3), 217-234.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00034-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00034-0)
- Uden, G. et Dünwald, P. (2008). The Aerobic and Anaerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Enzymes and Energetics. *EcoSal Plus*, 3(1). <https://doi.org/doi:10.1128/ecosalplus.3.2.2>
- Vazquez-Torres, A. et Fang, F. C. (2001, 2001/11/01/). *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes and Infection*, 3(14), 1313-1320.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01492-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01492-7)
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Bäuml, A. J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W. T. et Fang, F. C. (1999, Oct 21). Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401(6755), 804-808. <https://doi.org/10.1038/44593>
- Wan, F., Feng, X., Yin, J. et Gao, H. (2021, 2021-May-07). Distinct H₂O₂-Scavenging System in *Yersinia pseudotuberculosis*: KatG and AhpC Act Together to Scavenge Endogenous Hydrogen Peroxide [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.626874>

- Wang, Y. F., Tang, Z. H., Li, T., Xu, X. H., Chen, X., Wang, Y., Wang, Y. T. et Lu, J. J. (2017, 2017/12/01). Baicalein protects tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity dependent of reactive oxygen species removal. *Molecular Medecine Reports*, 16(6), 8392-8398. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7592>
- Weening, E. H., Barker, J. D., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Tsolis, R. M. et Bäumlér, A. J. (2005, Jun). The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infectiology and Immunology*, 73(6), 3358-3366. <https://doi.org/10.1128/iai.73.6.3358-3366.2005>
- Wilson, R. P., Raffatellu, M., Chessa, D., Winter, S. E., Tükel, C. et Bäumlér, A. J. (2008, Apr). The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cell Microbiology*, 10(4), 876-890. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01090.x>
- Yagi, T. et Matsuno-Yagi, A. (2003). The Proton-Translocating NADH–Quinone Oxidoreductase in the Respiratory Chain: The Secret Unlocked. *Biochemistry*, 42(8), 2266-2274. <https://doi.org/10.1021/bi027158b>
- Yue, M., Rankin, S. C., Blanchet, R. T., Nulton, J. D., Edwards, R. A. et Schifferli, D. M. (2012). Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro- and microevolution. *PLoS One*, 7(6), e38596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038596>
- Zhang, Y., Chong, X., Xia, L., Lu, R., Osei-Adjei, G., Zhang, Y. et Huang, X. (2018, 2018/11/01/). OxyR positively and directly regulates Vi polysaccharide capsular antigen in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Microbial Pathogenesis*, 124, 191-197. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.050>
- Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L. et Yu, Z. B. (2019, 2019/07/01). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medecine*, 44(1), 3-15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>
- Zhao, W., Feng, H., Sun, W., Liu, K., Lu, J. J. et Chen, X. (2017, Apr). Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) induced apoptosis and necroptosis in endothelial cells: Roles of NOX4 and mitochondrion. *Redox Biol*, 11, 524-534. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.036>
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A. et Storz, G. (2001, Aug). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4562-4570. <https://doi.org/10.1128/jb.183.15.4562-4570.2001>

Annexes

Création d'un mutant par échange allélique

Exemple avec le mutant peroxydase AhpC

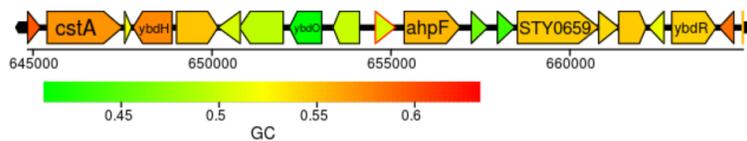
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhi str. CT18

ahpC - alkyl hydroperoxide reductase subunit C

Position: 654566..655129 Length: 564 bp. (187 amino acids)

Genomic context (fragment size: 20000 bp.)

