

Université de Montréal

Détermination des facteurs essentiels à la formation du biofilm de *Salmonella enterica*  
sérovary Typhi

*Par*

Magdalena Laekas-Hameder

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en microbiologie et immunologie

Décembre 2023

© Magdalena Laekas-Hameder, 2023

Université de Montréal

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie.

Faculté de Médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Détermination des facteurs essentiels à la formation du biofilm de *Salmonella enterica* sérovar Typhi**

*Présenté par*

**Magdalena Laekas-Hameder**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Dre Marylise Duperthuy**

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Université de Montréal  
Présidente-rapporteur

**Dre France Daigle**

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Université de Montréal  
Directrice de recherche

**Dr Salim Timo Islam**

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Examineur externe

## Résumé

*Salmonella enterica* sérovar Typhi est une bactérie à Gram négatif qui cause la maladie systémique nommée fièvre typhoïde. Cette maladie affecte environ 9 millions de personnes par année et se propage par la voie fécale-orale par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. Ainsi, la fièvre typhoïde est particulièrement problématique dans les pays ayant des systèmes d'assainissement peu efficaces. Elle peut être traitée par des antibiotiques, mais comme pour de nombreuses bactéries, la résistance est de plus en plus commune. À la suite d'une infection aiguë, environ 5% des patients deviennent porteurs chroniques asymptomatiques grâce à la formation de biofilms dans la vésicule biliaire et excrètent la bactérie dans leurs selles continuellement. Étant le seul réservoir connu de *S. Typhi*, cet état constitue une source importante de persistance et de propagation de la maladie. L'état de porteur est intraitable par antibiotiques en raison de la haute tolérance aux stress des biofilms et une chirurgie pour enlever la vésicule biliaire est souvent la solution la plus efficace.

Il est connu que les biofilms de *Salmonella* contiennent principalement de la cellulose, des fimbriae curli, de l'acide colanique et des protéines BapA. Cependant, *S. Typhi* a accumulé de nombreux pseudogènes au cours de son évolution humain-spécifique, dont certains sont impliqués dans la biosynthèse de composants communs de biofilm chez *Salmonella*, comme la cellulose et l'acide colanique. Il est également proposé que l'expression de curli soit dysfonctionnelle chez *S. Typhi*. La production de biofilms chez cette souche n'a jamais été caractérisée dans des conditions *in vitro* optimisées. Par conséquent, nous supposons que les biofilms de *S. Typhi* soient uniques dans leur production et leur composition.

Cette étude caractérise la composition et la structure d'un biofilm de *S. Typhi in vitro*. Nous déterminons qu'aucun composant de biofilm communément identifié chez *Salmonella* ne joue un rôle majeur dans les biofilms de *S. Typhi*. Nous identifions un rôle important pour l'ADN extracellulaire et l'intégrité des LPS.

**Mots-clés :** *S. Typhi*, biofilm, vésicule biliaire, porteur chronique, polysaccharides, lipopolysaccharide (LPS), ADN

## Abstract

*Salmonella enterica* serovar Typhi is a Gram-negative rod-shaped bacterium that causes the systemic disease of typhoid fever. This disease affects about 9 million people per year and is spread through the fecal-oral route by ingestion of contaminated food or water. Thus, typhoid fever is particularly problematic in countries with poor sanitation systems. It is currently treatable by antibiotics but as with many other bacteria, resistance is becoming more and more common. Following acute infection, ~5% of patients become chronic asymptomatic carriers through biofilm formation in the gallbladder and continuously shed the bacteria in their feces. Being the only known reservoir of *S. Typhi*, this is an important source of persistence of the disease in endemic areas and propagation to new areas. The carrier state is untreatable by antibiotics due to the high stress tolerance of biofilms. Gallbladder-removal surgery is often the most efficient solution.

*Salmonella* biofilms are known to primarily contain cellulose, curli fimbriae, colanic acid and BapA proteins. However, *S. Typhi* evolved to be human-specific over time and has accumulated many pseudogenes in the process, some of which are genes in the biosynthetic pathways of biofilm-related components of *Salmonella*, such as cellulose and colanic acid. It is also proposed that curli expression is dysfunctional in *S. Typhi*. Biofilm production in this strain has never been characterized in optimized *in vitro* conditions. Therefore, we hypothesized that *S. Typhi* biofilms are unique in their production and composition.

This study characterizes *S. Typhi* biofilm composition and structure *in vitro*. We determine that no biofilm components commonly identified in other bacteria play a major role in *S. Typhi* biofilms. We identify an important role for extracellular DNA and lipopolysaccharide-layer integrity.

**Keywords:** *S. Typhi*, biofilm, gallbladder, chronic carrier, polysaccharides, lipopolysaccharide (LPS), eDNA

# Table des matières

Résumé .....	3
Abstract .....	4
Table des matières .....	5
Liste des tableaux .....	8
Liste des figures .....	9
Liste des sigles et abréviations .....	10
Remerciements .....	13
1. Introduction .....	14
1.1 Généralités.....	14
1.1.1 <i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi .....	14
1.1.2 Pathogenèse.....	15
1.1.3 Porteurs chroniques asymptomatiques .....	15
1.1.4 Résistance à la bile .....	16
1.2 Biofilms chez <i>Salmonella</i> .....	18
1.2.1 Développement et structure.....	18
1.2.2 Composition .....	20
1.2.3 Signalisation impliquée dans la formation de biofilm .....	25
1.2.4 Un modèle de biofilm pour <i>S. Typhi</i> .....	27
1.3 Polysaccharides de surface de <i>S. Typhi</i> .....	28
1.3.1 Acide colanique.....	28
1.3.2 Antigène commun enterobactérien (ECA) .....	30
1.3.3 Antigène Vi .....	32

1.3.4	Capsule antigène O.....	35
1.4	Revue de littérature en préparation: Quel est le rôle des LPS dans les biofilms d' <i>E. coli</i> et de <i>Salmonella</i> ? .....	36
1.4.1	Abstract .....	36
1.4.2	Introduction .....	37
1.4.3	An overview of LPS biosynthesis .....	39
1.4.4	LPS glycoform influences biofilm formation in <i>E. coli</i> and <i>Salmonella</i> .....	44
1.4.5	Indirect biofilm factors are influenced by LPS glycoform .....	47
1.4.6	In search of an explanation for the delay in biofilm production .....	49
1.4.7	Conclusion.....	50
1.4.8	References .....	51
2.	Problématique et objectifs.....	52
3.	Biofilm formation in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi does not depend on cellulose, curli fimbriae nor colanic acid, but is influenced by LPS glycoform ( <i>Publication en préparation</i> ) .....	53
3.1	Abstract .....	53
3.2	Introduction .....	54
3.3	Results .....	55
3.4	Discussion .....	62
3.5	Conclusion.....	65
3.6	Materials and methods .....	66
3.7	References .....	68
4.	Discussion globale.....	69
4.1	Rôles de la bile, du glucose et du chlorure de potassium.....	69
4.2	Rôles structurels de l'ADN extracellulaire et des protéines .....	70
4.3	Rôle des composants les plus communs de biofilms de <i>Salmonella</i> .....	71
4.4	Rôles des polysaccharides de surface cellulaire.....	73

4.5	Le rôle de LPS dans les biofilms de <i>S. Typhi</i> .....	74
4.6	Limites de l'analyse par coloration fluorescente.....	76
5.	Conclusions et perspectives .....	78
	Références bibliographiques .....	79
	Annexes.....	97

## Liste des tableaux

<b>Table 1</b> – Biofilm production levels of LPS mutants in <i>Salmonella</i> and <i>E. coli</i> .....	45
<b>Table 2</b> – Motility, adhesion and auto-aggregation phenotypes in <i>Salmonella</i> and <i>E. coli</i> LPS mutants.....	47



# Liste des figures

## MÉMOIRE

<b>Figure 1</b>	Représentation schématique de la machinerie de biosynthèse de la cellulose de <i>S. Typhimurium</i> . Tiré de (Ahmad et al. 2016) avec reproduction autorisée sans permission selon une «creative commons license ».....	21
<b>Figure 2</b>	Schématisation de la biosynthèse de l'acide colanique chez <i>E. coli</i> .....	30
<b>Figure 3</b>	Structure de l'ECA sous les formes ECA <sub>CYC</sub> , ECA <sub>PG</sub> , et ECA <sub>LPS</sub> .....	31
<b>Figure 4</b>	Organisation des gènes de biosynthèse de l'antigène Vi de <i>S. Typhi</i> . ....	33
<b>Figure 5</b>	Organisation des gènes de biosynthèse de la capsule antigène O chez <i>Salmonella</i> ...36	

## REVUE DE LITTÉRATURE (Section 1.4)

<b>Figure 1</b>	– Schematic representation of lipopolysaccharide location at the cell surface.....	39
<b>Figure 2</b>	– Overview of LPS lipid A and inner core biosynthesis in <i>S. Typhimurium</i> and <i>E. coli</i> ...40	
<b>Figure 3</b>	– Overview of LPS outer core biosynthesis in <i>E. coli</i> K-12 and <i>S. Typhimurium</i> .....41	
<b>Figure 4</b>	– Schematic representation of O-antigen translocation and polymerization pathways...43	
<b>Figure 5</b>	– Hypothetical cartoon of uncapped <i>S. Typhimurium</i> LPS glycoform resulting from deletions of <i>waaL</i> , <i>waaK</i> , <i>waaJ</i> , <i>waal</i> , <i>waaG</i> , <i>waaF</i> and <i>waaC</i> , respectively.....44	

## PUBLICATION EN PRÉPARATION (Section 3)

<b>Figure 1</b>	– Assessment of <i>S. Typhi</i> biofilm media and cell viability.....	56
<b>Figure 2</b>	– Enzymatic treatment of <i>S. Typhi</i> wild-type biofilms.....	57
<b>Figure 3</b>	– Assessment of <i>S. Typhi</i> mutant biofilms – Common <i>Salmonella</i> biofilm components .....58	
<b>Figure 4</b>	– Assessment of <i>S. Typhi</i> biofilms – Surface polysaccharide mutants.....	60
<b>Figure 5</b>	– Biomass of <i>S. Typhi</i> LPS mutant biofilms.....	61

## Liste des sigles et abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNe : ADN extracellulaire

AI : auto-inducteur

ARN : acide ribonucléique

Bap : protéine associée aux biofilms

BER : système de réparation par excision de bases

c-di-GMP : diguanylate cyclique

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

ECA : antigène commun entérobactérien

ECA<sub>CYC</sub> : ECA cyclique

ECA<sub>LPS</sub> : ECA lié aux molécules de lipopolysaccharides

ECA<sub>PG</sub> : ECA lié au peptidoglycane

EPI/NE : épinéphrine/norépinéphrine

EPS : substances extrapolymeriques

LPS : lipopolysaccharide

MDR : *multidrug resistant* (multirésistant aux médicaments)

PI : iodure de propidium

SR : SyproRuby

sRNAs : *small non-coding RNAs* (petits ARNs non-codants)

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

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

TCS : *two-component system* (système à deux composantes)

WGA : *wheat-germ agglutinin*

WHO : *World Health Organization* (Organisation Mondiale de la Santé)

WT : *wild type* (souche sauvage)

XDR : *extensively drug resistant* (ultrarésistant aux médicaments)

*“It gave as much to me as it took”*

*Jimmy Page*

## Remerciements

J'aimerais d'abord remercier les membres de jury de ce mémoire, Dre Marylise Duperthuy et Dr Salim Timo Islam. Votre précieux temps et considération m'aideront sans doute à devenir une meilleure scientifique.

À ma directrice de recherche Dre France Daigle, je serai à jamais reconnaissante des opportunités que vous m'avez offertes, de votre patience envers moi dans les moments difficiles et la confiance que vous aviez eu en moi lorsque que je ne l'avais pas moi-même.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire devenues amies, Camille et Gabrielle. Nos discussions quotidiennes m'ont soutenu bien plus que vous ne le pensez. Merci de votre écoute et de vos partages.

Merci à mes meilleures amies – Daphne, Bruna et Tanya. Sincèrement, je ne serais pas là où je suis sans vous.

Je remercie également ma famille de toujours être là malgré les hauts et les bas. À ma mère Alison et à ma cousine Jordan – votre support inconditionnel tout au long de mon parcours a été essentiel à mon bien-être.

Caroline et Éric, merci pour tout. Vous avez tous les deux changé ma vie pour le mieux.

Et bien sûr, merci Jérôme.

# 1. Introduction

## 1.1 Généralités

### 1.1.1 *Salmonella enterica* sérovar Typhi

*Salmonella* est un genre bactérien regroupant deux espèces de bacilles à Gram négatifs dans la famille des *Enterobacteriaceae* : *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*. L'espèce *Salmonella enterica* peut être divisé en six sous-espèces, qui peuvent ensuite être divisés en sérovars. La sous-espèce *enterica* contient 1547 sérovars dont 99% sont des pathogènes humains ou animaux importants. La majorité causent une gastroentérite, mais certains causent une fièvre systémique (Chattaway et al., 2021; Ferrari et al., 2019).

Une infection à *Salmonella enterica* sérovar Typhi (*S. Typhi*) cause la maladie systémique nommée la fièvre typhoïde, dont les principaux symptômes sont de la fièvre élevée, de la fatigue, des maux de tête, des nausées, des douleurs abdominales et soit de la constipation ou de la diarrhée. La maladie se transmet par la voie fécale-orale lors de l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, elle est donc surtout endémique dans des régions qui n'ont pas accès à de l'eau potable. Environ 9 millions de personnes tombent malade de la fièvre typhoïde à chaque année et même étant traitable par antibiotiques, 110 000 personnes en meurent (WHO, 2023). L'émergence de souches résistantes à plusieurs antibiotiques de première ligne (« multi-drug resistant » et « extensively drug resistant ») est de plus en plus commune chez *S. Typhi* (Klemm et al., 2018).

*S. Typhi* se démarque de la plupart des autres sérovars de *S. enterica* par sa spécificité d'hôte. En effet, le sérovar Typhi est un des cinq sérovars ne pouvant infecter que les êtres humains (Gal-Mor et al., 2014). Il est proposé qu'à travers l'évolution, les sérovars hôte-spécifiques aient divergé de leurs ancêtres à large spectre d'hôte par accumulation de pseudogènes (Gal-Mor et al., 2011; Holt et al., 2009; McClelland et al., 2004). Un pseudogène est une version non fonctionnelle d'un gène causé par une mutation ou une délétion dans la séquence du gène (Feng et al., 2022). *Salmonella* possède en moyenne entre 1 et 8% de pseudogènes dans son génome. *S. Typhi* se situe dans la portion supérieure de ce spectre avec 204 pseudogènes, représentant environ 5% de ses séquences codantes (Deng et al., 2003; McClelland et al., 2004; Parkhill et al., 2001). Cela est surtout intéressant car 23% de ces gènes sont impliqués dans la virulence et dans l'interaction avec

l'hôte chez d'autres *Salmonella*, ce qui suggère que ces polymorphismes jouent un rôle dans la spécificité de l'infection (Parkhill et al., 2001).