Shown is a diagrammatic representation of the genes in the region surrounding ahpC (positions 644848-664847). The genes are coloured by GC. Mouseover the image to view annotation of genes.



```
>lcl||STY0653|ahpC|72985681 alkyl hydroperoxide reductase subunit C
```

```
ATGTCCTTAATTAACACCAAAATCAAACCTTTCAAAAACCAGGCGTTCAAAAACGGTGAA
TTCATTGAAGTCACCGAGAAAGATACCGAAGGCCGCTGGAGCGTCTTCTTCTTCTACCCG
GCCGATTTTACCTTTGTTTGCCCGACTGAACTGGGTGACGTTGCCGACCATTACGAAGAA
CTGCAGAAGCTGGGCGTAGACGTTTATTCCGTCTCAACCGATACTCACTTTACGCACAAA
GCATGGCACAGCAGCTCTGAAACTATCGCAAAAATCAAATATGCGATGATCGGCGACCCG
ACTGGCGCCCTGACCCGTAACCTTCGACAACATGCGTGAAGATGAAGGCCTGGCAGACCGT
GCGACCTTTGTTGTTGACCCGAGGGTATCATTAGGGCGATCGAAGTTACCGCTGAAGGT
ATCGGCCGCTGACGCGTCTGACCTGCTGCGTAAAATTAAGCAGCACAGTATGTTGCCGCT
CACCCAGGCGAAGTATGCCCGGCGAAATGGAAAGAAGGTGAAGCGACTCTGGCTCCATCC
TTAGACCTGGTCGGTAAAATCTAA
```

```
>ahpC (Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18) plus
1000 bp. Upstream
```

```
cttcatctttcctgcgaggcttcatagtcattgccagggttttcgcccgggtttttcggcgctaaaatcgctgcggt
gtggccgggttttccggtttaatacgcgcgaccagtaattgtgcgtaattgtaccttgccgattcgaccacggac
gagcttggtgcaaaaactgcttacaataggggcagaaaggatcggcaaacacatacagcaccaccggcgctcttt
tttaccgtcgagtatccatgacgctttttccattttctgccacatttcacgtccggctggcgcatagatctctttt
tctatcagggcggttgctaagatttttcacctttttcattatacatatagccggaaaatcgcggtgtttaccgtccggcg
tcaggtaaatcgctgacgcccataatcctgatactttccgagatagcccttcatgccccccggcgctcgaaggattt
caggattgttatgctctgtttttcaatggctttaaccagcgcaggcaggttcttccgctggggcgagaatgggcagc
atagcaagcagcaatgtacgttttaatacatatcttttttcttttaatatcaaagcgaagagattaatgatgatgcc
tatcgagacataggttaagagctggcgtgccaggattgccctttctgtgctgggggtgatgtaatccttttcgctgt
```

tacagcctttgttaaggtaatgtagagcgcaacacttagccagcatatacgctatggatttcgagtgccagggcaat
 acgctgccatttgcaagacgagtcgtactggctctgaagttacctacgggtagttcaggtaatggggccgctgt
 caggcggccttttacttttagatggctgacagggcgagtggtcacaatgtcgccgaatcgggttgtagttaac
 gcttattgatttgataatggaaacgcattagccgaatcagcaaaatttcgtaacttactcctcaacgaaaacacg
 gaggaagtatagATGTCCTTAATTAACACCAAAATCAAACCTTCAAAAACCGGCGTTCAAAAACGGTGAATTCA
 TTGAAGTACCCGAGAAAGATACCGAAGGCCGCTGGAGCGTCTTCTTCTTCTACCCGGCCGATTTACCTTTGTTG
 CCGGACTGAACTGGGTGACGTTGCCGACCATTACGAAGAACTGCAGAAGCTGGGCGTAGACGTTTATTCCGTCTCA
 ACCGATACTCACTTTACGCACAAAGCATGGCACAGCAGCTCTGAAACTATCGCAAAAATCAAATATGCGATGATCG
 GCGACCCGACTGGCGCCCTGACCCGTAACCTCGACAACATGCGTGAAGATGAAGGCCTGGCAGACCGTGCGACCTT
 TGTTGTTGACCCGAGGGTATCATTAGGGCGATCGAAGTTACCGCTGAAGGTATCGGCCGTGACGCGTCTGACCTG
 CTGCGTAAAAATTAAGCAGCACAGTATGTTGCCGCTCACCCAGGCGAAGTATGCCCGCGAAATGGAAAGAAGGTG
 AAGCGACTCTGGCTCCATCCTTAGACCTGGTCGGTAAATCTAAatttccgctcgtctttcacgccatagctgcgtt
 ggcgcttgccctgctcaccgggtcacttacttcagtaagctcccggggattctcaggttagccgccttactctgacg
 tgaaatactttggaaattgtttcagtcatgggcgcatccgcgccatttcatctcagcaccatgacgcaagttgca
 ttaatgcagtcgccggaagtccggttgcatgatgatgttttcagagaggggaagaagaatgctcgacacaaaatgca
 aaaccagctcagggcttaccttgagaaaactgaccaaacctgttgagctgattgccacgctggatgacagcgctaa
 atcggcggaatcaaggaaactgctggctgaaatcgccgagctgtccgacaaaagtcacatttaaagaagacaatact
 ctgcccgtgcgcaagccgtcttttctgattacgaatccaggctctcagcagggggccgcgcttttgccggttctccgc
 tgggccaagaaatctacctcgctgggtttggcggttgctgtggaccggcggtcatccgtcaaaagaagcgcagtcgct
 gctggagcagattcgcgatattgacggcgattttgaaatcgaaacttatttactctcctgcccataactgcccg
 gacgtagtcagggcgtgaacctgatggcggtgctgaaccgcgtattaaacatacggcaattgatggcgccacct
 tccagaacgaaatcaccgaacgtaacgtgatggcggttccggcggtgtttgtcaacggtaaaagagttcggccaggg
 acgtatgactctgaccgagattgtcgctaaagtgatactggcgagaaaaacgtgcccgggaagcgtgaacaaa
 cgcgatgcgtatgacgtgctgattgtcggtccggcccggcgggcgggcgggcggtctactcggcgcgcaaaag
 gcatccgtaccggctgatgggagcgccttcggcggtcaggtgctggataccgtg