### **1.1.2 Pathogénèse**

*S. Typhi* se transmet par la consommation d'eau et d'aliments contaminés. Rendues dans l'estomac, les bactéries qui résistent aux enzymes digestifs et aux conditions acides se rendent dans l'intestin et traversent la paroi par l'invasion de cellules M (Hoffman et al., 2023; Sprinz et al., 1966). Contrairement à la majorité des autres sérovars de *Salmonella*, une caractéristique importante de la pathogénèse de *S. Typhi* chez l'humain est l'absence d'inflammation dans les premières étapes de l'infection. Avant que les symptômes de la typhoïde apparaissent, *S. Typhi* évade le système immunitaire pendant 9 à 21 jours en moyenne (Awofisayo-Okuyelu et al., 2018). En traversant les cellules M, *S. Typhi* accède au système lymphatique et ensuite à la circulation sanguine (Gaines et al., 1968; Hoffman et al., 2023; Levine et al., 1983). Dissimulé à l'intérieur de macrophages, *S. Typhi* se disperse par le sang et peut envahir des organes comme le foie et la vésicule biliaire.

### **1.1.3 Porteurs chroniques asymptomatiques**

Au cours du temps, *S. Typhi* a divergé de ses ancêtres pour devenir humain-spécifique et, à ce jour, ne possède aucun autre réservoir connu (Holt et al., 2009). En effet, le seul réservoir de la bactérie dans l'environnement est le porteur chronique asymptomatique. Cet état survient dans environ 5% des cas à la suite d'une infection aiguë et représente une source importante de persistance et de propagation de la maladie (Levine et al., 1982). L'exemple le plus populaire de porteur chronique de la fièvre typhoïde est Mary Mallon, aussi connue sous le nom de « Typhoid Mary ». Mary était une chef cuisinière dont environ une centaine de clients ont attrapé la fièvre typhoïde dans l'état de New York aux États-Unis au début des années 1900 (Marineli et al., 2013; Wald, 1997). Malgré qu'elle ne présentait aucun symptôme de la maladie, la transmission à grande échelle lui a été attribuée en raison d'une détection de *S. Typhi* dans ses selles à plusieurs reprises (Marineli et al., 2013; Soper, 1939). Elle était donc atteinte d'une infection asymptomatique de la

typhoïde et propageait la maladie par un manque d'hygiène. Mary est décédée en 1938 après 30 ans de quarantaine involontaire (Marineli et al., 2013; Soper, 1939).

Au début des années 1900, il était connu qu'une infection à la typhoïde pouvait avoir des effets néfastes sur la vésicule biliaire (Erdmann, 1903; Hawkins, 1897; Nichols, 1916). Avec le temps, des bactériologistes et des médecins ont établi un lien entre l'état de porteur chronique de la typhoïde et le cancer de la vésicule biliaire (Axelrod et al., 1971; Nath et al., 1997; Welton et al., 1979), avec un risque augmenté associé à la présence de calculs biliaires (Dutta et al., 2000; Schiøler et al., 1983). Ce n'est qu'en 2002 qu'un groupe de chercheurs ont démontré la formation de biofilms de *S. Typhi* sur des calculs biliaires *in vitro* (Prouty et al., 2002) et en 2010 que des biofilms de *S. Typhi* ont été observés sur des calculs biliaires venant de patients porteurs chroniques (Crawford et al., 2010). Cela a donc confirmé qu'une infection chronique à la typhoïde est au moins partiellement liée à la formation d'un biofilm dans la vésicule biliaire par *S. Typhi*.

Cela explique aussi pourquoi l'état de porteur chronique est très difficile à éradiquer, car le biofilm dans la vésicule biliaire permet aux bactéries de résister aux antibiotiques. En effet, un traitement aux antibiotiques dans la phase aiguë de l'infection ne prévient pas l'infection chronique. De plus, un traitement qui semble éliminer la bactérie est souvent suivi d'une rechute peu de temps après (Armijo et al., 1967; Hoffman et al., 2023; Woodward et al., 1950). Une cholécystectomie, opération pour enlever la vésicule biliaire, est souvent la solution la plus efficace pour résoudre l'état de porteur chronique (Freitag, 1964; Gonzalez-Escobedo et al., 2011). Cependant, entre 20 et 30% de patients ayant eu une cholécystectomie excrètent encore *S. Typhi* par la suite. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la vésicule biliaire n'est pas le seul endroit du corps humain que *S. Typhi* peut coloniser à long terme. Il a aussi été démontré que certains porteurs chroniques sont atteints au niveau des reins et que d'autres font preuve d'une co-infection parasitaire-bactérienne dans le foie (Hoffman et al., 2023).

#### **1.1.4 Résistance à la bile**

Lorsque *S. Typhi* atteint l'intestin et la vésicule biliaire, elle est exposée à de fortes concentrations de bile. La bile est une sécrétion de cellules du foie et est principalement composée d'eau, de sels biliaires, de bilirubine et de cholestérol. Elle est transférée dans la vésicule biliaire



pour se faire concentrer, dans le but d'être secrétée dans la lumière de l'intestin par la suite (Boyer, 2013). Plusieurs bactéries pathogènes entériques entrent en contact avec de la bile lors de l'infection du tractus intestinal et peuvent y résister efficacement. En fait, plusieurs bactéries utilisent même le contact avec la bile comme signal de localisation (Sistrunk et al., 2016; Tsai et al., 2020). Avant tout, il est proposé que la détection de la bile soit exécutée par le système à deux composants PhoP-PhoQ (Murata et al., 2007; Tsai et al., 2020; Velkinburgh & Gunn, 1999). La détection de la bile permet la production de signaux induisant l'expression de facteurs de résistance. Chez *Salmonella*, la résistance se produit par l'utilisation de pompes à efflux, de modifications dynamiques de la membrane externe, et de systèmes de réparation de l'ADN (Hernández et al., 2012; May & Groisman, 2013). Les pompes à efflux impliquées dans la résistance à la bile chez *Salmonella* incluent principalement AcrB, AcrD, TolA, TolC et EmrAB (Baucheron et al., 2014; Nikaido et al., 2008; Sistrunk et al., 2016). Ceux-ci dégagent le cytoplasme de la bile qui a pu rentrer par les porines de la membrane externe OmpF et OmpC. Similairement, une autre stratégie de tolérance à la bile consiste de réduire l'expression de ces porines pour que la bile ait moins accès au cytoplasme (Ray et al., 2019; Sistrunk et al., 2016). En effet, la limitation de l'entrée de la bile à l'intérieur de la cellule par l'altération de la composition de la membrane externe est la façon la plus efficace de tolérer la présence de la bile dans l'environnement. Quelques-unes de ces altérations avantageuses incluent la modification des LPS dans la membrane externe par PagP, la biosynthèse de nouvelles molécules de LPS modifiées par le système PmrA-PmrB (Gunn & Miller, 1996; Hernández et al., 2012; May & Groisman, 2013) et l'incorporation de davantage d'antigène commun entérobactérien (ECA) sous forme cyclique dans le périplasme (Mitchell et al., 2018; Ramos-Morales et al., 2003; Rychlik & Barrow, 2005). Si la bile réussit à entrer dans la cellule et à endommager l'ADN, des systèmes de réparation de l'ADN sont utilisés pour optimiser la survie de la bactérie. Chez *Salmonella*, ceux-ci incluent le système de réparation par excision de bases (BER) impliquant les activités de l'exonucléase XthA et l'endonucléase Nfo (Prieto et al., 2006; Suvarnapunya et al., 2003). L'exposition à de la bile peut aussi induire du stress oxydatif et ainsi activer les systèmes de dommages oxydatifs OxyR et SoxSR (Prieto et al., 2006).

Il est aussi proposé que la détection de la bile par PhoP-PhoQ induit une cascade de phosphorylation augmentant la quantité de diguanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) à l'intérieur de la cellule (Tsai et al., 2020). Chez la plupart des *Salmonella*, ceci promeut la formation de biofilm par l'activation de CsgD et AdrA, des régulateurs principaux de production

de substances extrapolymeriques (EPS) (Karatan & Watnick, 2009; Tsai et al., 2020). La formation de biofilms est un mécanisme de résistance à la bile, car le biofilm enrobe la cellule d'une matrice extracellulaire et peut la protéger contre les stress environnementaux (Gipson et al., 2020).

## **1.2 Biofilms chez *Salmonella***

Un biofilm est un mode de vie bactérien par lequel des cellules bactériennes se regroupent ensemble dans une matrice extracellulaire auto-produite. Vivre dans un biofilm permet une résistance accrue aux stress mécaniques et chimiques. Cela dit, la capacité de formation de biofilm constitue un avantage de survie pour *Salmonella*, ce qui est souligné par le fait que cette capacité est hautement conservée chez de nombreuses souches de ce genre (Harrell et al., 2020; MacKenzie et al., 2017). La composition et la production de biofilms est bien caractérisées chez plusieurs souches de *Salmonella*, majoritairement grâce à leur lien aux intoxications alimentaires. Les biofilms de *Salmonella* peuvent se développer sur des surfaces biotiques telles que les légumes et la viande, ainsi que sur des surfaces abiotiques telles que les éviers et les planches à découper (Harrell et al., 2020). Par conséquent, un manque d'hygiène lors de la préparation d'aliments peut conduire à des conditions parfaites pour le développement d'un biofilm et constitue donc une cause principale d'intoxication alimentaire. Il a même été démontré qu'à la suite d'un épisode de diarrhée causée par un empoisonnement alimentaire, des biofilms de *Salmonella* peuvent être retrouvés dans des toilettes malgré un nettoyage régulier avec produits nettoyants (Barker & Bloomfield, 2000). Cela démontre la forte résistance de ces biofilms aux facteurs de stress mécaniques et chimiques.

### **1.2.1 Développement et structure**

Dans le modèle classique de formation de biofilm à cinq étapes développé en 2002 (Sauer et al., 2002), l'adhésion d'une seule bactérie planctonique à une surface constitue la première étape. Cette fixation initiale est réversible, car la bactérie n'est pas encore résistante aux contraintes mécaniques. Cette étape est suivie par la transition vers un attachement irréversible au cours duquel l'expression des gènes de motilité cellulaire est réduite et les gènes de biofilm commencent à être exprimés. Les étapes trois et quatre consistent de deux étapes de maturation subséquentes étant caractérisées par des amas de cellules qui se développent par la suite en microcolonies. La

cinquième et dernière étape est appelée la dispersion et permet la libération de cellules du biofilm dans le but de coloniser de nouvelles surfaces (Sauer et al., 2002; Sauer et al., 2022).

Bien que ce modèle ait été utilisé pour expliquer efficacement le développement des biofilms chez de nombreuses espèces au fil du temps, il est largement reconnu que ce modèle est incomplet. En fait, nous savons maintenant que certains biofilms peuvent se former sans surface d'adhésion sous forme d'agrégats flottants (Kragh et al., 2023). De plus, ce modèle ne tient pas compte de la grande variété de facteurs de stress environnementaux qui ont pu rendre le milieu propice au développement d'un biofilm et les effets que ces facteurs peuvent avoir sur la structure et la forme du biofilm. En réponse à ces lacunes, un nouveau modèle a été proposé en 2022 (Sauer et al., 2022). Ce nouveau modèle plus inclusif permet de décrire la formation de toute sorte de biofilm en seulement trois étapes explicites : agrégation et attachement, croissance et accumulation, désagrégation et détachement.

La principale caractéristique discernant l'état de biofilm de l'état planctonique est la production de substances extrapolymeriques (EPS) (Beloin et al., 2008). Cela permet aux bactéries et à la biomasse extracellulaire de s'accumuler à la manière d'un échafaudage. À mesure que le biofilm se développe et que l'EPS continue de s'accumuler, il peut s'étendre dans le sens de la longueur ou de la hauteur. De nombreux biofilms peuvent croître au point d'être visibles à l'œil nu (Percival et al., 2015). Un biofilm mature est une structure complexe et difficile à définir précisément. Différentes couches du biofilm peuvent représenter le microenvironnement du moment où elle a été produite, particulièrement dans des conditions biologiques qui sont en évolution constante. Chaque couche peut également évoluer au fil du temps. Par exemple, plus un biofilm devient épais, moins les couches profondes subissent un flux d'oxygène par rapport aux couches superficielles, ce qui peut changer l'état métabolique des bactéries au sein de cette couche (Beloin & Ghigo, 2005; Serra & Hengge, 2021). Cependant, ceci n'est pas toujours le cas, car le déplacement de substrats dans le biofilm dépend aussi de la densité de ce dernier. En fonction des conditions environnementales, les biofilms peuvent former des structures de canaux qui permettent l'écoulement de l'eau, des nutriments et de l'oxygène vers les couches plus profondes (Rooney et al., 2020; Wilking et al., 2013).

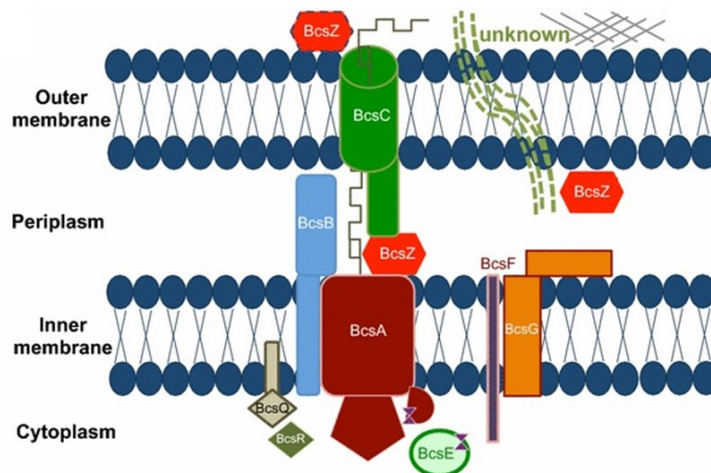
## 1.2.2 Composition

Comme la structure, la composition d'un biofilm peut varier selon l'espèce, l'environnement de croissance et le temps d'incubation. De plus, le contenu est dynamique et peut donc évoluer avec le temps et les conditions. De façon générale, les biofilms contiennent les quatre grandes classes de molécules : polysaccharides, acides nucléiques, protéines et lipides. Tous ces éléments sont liés dans un réseau complexe incluant les cellules qui les ont produits et aussi des composants environnementaux. Il est notamment difficile de caractériser précisément la composition des EPS, car c'est presque impossible de purifier des molécules individuelles à partir d'un entrelacement aussi complexe (Flemming et al., 2007). Malgré cela, au fil des années de recherche, certains composants récurrents majeurs de biofilm ont été identifiés. Chez les espèces de *Salmonella*, les composants polysaccharidiques comprennent souvent la cellulose et l'acide colanique. Les composants protéiques peuvent comprendre des protéines associées au biofilm (Baps) et des fimbriae curli (Latasa et al., 2005; Normark et al., 1998; Steenackers et al., 2012). Les composants d'acides nucléiques se présentent sous la forme d'ADN extracellulaire (ADNe) ou de débris cellulaires. Quant aux composants lipidiques, ils existent souvent en conjonction avec les sucres, comme dans les lipopolysaccharides ou les glycolipides (Beloin et al., 2008; Steenackers et al., 2012).

### 1.2.2.1 Exopolysaccharides

Les polysaccharides sécrétés, également appelés des exopolysaccharides, sont connus pour être le composant le plus abondant de la matrice d'un biofilm (Flemming et al., 2007; Rehman et al., 2021). Une analyse chimique de la partie polysaccharidique de l'EPS est souvent peu concluante en raison de la grande diversité des sucres et de la difficulté à les purifier (Flemming et al., 2007). Leur rôle au sein du biofilm est souvent décrit comme structurel et protecteur. Non seulement ils fournissent des éléments de base de l'échafaudage tridimensionnel du biofilm, mais ils peuvent également fournir aux bactéries une protection contre des prédateurs phagocytaires ou moléculaires. Ceci est possible grâce à un enrobement complet de la cellule, les rendant impossibles à reconnaître par des cellules immunitaires ou imperméables aux petites molécules toxiques comme les antibiotiques (Limoli et al., 2015; Singh et al., 2021).

Bien que leur diversité reste abondante au sein du biofilm, il existe quelques polysaccharides qui reviennent plusieurs fois dans les études et qui sont proposés de jouer un rôle essentiel dans le développement d'un biofilm. Chez *Salmonella*, ceux-ci incluent la cellulose, l'acide colanique et parfois la capsule d'antigène O (Steenackers et al., 2012). L'acide colanique et la capsule d'antigène O sont des polysaccharides associés à la surface de la cellule. Ils seront donc discutés en profondeur dans la section « 1.3 Polysaccharides de surface de *S. Typhi* ». D'autre part, la cellulose est un polysaccharide sécrété et consiste d'un polymère de glucose extrêmement stable qui peut résister à de fortes perturbations chimiques et physiques. Elle est produite par de nombreux eucaryotes et procaryotes et peut être considérée comme le plus abondant biopolymère sur la planète (Römling & Galperin, 2015). Chez les bactéries, elle est principalement encodée par l'opéron *bcs*. Cet opéron est assez variable en contenu de gènes d'une espèce à l'autre (Römling & Galperin, 2015), mais chez *S. Typhimurium*, il est constitué de deux portions : *bcsABZC* et *bcsEFG*. La transcription de ces opérons est régulée par MlrA et CsgD (MacKenzie et al., 2019). BcsA et BcsBCD sont les sous-unités catalytique et périplasmiques, respectivement, de la synthase de cellulose, tandis que BcsEFG sont des sous-unités cytoplasmiques et transmembranaires permettant de lier la c-di-GMP. BcsZ est une cellulase, enzyme pouvant dégrader la cellulose (Ahmad et al., 2016; Römling & Galperin, 2015).



**Figure 1** Représentation schématique de la machinerie de biosynthèse de la cellulose de *S. Typhimurium*. Tiré de (Ahmad et al. 2016) avec reproduction autorisée sans permission selon une «creative commons license ».

Chez la plupart des *Salmonella*, il a été démontré que la cellulose est un composant polysaccharidique nécessaire pour le développement de biofilms sur le verre, l'agar, les plantes et les cellules épithéliales (Barak et al., 2007; Jonas et al., 2007; Steenackers et al., 2012). Cependant, dans les modèles d'infection à la typhoïde utilisant *S. Typhimurium*, la cellulose n'est pas nécessaire pour la formation de biofilms sur des calculs biliaires (Prouty & Gunn, 2003). En fait, les souches de *S. Typhi* sont presque toujours négatives pour la production de cellulose par le test au colorant calcofluor en conditions de laboratoires standards (MacKenzie et al., 2019). Cela pourrait s'expliquer par un régulateur CsgD tronqué et dysfonctionnel chez le sérovar Typhi (MacKenzie et al., 2019; Ou et al., 2023). Néanmoins, il a été démontré chez *E. coli* et d'autres *Salmonella* que la biosynthèse de cellulose peut aussi se produire indépendamment de CsgD et il est suggéré que cela soit commun parmi les entérobactéries (Da Re & Ghigo, 2006; Varghese et al., 2020). Outre cela, il a aussi été démontré que plusieurs souches du sérovar Typhi contiennent une version pseudogène de *bcsC*, gène de biosynthèse de la cellulose (MacKenzie et al., 2019). Cela impliquerait que le sérovar Typhi soit incapable de produire de la cellulose, peu importe l'état de la régulation. À ce jour, il n'a jamais été démontré que *S. Typhi* produise de la cellulose et le principal composant polysaccharidique de ses biofilms reste un mystère.

### 1.2.2.2 Fimbriae curli

Les fimbriae curli sont des protéines amyloïdes et appendices de surface bactérienne produites par de nombreuses espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae*. Ils ont été découverts pour la première fois à la fin des années 1980 chez *E. coli* et ont été décrits comme de fins fimbriae agrégatifs (Collinson et al., 1992; Olsén et al., 1989), et ont ensuite été démontrés chez *Salmonella* (Doran et al., 1993). Ces fimbriae sont proposés de jouer un rôle dans la pathogenèse en favorisant l'attachement et l'invasion des cellules. En effet, ils sont communément appelés des adhésines en raison de leur capacité de moduler l'adhésion des bactéries aux surfaces (Barnhart & Chapman, 2006; Steenackers et al., 2012). Évidemment, l'adhésion est une caractéristique qui favorise la formation de biofilms et il est justement proposé que les fimbriae curli soient les principaux composants protéiques de la matrice extracellulaire. Chez *Salmonella*, il a été démontré que des fimbriae curli intactes sont nécessaires pour la formation d'un biofilm par le sérovar Typhimurium, surtout dans les premières étapes d'attachement et d'agrégation (Jonas et al., 2007; Steenackers et

al., 2012). La biosynthèse des fimbriae curli est encodée par deux opérons : *csgBAC* et *csgDEFG*. CsgD est le principal régulateur transcriptionnel positif de ces opérons. La sous-unité structurelle majeure CsgA est polymérisée par le nucléateur CsgB. CsgEFG sont des structures permettant l'assemblage et l'exportation de sous-unités curli. Plus spécifiquement, CsgE est une protéine accessoire de type chaperone, CsgG est une porine localisée dans la membrane externe et CsgF est une protéine qui guide la localisation de CsgB à la surface de la bactérie. (Barnhart & Chapman, 2006). Chez *E. coli* et d'autres sérovars de *Salmonella*, une délétion des gènes de biosynthèse de curli diminue la capacité de former un biofilm (Jonas et al., 2007; Kikuchi et al., 2005). Certains suggèrent même que curli et cellulose forment un complexe co-dépendant dans la matrice extracellulaire pour former l'échafaudage du biofilm (Saldaña et al., 2009; Steenackers et al., 2012; White et al., 2003). Cependant, d'autres suggèrent que la production de curli et la production de cellulose ont une relation inverse (Anriany et al., 2006; Gualdi et al., 2008).

La régulation de l'expression de curli est extrêmement complexe (Barnhart & Chapman, 2006), puis comme mentionné auparavant, le CsgD du sérovar Typhi est dysfonctionnel (Ou et al., 2023). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'expression de curli n'a jamais été démontré chez le sérovar Typhi en conditions de laboratoire standards. En fait, sur géloses supplémentées au rouge de Congo, une bactérie produisant des fimbriae curli forme des colonies rouges et rugueuses. Par exemple, *S. Typhimurium* et *E. coli* démontrent des phénotypes rouges et rugueux sur gélose rouge de Congo, tandis que *S. Typhi* forme des colonies blanches et lisses (Ou et al., 2023; Römling, Sierralta, et al., 1998). Cela suggère que le sérovar Typhi ne produirait pas de fimbriae curli.

### **1.2.2.3 Protéines associées aux biofilms (Baps)**

Les protéines associées aux biofilms (Baps) sont une classe de protéines bactériennes découvertes en 2001 lors d'une étude sur les biofilms de *S. aureus* (Cucarella et al., 2001). Les résultats de cette étude ont indiqué qu'une protéine sécrétée et associée au biofilm influençait positivement la formation de biofilms et que la délétion de ses gènes de biosynthèse affecte négativement le développement du biofilm. Ils ont nommé cette protéine Bap et depuis, chaque protéine présentant une homologie génétique et fonctionnelle à la Bap de *S. aureus* est appelée « Bap ». Les protéines « Bap » sont retrouvées dans plusieurs bactéries et sont généralement bien conservées. Quelques exemples incluent la protéine Mus-20 de *P. putida*, la protéine Esp de *E.*

*faecalis* et la protéine LapA de *P. fluorescens* (Guttula et al., 2019; Lasa & Penadés, 2006). Chez *Salmonella*, la première découverte d'un Bap, appelée BapA par la suite, a été rapportée en 2005 (Latasa et al., 2005). Ils ont démontré que BapA est un joueur essentiel dans la formation de biofilms chez *S. enterica* sérovar Enteritidis. Une étude de 2011 sur l'expression de BapA chez différents sérovares de *S. enterica* a indiqué que le gène de biosynthèse *bapA* était conservé chez au moins 34 sérovares différents, dont Typhi et Typhimurium (Biswas et al., 2011). Cependant, chez *S. Typhimurium*, BapA ne semble pas jouer de rôle majeur dans la formation de biofilm car une délétion de *bapA* n'affecte pas la quantité ni la structure du biofilm produit dans des conditions de laboratoire standards (Jonas et al., 2007). Quant au sérovar Typhi, peu est connu sur sa protéine BapA, à part le fait qu'elle est contenue deux unités répétitives de moins que la BapA du sérovar Enteritidis (Wagner & Hensel, 2011).

Une étude sur la structure et la stabilité de la protéine BapA chez *S. Typhimurium* a démontré que BapA contient des domaines de type immunoglobuline et que sa stabilité dépend de la présence de calcium. Ils ont aussi démontré que certains domaines de la protéine se déplient lorsque la protéine subit un stress mécanique. Entièrement dépliée, cette protéine peut atteindre une circonférence d'environ 1,3  $\mu\text{m}$  (Guttula et al., 2019). Les résultats de cette étude suggèrent que BapA joue un rôle dans la mécano-détection et la résistance aux perturbations mécaniques, car les changements de conformation observés étaient directement liés au stress mécanique que la protéine subissait. Ainsi, BapA pourrait être un facteur important dans la compréhension de la résistance physique des biofilms de *Salmonella*. Par rapport à la régulation de l'expression de BapA, peu est connu, mais il a été démontré que son expression est liée à celle de CsgD, et donc à la production de curli et de cellulose (Latasa et al., 2005).

#### 1.2.2.4 ADN extracellulaire

Chez les bactéries à Gram négatif, l'ADN extracellulaire (ADNe) est un composant principal des biofilms. Cela a été découvert initialement en 1973 dans les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (Murakawa, 1973), et a depuis été démontré chez *E. coli* et *Salmonella* (Özdemir et al., 2018) (Tetz, 2010). Cependant, il reste que la plupart de ce qui est connu sur le rôle de l'ADNe au sein des biofilms a été démontré dans les biofilms de *Pseudomonas*. Selon ces études, il a longtemps été généralisé que le rôle de l'ADNe dans les biofilms soit nutritionnel et structurel,



ainsi que de favoriser l'adhésion aux surfaces. Le principal mécanisme de libération de l'ADNe dans le biofilm est la lyse cellulaire (Allesen-Holm et al., 2006). Une fois dans l'environnement, l'ADNe perturbe les charges et augmente l'hydrophobicité de la surface cellulaire, favorisant ainsi l'adhésion à une surface hydrophobe (Das et al., 2010; Maunders & Welch, 2017). D'un autre côté, des études récentes chez *Caulobacter* et chez *Salmonella* démontrent le phénomène contraire (Berne et al., 2010; Özdemir et al., 2018; Wang et al., 2014). En fait, ils proposent que chez ces souches, l'ADNe inhibe la formation de biofilms et favorise plutôt la dispersion de cellules. Dans ces études, un traitement de dispersion enzymatique de l'ADN dans les étapes initiales de formation de biofilm a favorisé une augmentation de la biomasse. De plus, le même traitement n'a eu aucun effet significatif sur la distribution d'un biofilm mature, suggérant que l'ADNe ne joue pas de rôle structurel dans un biofilm mature chez *Salmonella*, ni chez *Caulobacter*. Il y a aussi des études qui suggèrent que le rôle de l'ADNe dépend du stade de développement du biofilm (Ibáñez de Aldecoa et al., 2017; Özdemir et al., 2018; Secchi et al., 2022). Ces découvertes parfois contradictoires montrent surtout qu'il ne faut pas présumer que des résultats trouvés chez une souche sous une conditions sont applicables chez une autre espèce sous d'autres conditions.

Il est également supposé que l'ADNe joue un rôle dans l'évolution de la population au sein du biofilm par transfert horizontal de gènes (Spoering & Gilmore, 2006; Wang et al., 2014) et aussi dans la résistance antimicrobienne accrue des bactéries en biofilm par chélation de petites molécules (Lewenza, 2013; Mulcahy et al., 2008). Cependant, ces rôles n'ont jamais été démontrés chez *Salmonella*.

### **1.2.3 Signalisation impliquée dans la formation de biofilm**

L'interprétation de signaux intracellulaires et environnementaux constitue le seul facteur déterminant l'adaptation d'une bactérie à sa survie. Les bactéries disposent de plusieurs systèmes de transduction de signaux. Ceux-ci impliquent des protéines capables de détecter un signal chimique ou physique et de traduire ce signal en une réponse cellulaire (Kim & Szurmant, 2020). Cela peut inclure des chimiocapteurs et des mécanocapteurs, dont certains sont connus sous le nom de systèmes à deux composants (TCS) et d'autres impliqués dans la chimiotaxie ou du *quorum sensing*. Quelle que soit la voie dans laquelle elles sont impliquées, l'interprétation d'un signal conduit souvent à une régulation transcriptionnelle de gènes afin d'adapter le comportement des

bactéries aux exigences optimisant leur survie. Les systèmes de transduction de signal sont complexes, mais la section suivante présente brièvement certains systèmes impliqués dans le mode de vie de biofilm.