- ahpC F1** aaacgcattagccgaatcag
- ahpC R2** GTCGGGCAAACAAAGGTAAA
 W : TTTACCTTTGTTTGCCCGAC
- ahpC F3** GTCTGACCTGCTGCGTAAAA
- ahpC R4** acgtcagagtaaggcggtc
 W : tagccgccttactctgacgt

Résultats de la sensibilité au peroxyde d'hydrogène

Diamètre d'inhibition mesuré après 24 heures

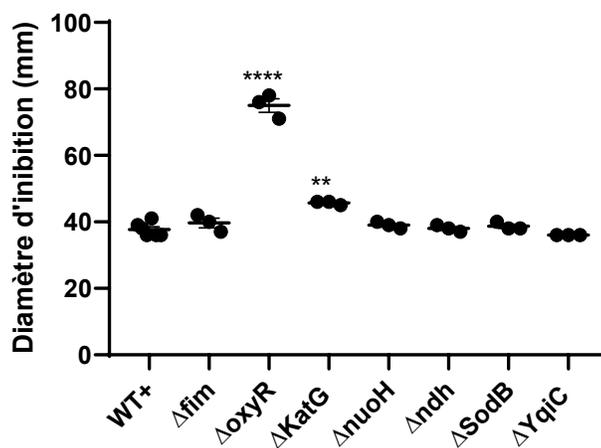
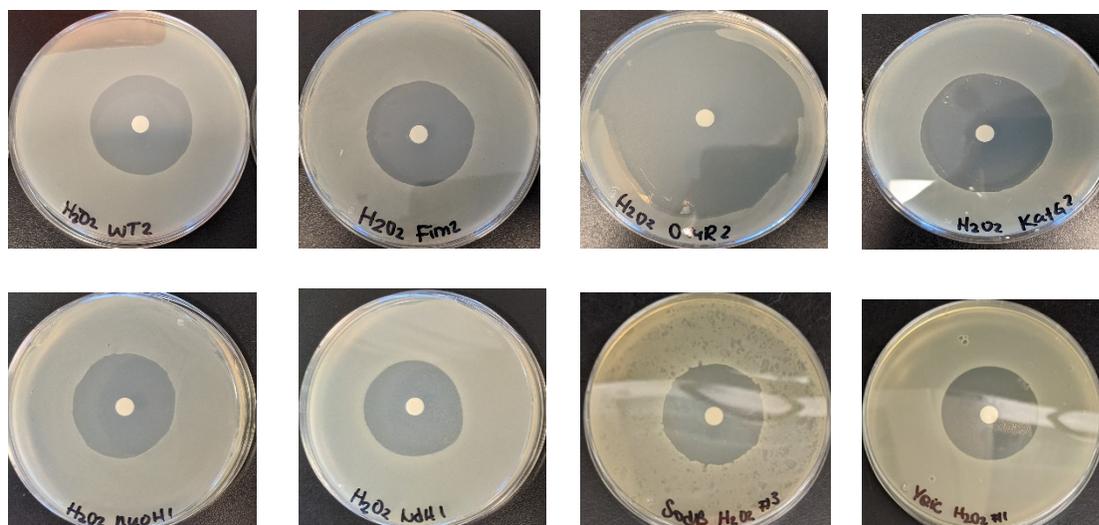


Figure 23. – Compilation des résultats obtenus en triplicatas

Les données présentées sont le taux \pm l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatas. Les essais sont significatifs lorsque $P < 0,05$ (*), déterminé par un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT). Le mutant *fim pfim :lacZ* est utilisé comme un contrôle interne.