### **1.2.3.1 La transition de planctonique à biofilm**

La transition à un mode de vie en biofilm survient surtout lors de deux situations particulières: pour optimiser la protection en conditions de stress, ou pour optimiser la colonisation lors du contact avec une surface. Un des systèmes les plus étudiés détectant les interactions cellule–surface est le système Cpx (Stanley & Lazazzera, 2004). Ce système à deux composants est composé de CpxA, une kinase capteur de signal et CpxR, un régulateur. Chez *E. coli*, il a été démontré qu’une interaction entre la bactérie et une surface hydrophobe active le système Cpx, et que cette activation dépend sur la protéine membranaire NlpE (Otto & Silhavy, 2002; Stanley & Lazazzera, 2004). D’un autre côté, le système le plus étudié détectant un changement d’osmolarité dans l’environnement est le système OmpR/EnvZ. Ce système est proposé de jouer un rôle dans la stabilité des interactions cellule–surface dans des environnements à haute osmolarité, facilitant ainsi l’adhésion aux surfaces (Prigent-Combaret et al., 2001). Il a aussi été démontré que OmpR peut se lier au promoteur de CsgD, induisant l’expression de fimbriae curli et de cellulose favorisant la formation de biofilm chez *E. coli* et *Salmonella* (Chirwa & Herrington, 2003; Römling, Sierralta, et al., 1998; Stanley & Lazazzera, 2004). Une régulation importante doit aussi se produire au niveau de la motilité cellulaire. La motilité peut être régulée au niveau de l’expression génétique, mais aussi par chimiotaxie. Il a été démontré qu’un niveau élevé de la petite molécule signalisatrice de di-GMP cyclique (c-di-GMP) à l’intérieur de la cellule est associé à la réduction de la motilité et aussi à l’induction d’un mode de vie en biofilm (Guttenplan & Kearns, 2013; Römling et al., 2013).

### **1.2.3.2 Pendant la maturation du biofilm**

À mesure que le biofilm se développe, un système de signalisation parmi les plus influents est le système de *quorum sensing*. Ce système permet aux cellules dans un biofilm de communiquer entre elles. Cette communication est influencée par la disponibilité de nutriments dans

l'environnement, et aussi par la densité de la population. Chez *Salmonella*, il y a 5 sortes de molécules de *quorum sensing*, dont 3 sortes sont impliquées dans le développement de biofilms : auto-inducteur (AI)-1, AI-2 et épinéphrine/norépinéphrine (EPI/NE) (Zhang et al., 2022). Chez *Salmonella*, il a été démontré que le *quorum sensing* est nécessaire pour la formation de biofilm (Prouty et al., 2002). Le *quorum sensing* permet aussi de la communication inter-espèces (Federle & Bassler, 2003), ce qui devient surtout important dans des environnements naturels où cohabitent plusieurs espèces et peuvent former des biofilms multi-espèces.

### 1.2.3.3 Régulation de la dispersion

Une fois que le biofilm atteint une épaisseur à laquelle ce n'est plus avantageux de continuer à accumuler de la biomasse, une régulation se produit pour dissuader des nouvelles cellules de rejoindre le biofilm et aussi pour libérer du matériel de la matrice qui n'est plus nécessaire. Comme dans la phase de maturation, le *quorum sensing* joue un rôle important à ce stade (Stanley & Lazazzera, 2004; Steenackers et al., 2012). Ici, il signale et détecte lorsque la densité cellulaire est trop élevée et que la compétition pour les nutriments n'est pas viable (Narla et al., 2021). Le facteur sigma RpoS et la répression catabolique sont aussi proposés de jouer un rôle (Stanley & Lazazzera, 2004). Chez *Salmonella*, le système RpoS répond aux stress environnementaux en encodant le facteur  $\sigma^S$  qui s'associe à l'ARN polymérase pour modifier la transcription de gènes (Hengge-Aronis, 2002; Steenackers et al., 2012). Pour ce qui est de la répression catabolique, le régulateur post-transcriptionnel CsrA répond aux signaux indiquant qu'il n'y a pas d'avantage à se joindre au biofilm en promouvant la motilité (Jackson et al., 2002; Stanley & Lazazzera, 2004). Ceci permet aux cellules planctoniques de rester en phase planctonique.

## 1.2.4 Un modèle de biofilm pour *S. Typhi*

Bien que *S. Typhimurium* et *S. Typhi* partagent 89% de leur génome (McClelland et al., 2004), *S. Typhimurium* cause une maladie localisée au système digestif appelée la gastroentérite (Thiennimitr et al., 2012). Le comportement transcriptomique de *S. Typhimurium* en présence de bile est bien compris (Kröger et al., 2013; Singh et al., 2023), alors *S. Typhimurium* est actuellement le modèle accepté pour le comportement de *S. Typhi* dans la vésicule biliaire (Gunn,

2000; Sengupta et al., 2014). Ainsi, la plupart des suppositions sur les biofilms de *S. Typhi* dans la littérature sont déduites à partir du comportement de *S. Typhimurium* en présence de la bile. Cependant, une étude comparative sur la variation de protéines entre les sérovars Typhi et Typhimurium après exposition à de la bile a démontré qu'il y a peu de réponses communes entre les deux sérovars (Velkinburgh & Gunn, 1999). De plus, lors d'une étude comparant les séquences génétiques des sérovars Typhi et Typhimurium, il a été démontré que la majorité des gènes impliqués dans la colonisation intestinale sont inactivés chez le sérovar Typhi (Sabbagh et al., 2010). Cela implique que le sérovar Typhimurium est un modèle imprécis pour la colonisation de la vésicule biliaire par *S. Typhi* et qu'à ce jour, les connaissances acquises sur les biofilms de *S. Typhi* manquent d'acuité.

### **1.3 Polysaccharides de surface de *S. Typhi***

La membrane externe bactérienne est une bicouche lipidique asymétrique parsemée de molécules accessoires portant chacune une fonction physiologique spécifique. Ces molécules incluent des lipides, des protéines, des polysaccharides et même des combinaisons de celles-ci. Les polysaccharides de surface peuvent jouer des rôles physiologiques divers. Par exemple, certains sont impliqués dans la protection de stress environnementaux, tandis que d'autres modulent les interactions avec l'environnement (Sun et al., 2022).

#### **1.3.1 Acide colanique**

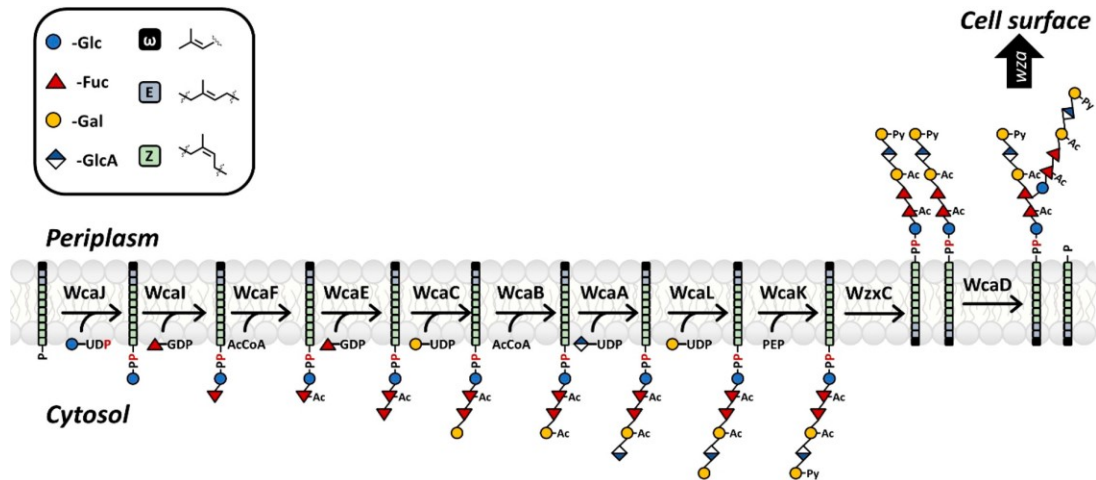
L'acide colanique est un exopolysaccharide capsulaire produit par plusieurs espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (Grant et al., 1969; Stevenson et al., 2000). L'acide colanique est souvent proposé de jouer un rôle important dans la formation de biofilms en enrobant les cellules et en constituant un élément de base de la matrice extracellulaire (Beloin et al., 2008; Hanna et al., 2003; Steenackers et al., 2012). Une autre fonction physiologique de l'acide colanique est d'aider à maintenir l'équilibre des protons et le potentiel transmembranaire par sa charge négative lorsque l'enveloppe cellulaire subit un stress (Pando et al., 2017).

### 1.3.1.1 Biosynthèse de l'acide colanique

Les gènes de biosynthèse de l'acide colanique se situent au même endroit dans les génomes de plusieurs membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, mais il a été démontré que ces gènes ont été transférés horizontalement à *S. enterica* relativement récemment dans l'évolution (Stevenson et al., 2000). De plus, *E. coli* et *S. enterica* partagent une grande similarité génétique, mais la différence entre leurs gènes d'acide colanique est en moyenne plus grande que pour leurs autres gènes (Stevenson et al., 2000). Dans une étude comparant les génomes de plusieurs souches de *S. enterica*, il a même été retrouvé que le groupe de gènes encodant la biosynthèse de l'acide colanique est souvent dégradé chez les sérovars typhoïdiques comme *S. Typhi* (Nuccio & Bäumlér, 2014).

Chez *Salmonella*, l'acide colanique est synthétisé par un opéron de 19 gènes. L'opéron contient des gènes de synthèse d'éléments de base de polysaccharides tels que *gal*, *gmd*, *wcaG* et *man*, qui encodent la biosynthèse de fucose et de galactose. Ces sucres sont ensuite assemblés par différentes glycosyl transférases telles que WcaJ, WcaA, WcaC et WcaE, les acétyl transférases WcaB et WcaF, la polymérase Wzy et la copolymérase Wzc. L'exportation de l'acide colanique est réalisée par des composants incluant Wza, Wzb, Wzc et Wzx (Figure 1) (Sande & Whitfield, 2021; Stevenson et al., 1996; Stevenson et al., 2000). Une cible classique pour abolir la biosynthèse de l'acide colanique chez *E. coli* et *Salmonella* est une délétion du gène *wcaJ* (Ranjit & Young, 2016; Samain, 2007).

La régulation de la synthèse de l'acide colanique se fait par le système Rcs. Celui-ci est un système de phosphorelais activé par des signaux provenant de dommages ou défauts à la membrane externe, comme des LPS mal synthétisés ou de peptidoglycane endommagé (Sande & Whitfield, 2021). Ses composants incluent RcsB, un régulateur de réponse cytoplasmique, RcsC et RcsD, des kinases et protéines membranaires du périplasme agissant ensemble comme capteur de signal, et le facteur de transcription RcsA (Erickson & Detweiler, 2006).



**Figure 2** Schématisation de la biosynthèse de l'acide colanique chez *E. coli*.

Tiré de (Reid et al., 2021) avec reproduction autorisée sans permission selon une *creative commons license*.

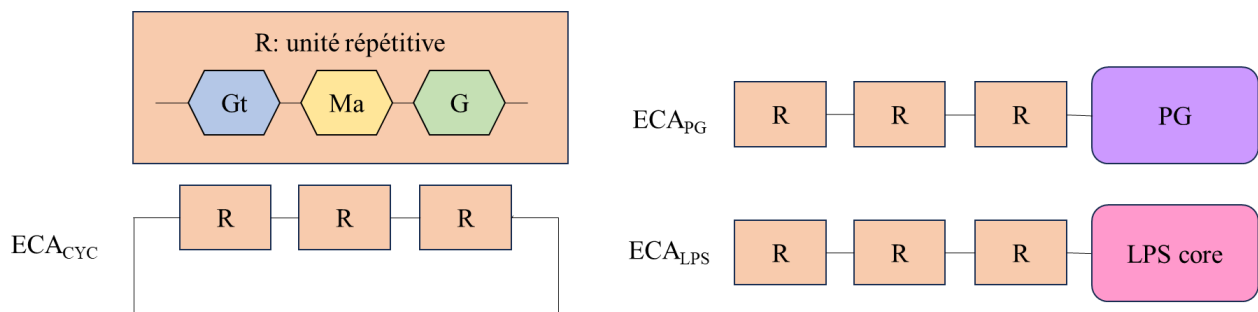
### 1.3.1.2 Rôle proposé de l'acide colanique dans les biofilms

Pour ce qui est du rôle de l'acide colanique dans les biofilms, il a été démontré que l'acide colanique ne joue pas de rôle dans l'attachement mais est plutôt nécessaire dans le développement de la structure tridimensionnel du biofilm chez *E. coli* et *Salmonella* (Barak et al., 2007; Danese et al., 2000; Steenackers et al., 2012). Cependant, il a aussi été suggéré que l'acide colanique ne joue pas de rôle dans la formation de biofilms chez le sérovar Typhimurium, ni chez le sérovar Enteriditis (Barak et al., 2007; Prouty & Gunn, 2003).

### 1.3.2 Antigène commun enterobactérien (ECA)

L'antigène commun entérobactérien (ECA) est un polysaccharide de surface cellulaire lié à la membrane externe (Rai & Mitchell, 2020; Rinno et al., 1980). Il a été découvert pour la première fois en 1962 chez *E. coli* (Kunin et al., 1962) et tire son nom du fait qu'on le trouve à la surface de toutes les bactéries dans l'ordre des Enterobacterales avec de rares exceptions. Ce polysaccharide existe sous trois formes : soit lié par un lien phosphodiester au diacylglycérol (ECA<sub>PG</sub>), lié aux LPS (ECA<sub>LPS</sub>) ou localisé dans le périplasm sous forme cyclique (ECA<sub>CYC</sub>) (Figure 2). La forme sous laquelle se trouve l'ECA dépend de la disponibilité de la liaison. Par

exemple, il a été démontré que l'antigène O et l'ECA peuvent coexister à la surface, mais qu'une souche négative pour l'antigène O est plus probable d'avoir davantage d'ECA<sub>LPS</sub> à sa surface (Maciejewska et al., 2020; Muszyński et al., 2013; Rai & Mitchell, 2020). D'autre part, la forme cyclique semble jouer un rôle important dans la maintenance de la perméabilité de l'enveloppe cellulaire, surtout en présence de détergents comme les sels biliaries. Sous cette forme, l'ECA demeure dans le périplasma et n'est jamais exposé à la surface de la cellule (Dell et al., 1984; Rai & Mitchell, 2020; Ramos-Morales et al., 2003).



**Figure 3** Structure de l'ECA sous les formes ECA<sub>CYC</sub>, ECA<sub>PG</sub>, et ECA<sub>LPS</sub>.

R: unité répétitive. Gt: 4-acétamido-4,6-didéoxy-D-galactose. Ma: Ma; Acide N-acétyl-D-mannosaminuronique. G: N-acétylglucosamine. PG: phosphatidylglycérol. LPS: lipopolysaccharide. Adapté de (Rai & Mitchell, 2020).

### 1.3.2.1 Biosynthèse de l'ECA

La biosynthèse de l'ECA est principalement encodée par l'opéron *wec*. La synthèse des éléments de base se produit dans le cytoplasme. *WecA* est responsable de la première étape qui assemble le lipide I de l'ECA. Cela est suivi par les actions de *WecB* et *WecC* qui assemblent les substrats destinés à être transférés au lipide I par le transférase *WecG*, résultant en le lipide II (Maczuga et al., 2022; Rai & Mitchell, 2020). Ensuite, *RmlAB* et *WecDE* agissent ensemble pour former les précurseurs à être transférés au lipide II par *WecF* pour former le lipide III. Le transfert du lipide III au périplasma est exécuté par la flippase *WzxE* et la chaîne d'ECA est polymérisée par *WzyE*. *WzzE* est un régulateur qui détermine la longueur de la chaîne (Barr et al., 1999; Rai & Mitchell, 2020). Selon la forme sous laquelle la chaîne d'ECA se retrouvera, elle peut ensuite être

transférée à la membrane externe, mais les gènes impliqués dans ce transfert sont inconnus à ce jour (Rai & Mitchell, 2020).

Des mutations dans la voie de biosynthèse de l'ECA peuvent activer des réponses de stress, causer de la sensibilité à la bile, et modifier la disponibilité de précurseurs de synthèse d'autres sucres (Rai & Mitchell, 2020). Dans la littérature, les gènes *wecA* ou *wecD* sont souvent ciblés pour créer des mutants déficients pour la synthèse de l'ECA (Bridge et al., 2015; Ramos-Morales et al., 2003). Cependant, chez certaines espèces, la voie de biosynthèse de l'antigène O ressemble beaucoup à celle de l'ECA. Ainsi, une mutation dans *wecA* peut parfois abolir l'expression de l'antigène O si ces antigènes partagent le GlcNAc comme sucre initial (Rai & Mitchell, 2020).

### **1.3.2.2 Rôle proposé de l'ECA dans les biofilms**

Le rôle de l'ECA n'est pas bien compris à ce jour et n'a jamais été décrit avec précision, probablement dû en partie à ses trois formes structurelles différentes. Cela dit, son rôle en contexte de biofilms demeure encore moins clair. Il est parfois proposé qu'il joue un rôle indirect dans la formation de biofilms. Par exemple, chez *Serratia marcescens*, il a été démontré qu'une absence ou une perturbation dans la structure de l'ECA par mutation de la machinerie de biosynthèse de ce dernier peuvent activer le système Rcs qui contrôle la production d'acide colanique (Castelli & Vescovi, 2011). Chez *Salmonella*, il a été démontré que l'ECA est nécessaire pour la formation d'un biofilm mature chez le sérovar Enteritidis, mais la raison pour cela n'a pas été étudiée plus loin (Solano et al., 2002).

### **1.3.3 Antigène Vi**

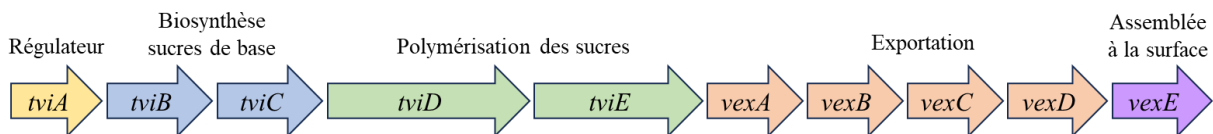
L'antigène Vi est un polysaccharide capsulaire retrouvé chez seulement quelques souches bactériennes, dont les sérovares Typhi, Paratyphi C et certaines souches Dublin de *S. enterica* (Mohammed et al., 2019; Sande & Whitfield, 2021). La présence de l'antigène Vi à la surface permet aux bactéries d'échapper au système immunitaire de l'hôte, ce qui contribue grandement à la capacité de ces souches de causer une infection systémique et non localisée comme d'autres *Salmonella* (Raffatellu et al., 2005; Sabbagh et al., 2010). Au cours d'une infection à *S. Typhi*, l'expression de l'antigène Vi diffère selon le stade de l'infection, donc il ne se retrouve pas toujours



à la surface de la cellule. Par exemple, son expression est réprimée dans la lumière de l'intestin et est induite lors de l'invasion de la muqueuse de l'intestin (Raffatellu et al., 2005; Sande & Whitfield, 2021; Winter et al., 2010). Étant rare et spécifique aux sérovars typhoïdiques, cet antigène constitue une cible importante pour le développement de vaccins. En fait, seulement deux vaccins contre la typhoïde sont approuvés pour utilisation au Canada et l'un d'eux immunise contre l'antigène Vi (Canada, 2021).

### 1.3.3.1 Biosynthèse de l'antigène Vi

Chez *S. Typhi*, la biosynthèse de l'antigène Vi est encodée par deux opérons : *tvi* pour la synthèse et l'assemblage des composants et *vex* pour l'exportation de ces composants à la surface (Figure 3). TviA est le principal régulateur positif. TviBC produisent les sucres de base, soit l'acide UDP-N-acétylglucosaminurique (GlcNAcA) et UDP-N-acétylgalactosamine (GalNAcA), et TviDE assemblent ces sucres. VexABCD sont proposés de former un transporteur ABC-dépendant et permettent l'exportation à partir du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule et VexE permet l'ancrage à la membrane externe (Liston et al., 2016; Virlogeux et al., 1995; Wear et al., 2022). TviB, TviC, TviD et TviE sont requis pour la production d'un antigène Vi intact, donc une mutation dans un de ces composants crée une souche incapable de produire l'antigène Vi. Dans la littérature, ces souches sont aussi souvent créées en mutant le locus au complet. D'un autre côté, des mutations dans *vexABCD* causent une accumulation de l'antigène Vi à l'intérieur de la cellule et une mutation dans *vexE* cause le polysaccharide d'être secrété au lieu d'être assemblé à la surface (Liston et al., 2016; Raffatellu et al., 2005; Wetter et al., 2012).



**Figure 4** Organisation des gènes de biosynthèse de l'antigène Vi de *S. Typhi*.

Adapté de (Wear et al., 2022).

### 1.3.4.2 Rôle proposé de l'antigène Vi dans les biofilms

Selon ce qui a été démontré à ce jour, le rôle principal de l'antigène Vi à la surface de la cellule est la protection (Sabbagh et al., 2010; Sande & Whitfield, 2021). Il a été démontré que l'antigène Vi peut faire partie de la matrice d'un biofilm, mais que l'inhibition de sa production n'a aucun effet sur la structure ou la composition d'un biofilm (Prouty et al., 2002; Raza et al., 2011). Cependant, ces résultats deviennent difficiles à interpréter en raison des conditions de biofilm utilisées dans ces études. Les études prétendant avoir étudié le rôle de l'antigène Vi dans la formation de biofilm chez *S. Typhi* ont soit des niveaux de biomasse très faibles, soit les gènes de biosynthèse de l'antigène Vi ont été transférés dans un autre sérovar comme Typhimurium et les résultats ont été extrapolés au sérovar Typhi (Adcox et al., 2016; Hahn et al., 2021).

En plus de contrôler l'expression de l'antigène Vi, le régulateur TviA peut aussi réprimer l'expression du flagelle (Winter et al., 2008; Winter et al., 2015; Winter et al., 2010). D'autre part, il a été démontré que OxyR, un régulateur dans la réponse au stress oxydatif, peut se lier au promoteur de TviA et réguler positivement son expression (Zhang et al., 2018). Étant donné que la diminution de la motilité soit importante pour l'invasion de macrophages et que le stress oxydatif est augmenté à l'intérieur des macrophages, cela implique que l'antigène Vi joue un rôle important à la fois dans la protection de la bactérie et aussi dans la pathogenèse à l'intérieur de l'hôte. Plus spécifiquement, cela démontre l'importance du régulateur TviA dans le changement de l'expression des gènes au cours de la pathogenèse afin de permettre la dissémination systémique de *S. Typhi*. Étant donné que le stress oxydatif est un facteur commun dans les maladies de la vésicule biliaire (Geetha, 2002; Grattagliano et al., 2017) et que la réduction de la motilité est une qualité importante pour le développement d'un biofilm (Sauer et al., 2022), il est possible que l'expression de TviA joue un rôle dans la formation de biofilms de *S. Typhi* dans un environnement comme la vésicule biliaire.

Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que le système Rcs et le système à deux composants OmpR/EnvZ interagissent avec le régulateur TviA (Arricau et al., 1998; Santander et al., 2008; Virlogeux et al., 1996; Winter et al., 2009). En fait, TviA est proposé d'ajouter une fonction d'osmosensation au système Rcs, et que ce mécanisme pourrait impliquer le système OmpR/EnvZ (Winter et al., 2009). Ce système régule l'expression de fimbriae curli (Prigent-Combaret et al., 2001; Römling, Bian, et al., 1998). Comme mentionné auparavant, le système Rcs

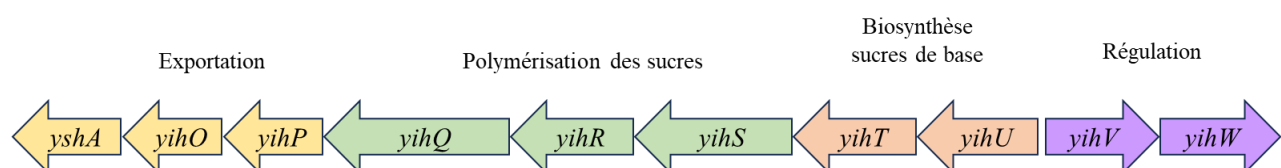
régule la production d'acide colanique, un composé souvent retrouvé dans des biofilms. Bien que le lien reste à établir, il s'agit d'un autre indicateur que le régulateur TviA et/ou l'antigène Vi pourraient jouer un rôle dans le développement d'un biofilm.

### 1.3.4 Capsule antigène O

Découverte pour la première fois chez *E. coli* en 1982 (Goldman et al., 1982), ce n'est qu'en 2006 que la présence d'une capsule antigène O a été démontrée chez *Salmonella* (Gibson et al., 2006; Snyder et al., 2006). Cette capsule a été nommée la capsule antigène O en raison de sa forte ressemblance à la portion antigène O d'une molécule de LPS. Sa présence a ensuite été démontrée chez le sérovar Typhimurium, ainsi que l'influence de la bile sur sa transcription (Crawford et al., 2008).

#### 1.3.4.1 Biosynthèse la capsule antigène O

La biosynthèse de la capsule antigène O est encodée par deux opérons, *yihU-yshA* et *yihVW* (Figure 4). Ces opérons sont conservés chez toutes les *Salmonella* (Gibson et al., 2006). YihU, YihT, YihR et YihS sont des enzymes variés impliqués dans la synthèse des sucres de base. YihQ est une transférase impliquée dans l'assemblage de ces sucres, tandis que YihO, YihP et YshA sont des protéines membranaires permettant l'exportation du sucre assemblé à la surface de la cellule. Il est proposé que YihVW soient des régulateurs négatifs de l'opéron *yihU-yshA* (Gibson et al., 2006). En fait, il a été démontré que YihVW répriment l'expression de la capsule antigène O et que *yihVW* peut être réprimé par CsgD. Cela implique de CsgD est un régulateur positif de l'expression de la capsule O, et que celle-ci coïncide avec l'expression de curli et de cellulose (Gibson et al., 2006). De façon générale, une mutation dans *yihO* ou *yihQ* inhibe l'exportation de la capsule antigène O (Adcox et al., 2016; Crawford et al., 2008; Gibson et al., 2006).



**Figure 5** Organisation des gènes de biosynthèse de la capsule antigène O chez *Salmonella*.  
Adapté de (Gibson et al., 2006)

#### **1.3.4.2 Rôle proposé de la capsule antigène O dans les biofilms**

Similaire à l'antigène Vi, il est proposé que la capsule de l'antigène O joue un rôle dans la protection et la pathogénèse en modifiant la surface antigénique de la bactérie (Marshall & Gunn, 2015). Il a été démontré que cette capsule est nécessaire pour l'adhésion de *Salmonella* aux calculs biliaires et aux surfaces recouvertes de cholestérol, mais pas au plastique ni au verre (Adcox et al., 2016; Crawford et al., 2008). Comme mentionné auparavant, la présence de bile peut influencer l'expression de la capsule antigène O chez *Salmonella* et il est proposé que cette influence soit indépendant de CsgD dans les sérovars Typhi et Typhimurium (Crawford et al., 2008). Puisque le sérovar Typhi détient un CsgD dysfonctionnel, cela pourrait expliquer pourquoi la capsule antigène O joue un rôle dans le développement de biofilms sur des calculs biliaires. Tout cela considéré, le rôle fonctionnel de la capsule antigène O au sein des biofilms de *S. Typhi* reste à établir.

### **1.4 Revue de littérature en préparation: Quel est le rôle des LPS dans les biofilms d'*E. coli* et de *Salmonella*?**

What is the role of LPS in biofilms in *E. coli* and *Salmonella*?

#### **1.4.1 Abstract**

In Gram-negative bacteria, LPS has been thoroughly characterized and has been shown to play a major role in pathogenesis and bacterial defense. In *Salmonella* and *E. coli*, it is also known to influence the development of biofilms. However, the role of LPS in biofilm formation has never been demonstrated directly. This article reviews current knowledge of LPS biosynthesis and the effects that defective biosynthesis steps have on biofilm-related characteristics, such as motility, adhesion, auto-aggregation and biomass production in *Salmonella* and *E. coli*. We gathered that motility tends to decrease while adhesion and auto-aggregation phenotypes tend to increase in most

LPS mutants. We also found that the biomass production pattern depends on biofilm maturation time, with shorter incubation times leading to lower biomass levels and longer incubation times leading to significantly higher biomass levels compared to the wild-type strain. Potential explanations for this pattern were explored, such as disturbances in biofilm-related signalling systems and dynamic LPS modifications. However, to our knowledge, this has never been reported or explained in current literature. Biofilm-related infections are extremely problematic in a clinical context, and since LPS composition is strain-specific, it is potentially a promising therapeutic target.

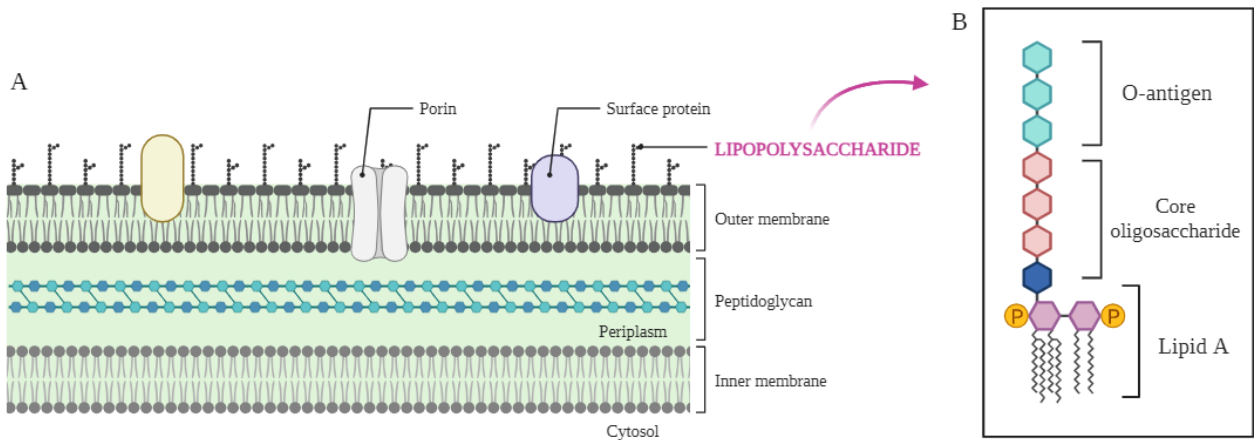
### 1.4.2 Introduction

Biofilms are multicellular bacterial communities embedded within a self-produced slime. This slime, known as the extracellular matrix (ECM), is mostly composed of polysaccharides, extracellular DNA (eDNA) and proteins (1, 2). This lifestyle allows bacteria to resist to mechanical and chemical stresses, while also facilitating their adherence to surfaces and to each other. Biofilms can be attached to a surface and can also exist as floating aggregates in liquid or as a pellicle at the liquid-air interface (3, 4). When attached, biofilms can form on almost any biotic or abiotic surface, which is advantageous for bacterial survival and consequently problematic for sanitary control. In the environment, biofilms are predominant in aquatic environments like on submerged rocks and sand, and in water pipes. These aquatic biofilms can be considered environmental reservoirs of antibiotic resistance (5). In clinical situations, biofilms are involved in 80% of all chronic or recurrent infections. For example, recurrent urinary tract infections (UTIs) are often caused by uropathogenic *E. coli* biofilms in the urinary tract and in catheters (6). *Salmonella* species can grow biofilms on various surfaces, causing salmonellosis by cross-contamination (7). *Salmonella enterica* serovar Typhi can even form a biofilm in the harsh environment of the gallbladder, causing a chronic asymptomatic typhoid infection (9, 10). Biofilm formation and composition of *E. coli* and *Salmonella* species have been extensively studied (8, 9, 10, 11). An in-depth review of *E. coli* biofilms can be found here (8) and of *Salmonella* biofilms here (10). Briefly, major structural components of both biofilms include various adhesins, curli fimbriae, biofilm-associated proteins (Baps), extracellular DNA and excreted polysaccharides (colanic acid, cellulose, poly-N-acetylglucosamine). Cell-surface polysaccharides, such as the O-antigen capsule, the Vi antigen,

K antigen, and lipopolysaccharide (LPS) are often proposed to be integral biofilm components (12). Surprisingly, the role of LPS in biofilm formation has yet to be demonstrated directly despite evidence of their importance. This review reports how LPS influences biofilm formation in *Salmonella* and *E. coli*.

Molecules of LPS contain both a lipid and a polysaccharide component. In Gram-negative bacteria, LPS is the main cell-surface component found in the outer leaflet of the outer membrane (OM) of the cell envelope (13, 14) (**Figure 1A**). Given its localization, LPS is one of the first-line defenses against environmental stressors. Its amphipathic character and dense packing at the surface allow for an effective permeability barrier against small hydrophobic molecules that would normally be able to cross a simple phospholipid bilayer (13). LPS is also an endotoxin containing a PAMP (pathogen-associated molecular pattern) and can therefore modulate host immune system reactions (13), inducing an aggressive immune response (15).

The structure of a LPS molecule can be sectioned into three parts: lipid A, core oligosaccharide, and O antigen (**Figure 1B**). Lipid A anchors the LPS in the OM. It is conserved at the species level but can be modified in response to environmental changes. Core oligosaccharide links lipid A to the O antigen and is known to vary between species and between some strains. In literature, it is often divided into inner- and outer-core segments. Most distal to the membrane, the O antigen section is a repeat of oligosaccharide and varies extensively between strains. The O antigen may even be absent in some cases, leaving the LPS with only the first two sections. Strains elaborating LPS lacking O antigen are often referred to as “rough” variants (13, 15).



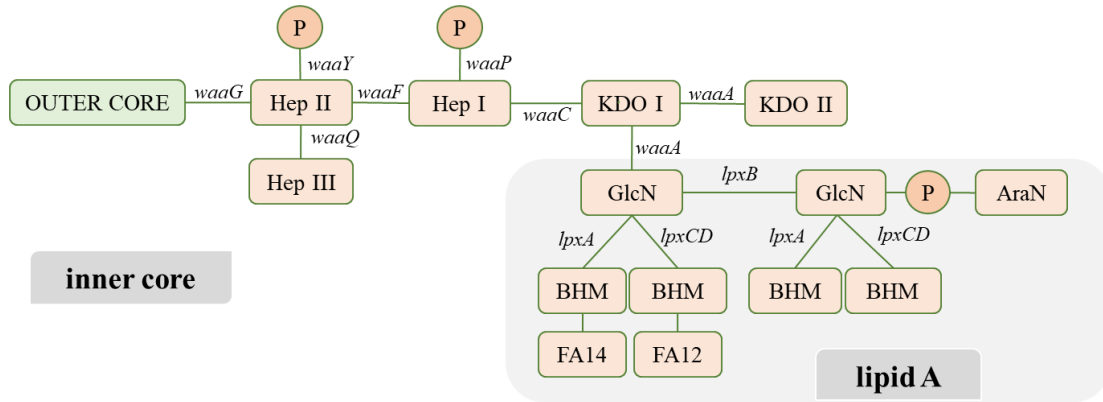
**Figure 1.** Schematic representation of the Gram-negative cell envelope, with LPS located at the cell surface. *Created with BioRender.com*

### 1.4.3 An overview of LPS biosynthesis

LPS biosynthesis is a complex process implicating over 50 genes. The main genes are mostly (but not all) organized into clusters, each governing a specific subset of LPS biosynthesis. The *lpx* cluster codes for lipid A synthesis, the O-antigen cluster focuses on O-antigen synthesis and the *waa* (formerly *rfa*) cluster on LPS core synthesis and O-antigen attachment (8, 15, 16, 17, 18).

Lipid A biosynthesis. In *Enterobacteriaceae*, lipid A biosynthesis occurs in the cytoplasm and is characterized by the phosphorylation, acylation, and glycosylation of a glucosamine disaccharide. Lipid A contains two 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosonic acid (KDO) residues, one of which links lipid A to the core oligosaccharide. After synthesis, lipid A is translocated from the cytoplasmic leaflet to the periplasmic leaflet of the inner membrane by the transporter MsbA (18, 19). As aforementioned, lipid A synthesis is mostly governed by the *lpx* gene cluster (**Figure 2**). A combined effort by the gene products of *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, *lpxH* generates the lipid A precursor called lipid X. Next, lipid IV<sub>A</sub> precursor is formed by actions of LpxB and LpxH. WaaA (formerly KdtA) can then incorporate the two KDO residues which can potentially be modified by LpxL (lauroyltransferase), LpxM (myristoyltransferase) and/or LpxP (palmitoleoyl acyltransferase) depending on environmental growth conditions (16, 18, 19). Because this portion of the LPS is conserved at the species level, *Escherichia* and *Salmonella* exhibit minor differences

in their lipid A biosynthesis. For example, LpxO and PagL are two lipid A-modifying enzymes that are found in *Salmonella* but not in *Escherichia* (15, 20, 21).

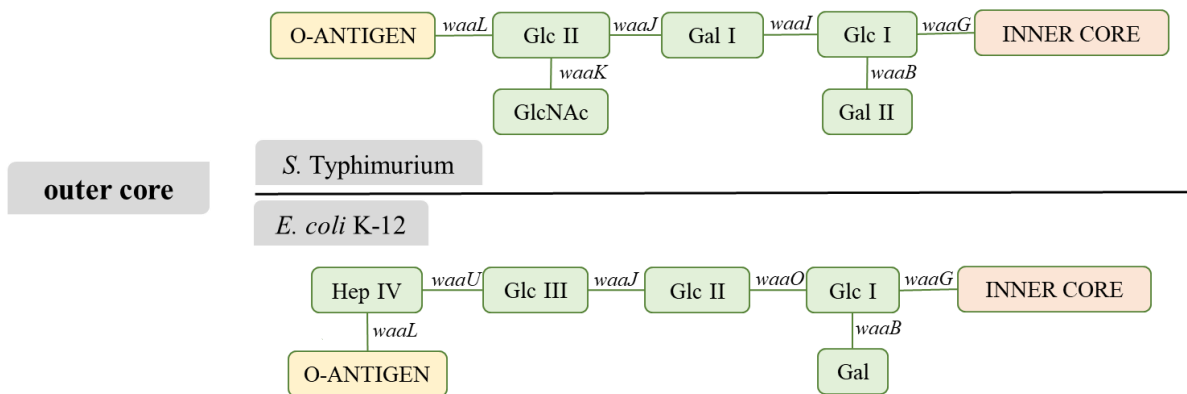


**Figure 2.** Overview of LPS lipid A and inner-core biosynthesis in *S. Typhimurium* vs. *E. coli*. Adapted from (13, 16).

Core oligosaccharide biosynthesis. In *Enterobacteriaceae*, core biosynthesis is first marked by heptose synthesis by products of the *gmh* gene cluster, and core assembly is mostly coded for by the *waa* gene cluster. This last cluster is 70% identical between *E. coli* K12 and *S. Typhimurium* LT2 (16). In *E. coli* and *Salmonella*, the heptose residues in this section are synthesized by enzymes such as GmhA, HldE (formerly WaaE/RfaE), GmhB and HldD (22). Once lipid A is synthesized, core assembly can begin with the addition of heptose residues by WaaC and WaaF (**Figure 2**). Subsequently and in order, the kinase WaaP, the heptosyltransferase WaaQ and the kinase WaaY act to decorate the inner core backbone. At this point, the inner-core oligosaccharide is formed. It is important to note that mutations in *waaP*, *waaQ* or *waaY* inhibit any further extension of the core from this point (13, 16, 23, 24, 25). There is one exception in which a *waaP* mutant in *Salmonella* was constructed to have a full-length chain, although this mutant still displayed a deep-rough phenotype (26). It is also worth noting that *waaP*, *waaQ* and *waaY* are highly conserved between *Salmonella* and *E. coli* and that mutations in *waaQ* and *waaG* inhibit expression of *waaP*, while mutations in *waaP* inhibit expression of *waaY* (16, 25, 26, 27).



Next, the outer-core synthesis (**Figure 3**) begins with sequential actions of the glycosyltransferases *waaG*, *waaO*, *waaB* and *waaJ* (also known as *waaR*) add glucose and galactose molecules to the chain. Although WaaB adds its galactose residue as a side chain to the inner core, WaaJ activity is dependent on WaaB. Thus, an intact WaaB is necessary for further core elongation. In *E. coli*, the outer core is completed with a heptose group by WaaU. In *S. Typhimurium*, WaaK plays a similar role to WaaU, completing core synthesis with the addition of GlcNAc. The lipid A–core precursor is then translocated to the outer leaflet of the inner membrane (13, 16, 28, 29, 30).



**Figure 3.** Overview of LPS outer-core biosynthesis in *E. coli* K-12 vs. *S. Typhimurium*.

The core chain can also be modified depending on environmental conditions. For example, WaaH can add a glucuronic acid to the core in limiting phosphate conditions (31).

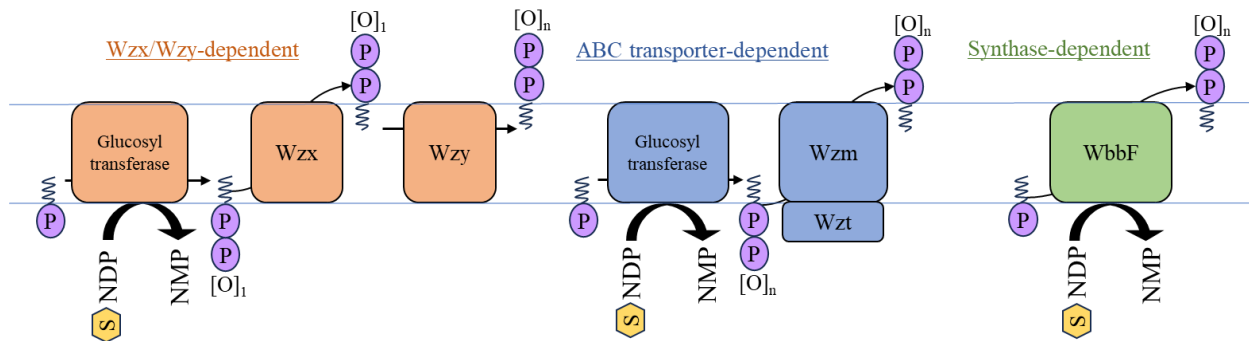
O antigen biosynthesis. The O antigens of LPS can be extremely polymorphic between strains and are composed of a variable quantity of repeating oligosaccharide subunits (13, 17, 32). In *E. coli* and *Salmonella*, O antigen biosynthesis is encoded by their respective O antigen clusters. Independently, some members of the *waa* cluster play a crucial role in O antigen attachment to the core. For example, WaaL catalyzes the ligation of the O antigen to the core oligosaccharide and its activity is dependent on the final steps of core synthesis performed by WaaK/U (both formerly known as *rfaK*) (13, 16, 30). However, the O antigen is assembled independently of the rest of the LPS molecule and is subsequently attached to the lipid A–core by WaaL at the inner membrane

(13, 32). In most *E. coli* and *Salmonella*, the O antigen biosynthesis clusters are located on the chromosome between the *galF* and *gnd* genes (17). There are three groups of genes coding for O antigen biosynthesis.

The first group of genes in the O antigen cluster codes for the biosynthesis of sugar precursors. It is important to note that many of the sugar precursors needed for O antigen biosynthesis are also implicated in other general pathways and are thus found elsewhere in the genome. However, O antigen clusters contain all the genes for synthesis of sugar precursors that are specific to the O antigen. Some examples of genes involved in different sugar-precursor biosynthesis pathways include *rmlABCD* for deoxythymidine diphosphate (dTDP) sugars, *ddhABCD* for cytidine diphosphate (CDP) sugars, *manABC* for guanosine diphosphate (GDP) sugars, housekeeping gene *galE* for uridine diphosphate glucose (UDP-Glc), housekeeping genes *gne* or *gna* for UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), *hldE* for catalysis of a heptose precursor and *mnaAB* for UDP-N-acetylmannosamine (UDP-ManNAc), a gene found in other clusters such as those for ECA and Vi antigen biosynthesis (17).

The second group encodes glycosyltransferases that transfer the sugar-phosphate precursors to the undecaprenyl phosphate (UndP) lipid carrier and then to the sugar chain, resulting in a UndP-P-sugar linkage. There are two types of transferases. Initiating transferases have a transmembrane domain and transfer a sugar precursor to a UndP carrier. Other transferases do not have a transmembrane domain and transfer sugars to the other sugars of the chain. That being said, O antigen biosynthesis is initiated by members of either the polyisoprenyl-phosphate N-acetylhexosamine-1-phosphate transferase (PNPT) family or the polyisoprenyl-phosphate hexose-1-phosphate transferase (PHPT) family. PHPTs are bacteria-specific and include enzymes like WbaP, WbgY and WcaJ. PNPTs are also found in eukaryotes and include enzymes like WecA (part of the ECA gene cluster). The other transferases contain more sequence heterogeneity in comparison to the initiating transferases, as the former are responsible for the overall heterogeneity between O antigens.

The third group encodes proteins involved in translocating and polymerizing the O-antigen. Depending on the strain, three different pathways can act to polymerize the O-subunits into a fully formed O-antigen: the Wzx/Wzy (flippase/polymerase)-dependent pathway, the ABC transporter (Wzm/Wzt)-dependent pathway, and the synthase-dependent pathway (**Figure 4**) (13, 15, 32).



**Figure 4.** Schematic representation of O-antigen translocation and polymerization pathways. Adapted from (13).

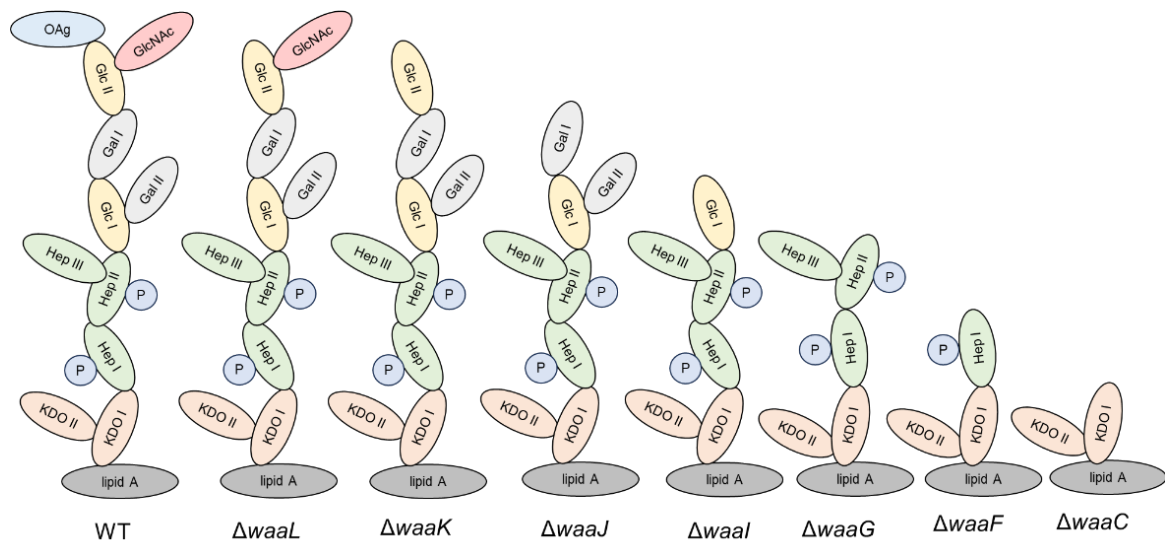
In the Wzx/Wzy-dependent pathway, individual O-antigen repeats are synthesized on the lipid carrier at the cytoplasmic leaflet of the inner membrane and are then flipped to the periplasmic leaflet of the inner membrane by the Wzx flippase (formerly RfbX). Wzy (formerly Rfc) activity polymerizes the subunits in the periplasmic leaflet of the inner membrane to modal lengths specified by Wzz (formerly Cld) (13, 15, 32, 33, 34). The resulting O antigen is ligated to core oligosaccharide by WaaL and the lipid carrier is recycled. In fact, considering that Und-P is also used for synthesis of other components of the cell envelope such as peptidoglycan, colanic acid and ECA, it has been shown that deleterious mutations in the Wzx/Wzy-dependent pathway can potentially impair cell growth due to the sequestration of Und-P by O-antigen precursors (13, 35).

As for the ABC (ATP-binding cassette) transporter-dependent pathway, synthesis and polymerization of the O subunits occurs entirely in the cytoplasm on a Und-pyrophosphate-GlcNAc carrier. Once formed, the O-antigen-Und-P precursor is flipped into the periplasm by an ABC transporter and the O antigen portion is linked to the lipid A-core by WaaL (13, 32, 36, 37). Generally, the ABC transporter contains two components, the transmembrane component Wzm and the nucleotide-binding component Wzt (17).

The synthase-dependent pathway has only been found in one *Salmonella* serovar (Borreze) and is not yet thoroughly characterized. In this serovar, the O-antigen synthesis gene cluster is found on a plasmid and is composed of *wecA*, *wbbE* (formerly *rfbA*), *wbbF* (*rfbB*) and *mnaA* (*rfbC*).

WecA initiates synthesis of the precursor Und-PP-GlcNAc, WbbE adds the first ManNAc residue and WbbF contributes to O-antigen chain polymerization. WbbF is also responsible for O-antigen export, although this mechanism has yet to be elucidated (38, 39, 40).

Naturally, deleterious mutations in any of the above-mentioned enzymes has the potential to produce uncapped LPS molecules (i.e. lacking O antigen) (**Figure 5**). However, in *Enterobacteriaceae*, the shortest viable LPS chain consists of the lipid IVA-KDOII precursor (15, 19, 31). Therefore, any mutations before (but not including) *waaC* in the LPS biosynthetic pathway are non-viable.



**Figure 5.** Hypothetical cartoon of uncapped *S. Typhimurium* LPS glycoform resulting from deletions of *waaL*, *waaK*, *waaJ*, *waaI*, *waaG*, *waaF* and *waaC*, respectively.

#### 1.4.4 LPS glycoform influences biofilm formation in *E. coli* and *Salmonella*

There have been many reports that LPS glycoform influences the development of biofilms in various species of bacteria. However, these reports seem contradictory at first glance with some showing an increase in biomass while others show a decrease. In search of a pattern, results from

various studies were organized in Table 1 based on the order of the mutated gene in the biosynthesis process and on the incubation time used for biofilm formation.

**Table 1** – Biofilm production levels in *Salmonella* and *E. coli* LPS mutants

N/A = not applicable, ▲ = increased biomass, — = same as WT, ▼ = decreased biomass

$\Delta$ LPS	Role of gene product	Conditions of biofilm production	<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>	
			24 h	48 h	24 h	48 h
$\Delta hldE$	Synthesis of heptose precursors for core (41)	LB, 37 °C	N/A	N/A	— (42)	▲ (41)
$\Delta waaC$ ( <i>rfaC</i> )	Heptosyltransferase for addition of HepI (43)	*LBSS + 0.2% glu, 30 °C LB, 37 °C	*▲ (44)	N/A	▼ (45)	▲ (41)
$\Delta waaP$ ( <i>rfaP</i> )	Heptose kinase for phosphorylation of HepI (25)	*LBSS + 0.2% glu, 30 °C LB, 37 °C	*▼ (44)	N/A	▼ (45)	— (41)
$\Delta waaF$ ( <i>rfaF</i> )	Heptosyltransferase for addition of HepII (43)	LB, 37 °C	N/A	N/A	▼ (45)	▲ (41)
$\Delta waaQ$ ( <i>rfaQ</i> )	Heptosyltransferase for addition of side-chain to HepII (HepIII) (25)	LB, 37 °C	N/A	N/A	▼ (45)	N/A
$\Delta waaY$ ( <i>rfaY</i> )	Heptose kinase for phosphorylation of HepII (27)	LB, 37 °C, 24 h M63, 37 °C	N/A	N/A	▼ (45)	N/A
$\Delta waaG$ ( <i>rfaG</i> )	Glycosyltransferase: adds glucose to HepII (43)	*M63 media + 0.2% glu + 0.5% CAA, 8 h, 37 °C LB broth, 37 °C	*▲ (46) 8 h	N/A	▼ (45)	▲ (41)
$\Delta waaB$ ( <i>rfaB</i> )	Galactosyltransferase	MB63B1 minimal media + 0.4% glu, 16 h, 37 °C	N/A	N/A	— (47) 16 h	N/A
$\Delta waaI/O$	I: Galactosyltransferase for core assembly in <i>Salmonella</i> O: Glucosyltransferase for core assembly in <i>E. coli</i>	LB, 37 °C M63, 37 °C	N/A	N/A	▼ (45)	N/A
$\Delta waaJ$ ( <i>waaR</i> ) ( <i>rfaJ</i> )	Glycosyltransferase for core assembly	LB, 37 °C	N/A	N/A	▼ (45)	N/A
$\Delta waaK/U$ ( <i>rfaK</i> )	K: Addition of GlcNAc in <i>Salmonella</i> U: <i>E. coli</i>	LBSS + 0.2% glu 30 °C	▲ (44)	N/A	N/A	N/A
$\Delta waaL$ ( <i>rfaL</i> )	O-antigen ligase	*LBSS + 0.2% glu 30 °C LB broth, 37 °C, 48 h LB broth, 37 °C, 36 h	*— (44)	N/A	N/A	— (41) ▲ 36 h (48)

Surprisingly, there are very few studies characterizing biofilm formation by *Salmonella* LPS mutants (Table 1). Most studies use 24-hour incubation in glucose-supplemented media. It

was shown that different biofilm results were obtained depending on the specific defect introduced into the LPS biosynthesis pathway. For example, *S. enterica* mutated at the inner core level,  $\Delta waaC$  – the shortest possible LPS mutation, produced more biofilm biomass than the wild-type strain (41). However, a mutant lacking an early inner-core phosphorylation ( $\Delta waaP$ ), truncating the LPS chain after the action of WaaC, produced significantly less biofilm material than the wild type in the same conditions (44). The LPS chain of the  $\Delta waaP$  mutant is only one heptose longer than that of  $\Delta waaC$ , yet they display drastically different biofilm phenotypes. Mutants manifesting longer glycoforms such as  $\Delta waaG$  and  $\Delta waaK$  showed increased biofilm production under the observed conditions and a mutant lacking only the O-antigen part of its LPS ( $\Delta waaL$ ) showed normal biofilm production. Therefore, the only mutation that decreases biofilm production in *Salmonella* is  $\Delta waaP$ . WaaP is the only kinase amongst the transferases (WaaC, WaaG, WaaK) and the ligase (WaaL) (25), however, to date there is no obvious link between LPS chain phosphorylation and biofilm formation.

In *E. coli*, a clear pattern can be seen despite only a few characterized mutants. Nearly all LPS-mutant biofilms grown for 24 hours produced less biomass compared to the wild type, but interestingly, after 48 hours of incubation, these mutants produce more biomass than the wild-type (**Table 1**). The relationship between LPS glycoforms and biofilm production in *E. coli* is clearly influenced by incubation time, which supports the most prevalent hypothesis that LPS mutants are defective in the first steps of the biofilm life cycle (41, 45). In other words, LPS potentially modulates adhesion capacity in the initial attachment phases of biofilm formation. However, if this is true, the few cells that stick must be super biofilm producers to surpass the wild-type biomass. Interestingly, it has been shown in both *E. coli* and *Salmonella* that the  $\Delta waaG$  mutants have increased colanic acid production (49, 50) and that *Salmonella*  $\Delta waaG$  mutants produce more cellulose and display less curli fimbriae (46).

Contrarily, it has also been suggested that the O-antigen portion of LPS acts a surfactant due to impaired swarming phenotypes in O antigen-deficient mutants (44). This implies that a strain with a non-truncated LPS molecules would adhere less well to surfaces than a mutant lacking an O antigen. Since adhesion is the first step in biofilm formation and the observed trend is that the LPS mutant biofilms develop later in time than the wild type, is it possible that the transition to the biofilm life form occurs slower but once it starts, it is more efficient? As mentioned, this could also

potentially be explained by an upregulation of cellulose and colanic acid production after prolonged incubation in biofilm-forming conditions. Another hypothesis is that truncated LPS glycoforms can result in increased exposure of surface adhesins (51). Adhesins are cell-surface components that allow bacterial cells to adhere to other cells or to abiotic surfaces. They include type I fimbriae, curli, AidA, TibA, BapA and Ag43 proteins, among many others (8, 52). Again, this would imply that cells elaborating truncated LPS glycoforms are better at adhering to surfaces and brings us back to a potentially dysregulated timing during biofilm progression/development.

### 1.4.5 Indirect biofilm factors are influenced by LPS glycoform

Despite the evidence implicating LPS glycoform as an important influence on biofilm formation, it has yet to be shown whether modifications in LPS structure are the direct cause of its effects. Bacteria expressing modified LPS have also been shown to have altered adhesion and flagellar motility (8, 14, 53), both of which can influence biofilm formation. More specifically, the  $\Delta waaG$  mutants (lacking outer core and attached O antigen) have been shown to have unstable membranes, impaired swimming and swarming motility, and can lack flagella and pili depending on the presence of WaaP (23, 49). Other contributing factors that may be affected by LPS glycoform are summarized in table 2.

**Table 2.** Motility, adhesion and auto-aggregation phenotypes of *Salmonella* and *E. coli* LPS mutants

(*E. coli* / *Salmonella*) N/A = not applicable, ▲ = increased, — = same as WT, ▼ = reduced

$\Delta$ LPS	Flagella-based motility	Adhesion	Auto-aggregation
$\Delta hldE$	▼ No flagella (41, 42) Reduced (42)	▼ Reduced on cells (42)	Yes (41, 42)
$\Delta waaC$	▼ No flagella (41, 43)	▲ Increased hydrophobicity on hexadecane droplets (41) Increased hydrophobicity (45)	Yes (41, 45)
$\Delta waaP$	▼ Swarm: impaired (50, 54) Reduced in 0.35% agar (53)	▼—▲ Reduced on polystyrene plate (53)	Similar to WT (41)

		Similar to WT hydrophobicity on hexadecane droplets (41) Increased hydrophobicity (45)	
<i>ΔwaaF</i>	▼ Swarm: impaired (50) No flagella (41, 43)	▲ Increased hydrophobicity on hexadecane droplets (41) Increased hydrophobicity (45)	Yes (41, 45)
<i>ΔwaaQ</i>	N/A	▲ Increased on sand (55)	Yes (56)
<i>ΔwaaY</i>	Swarming similar to WT (54)	▲ Increased hydrophobicity (45)	Yes (45)
<i>ΔwaaG</i>	▼ Swim: impaired, but depends on presence of waaP (49) Swarm: normal (50) Swarm: impaired (54) Swarm: precocious (49) Reduced in 0.35% agar (53) No flagella (43, 49) Swim reduced (57)	▼—▲ Reduced on polystyrene plate (53) Increased on PVC (46) Increased hydrophobicity (45) Similar to WT hydrophobicity on hexadecane droplets (41) Reduced on epithelial cells (57)	Yes (45) Similar to WT (41)
<i>ΔwaaB</i>	— Normal (58) Normal (57)	▲ Increased hydrophobicity (59)	N/A
<i>ΔwaaI/O</i>	N/A	▲ Increased hydrophobicity (45)	Yes (45)
<i>ΔwaaJ</i> ( <i>waaR</i> )	N/A	N/A	Yes (45)
<i>ΔwaaK/U</i>	▼ Swarm: impaired (50)	N/A	Yes (45)
<i>ΔwaaL</i>	▼ Swarm: impaired (50, 54, 60) Swimming: impaired (48)	▼ Similar to WT hydrophobicity on hexadecane droplets (41) Reduced adherence on cells (48) Reduced adhesion on lettuce (61)	Similar to WT (41)

As expected, motility and adhesion capacities are altered in LPS mutants (**Table 2**). Flagellar motility is known to be a determining factor in the transition from planktonic to sessile lifestyles (62) and is generally reduced in LPS mutants compared to the wild type. Considering that motility and biofilm formation are inversely related (62), it would make sense that a non-motile strain would thrive in the biofilm state. Similarly, the increase in adhesion capacity seen in most



LPS mutants would facilitate the first steps of the biofilm life cycle. Another biofilm-promoting characteristic observed in many of the above mutants is auto-aggregation, meaning the cells stick to each other to form clumps (63). All these factors can explain a significant increase in biomass compared to a wild-type strain in a mature biofilm, but still do not explain the delay observed with the initial biofilm formation.

#### **1.4.6 In search of an explanation for the delay in biofilm production**

Although it has never been demonstrated before, the delay in the initial steps of biofilm formation may suggest a difference in signalling and/or regulation pathways. Could the signalling pathways involved in the transition from the planktonic to the biofilm state be influenced by LPS structure? Interestingly, many signalling mechanisms involved in biofilm production also play a role in dynamic LPS modifications.

In conditions of high osmolarity, LPS and other components of the outer membrane can be modified by consequential actions of the PhoP/PhoQ and EnvZ/OmpR two-component systems (TCS) to increase membrane stability and cell survival (64, 65). Considering that biofilm-inducing environments can be chemically stressful, it is probable that these osmolarity sensors can play a role in the transition to the biofilm state. Truncated LPS glycoforms often render the OM unstable and more permeable. Thus, more osmolytes can access the periplasmic space and interact with the sensors, which might already be activated to help stabilize the membrane. Coincidentally, mutants with defective PhoP/PhoQ systems have been shown to have reduced biofilm production in various species of bacteria (66, 67, 68). The RpoE system is also an envelope stress response system (69). Incomplete/truncated LPS glycoforms cause an upregulation of the RpoE stress response, which in turn can cause alterations in OM composition (19). The RpoE regulon includes sRNAs RybB, MicA, and SlrA which have been shown to play a role in regulating LPS biosynthesis and modifications, such as incorporation of phosphoethanolamine (P-EtN) to lipid A and/or core segments and control of switching between different glycoforms. An in-depth review of the regulatory effects of RpoE and its linked sRNAs on LPS can be found here (19).

The Rcs system is particularly interesting in the context of this review because it is the only known signal transduction system to have a sensor in the OM and it is activated by LPS

biosynthesis defects and OM damage (69). It also happens to be a positive regulator for synthesis of colanic acid (70) and inhibits bacterial motility (71, 72). Specifically, deletions of LPS biosynthesis genes such as *waaF* and *waaG* were shown to cause excessive colanic acid production through activation of the Rcs system (19, 69, 73). Similarly, osmotic stress upregulates colanic acid production through the Rcs system (69). An in-depth review of the Rcs system can be found here (69).

In summary, there is a clear link between biofilm formation and LPS modification and/or damage. Although difficult to elucidate with the data available to date, the link is likely via induction of signalling mechanisms. It is known that changes in LPS structure induce stress-response systems and LPS-modification signals. It is also established that LPS mutations can increase the permeability of the OM. Media composition is a significant contributing factor in the transition to the biofilm state through activation of signals in harsh environments. Most of the TCS mentioned above are activated in response to both osmotic stress and OM damage. Therefore, baseline TCS activity and signalling mechanisms could be stimulated just to maintain survival in LPS mutants. If these cells are exposed to a harsh, biofilm-inducing environment, they might need more time than a wild-type strain to adapt to the environment before expending energy on biofilm production. As the biofilm-related TCS and stress-response systems are already stimulated, once biofilm production starts, it is in full force. Another logical but unproven explanation could be that most cells with LPS mutations fail to survive in high osmolarity media due to increased sensitivity. The few that survive may have gained a mutation helping them survive in high osmolarity while also inducing mass biofilm production.

### **1.4.7 Conclusion**

Although much is known about LPS biosynthesis and the role of LPS in pathogenesis in *Salmonella* and *E. coli*, the effects of LPS modifications on biofilm formation have rarely been characterized despite evidence of their importance. This review emphasizes the potential role of LPS in biofilm formation by summarizing various effects of LPS biosynthesis pathway mutations. Generally, these mutations cause a decrease in motility and an increase in adhesion and in auto-aggregation. Interestingly, biofilm formation is affected in a time-dependent manner, and we suggest that this may be due to the modified OM in LPS mutants, which could cause disruptions

in biofilm-related signalling systems. We also hypothesize that dynamic LPS modifications throughout the bacterial life cycle may play an important role in biofilm formation and/or in the transition from the planktonic to the biofilm state. However, the specific role of LPS in biofilm formation remains to be elucidated. Since it is specific to each bacterial strain, LPS is an interesting therapeutic target. Thus, gaining knowledge on the role of LPS in biofilm formation could potentially advance the development of therapeutic strategies in the context of bacterial biofilm-related infections, such as chronic UTIs, cystic fibrosis, endocarditis, and even chronic typhoid carriers.

### **1.4.8 References**

See « Annexes I. Références bibliographie – Revue de littérature »

## 2. Problématique et objectifs

Depuis 2017, *Salmonella* est sur la liste de l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) des pathogènes à besoin urgent de recherche et de développement de nouvelles thérapies (WHO, 2017). La fièvre typhoïde causée par *S. Typhi* est endémique dans de nombreuses régions où une grande partie de la population n'a pas accès à de l'eau potable. Parmi ces régions, les plus gravement endémiques se retrouvent dans l'Asie de l'Est, dans la Méditerranée orientale et dans l'Afrique subsaharienne (Hancuh et al., 2023). Il y a de plus en plus de cas de typhoïde causés par des souches multirésistantes (MDR) et ultrarésistantes (XDR) aux antibiotiques (Butt et al., 2021). En fait, selon la région endémique, entre 18 à 85 % des souches de *S. Typhi* en circulation sont soit MDR ou XDR (Saha et al., 2020). Cela crée une sérieuse inquiétude quant aux tactiques de contrôle de la maladie pour le futur, surtout considérant que le taux de mortalité de la typhoïde avant que les antibiotiques soient découverts était de 15%, (Levine & Simon, 2018). De plus, le changement climatique est un facteur de risque important, car cela augmente les risques d'inondation et de sécheresse et peut ainsi exercer une immense pression sur les systèmes d'assainissement et de distribution d'eau potable (Vanderslott et al., 2023).

L'état de porteur chronique asymptomatique causé par la formation de biofilms de *S. Typhi* dans la vésicule biliaire joue un rôle important dans la propagation de la maladie. En excréant continuellement la bactérie dans leurs selles, les porteurs infectent les personnes environnantes et contaminent le système sanitaire municipal. Cela pose surtout un problème dans les régions endémiques qui manquent un assainissement robuste des eaux usées. De plus, la forte résistance des biofilms fait en sorte que les porteurs ne soient pas traitables par antibiotiques et une opération pour enlever la vésicule biliaire est actuellement la solution la plus efficace. Le développement de stratégies thérapeutiques alternatives et moins invasives est donc nécessaire.

Malgré leur rôle important dans la pathogenèse, peu est connu sur les biofilms de *S. Typhi*. De nombreux gènes jouant un rôle dans les biofilms de *Salmonella* contiennent des mutations chez *S. Typhi*. Nous avons donc émis l'hypothèse que les biofilms de *S. Typhi* soient uniques dans leur production et leur composition. L'objectif principal de cette étude était de caractériser les biofilms de *S. Typhi* en conditions *in vitro* mimant l'environnement de la vésicule biliaire, avec le sous-objectif d'identifier un ou plusieurs joueurs clés dans la formation de biofilms par *S. Typhi*.

### **3. Biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhi does not depend on cellulose, curli fimbriae nor colanic acid, but is influenced by LPS glycoform (*Publication en préparation*)**

#### **3.1 Abstract**

Typhoid fever is a systemic bacterial infection caused by *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*). Following infection, 2-5% of patients become asymptomatic carriers through the development of resistant biofilms in the gallbladder. Biofilm is a sessile and protective bacterial lifestyle which envelops cells in a self-produced matrix. In other members of the *Enterobacteriaceae* family, biofilm matrix includes cellulose, colanic acid, curli fimbriae and biofilm-associated protein (Bap) constituents. Unlike its closest relatives, *S. Typhi* evolved to be human-specific and gained many pseudogenes in the process, some of which have been shown to be functionally important in biofilm-related pathways such as colanic acid and cellulose biosynthesis in other *Salmonella* strains. Additionally, curli expression is impaired in *S. Typhi*. Despite this, *S. Typhi* can still form a strong biofilm *in vitro* and in the gallbladder of chronic carriers. In this study, *S. Typhi* biofilm formation and composition was investigated. We demonstrated the importance of gallbladder-mimicking medium in *S. Typhi* biofilm formation *in vitro*. The presence of proteins and extracellular DNA within the biofilm were assessed through enzymatic treatment, staining and microscopy. This revealed that both proteins and extracellular DNA are structurally important in *S. Typhi* biofilms. Genes encoding common biofilm components (curli, cellulose, flagella, fimbriae, Bap) were deleted and effects on biofilm composition, structure and biomass were assessed by microscopy and quantification of staining. These deletions had little-to-no effect. The same was done with mutants deficient in various cell-surface and/or secreted *S. Typhi* polysaccharides (Vi-antigen, enterobacterial common antigen, LPS core, O-capsule). Only the deletion of genes *waaQGP* responsible for LPS core biosynthesis showed an unexpected dramatic increase in biofilm biomass.

## 3.2 Introduction

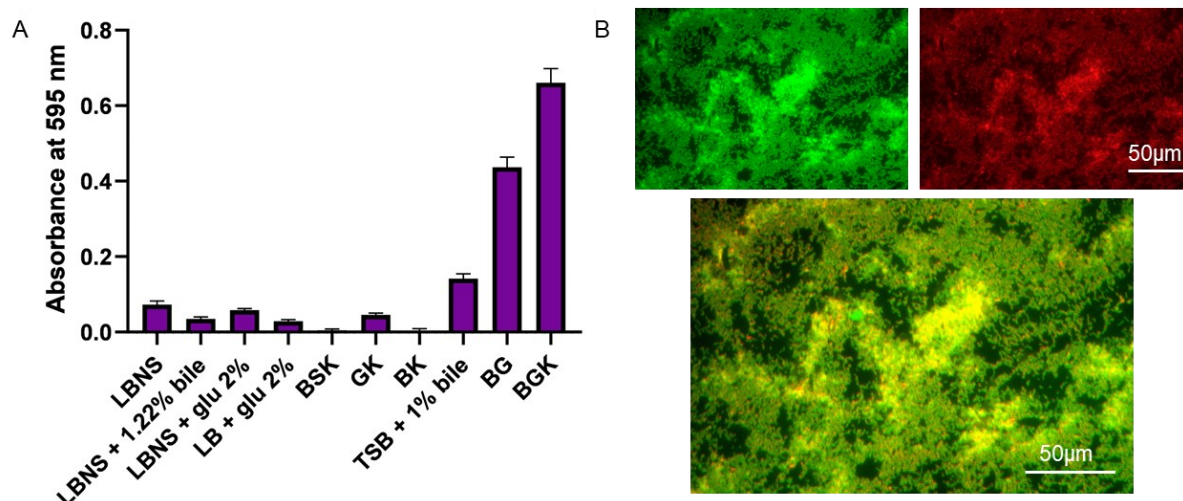
*Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) is a Gram-negative bacterium that causes typhoid fever, a systemic infection affecting 11-21 million people every year (1). Although currently treatable by antibiotics, *S. Typhi* infections kill between 110,000-161,000 people every year and resistance is rapidly rising (2, 3). Between 2-5% of those infected by *S. Typhi* develop a chronic asymptomatic infection and excrete the bacteria in their feces, spreading the infection through contaminated water in countries with poor sanitation (4). The only known reservoir for *S. Typhi* is humans, making chronic carriers particularly important for the persistence of the disease in endemic areas and for the propagation of emergent resistant strains to new areas. The chronic carrier state can be explained by the ability of *S. Typhi* to resist the harsh environment of the digestive tract and form biofilms in the gallbladder and hepatobiliary tracts (5). The gallbladder is an abdominal organ that stores bile, a fluid produced by the liver. Bile plays a role in digestion by breaking down lipids and thus is naturally toxic to most bacteria. However, many *Salmonella* species can adapt to high bile concentrations due to their diverse bile resistance factors such as efflux pumps, dynamic lipopolysaccharide modifications, stimulus-response regulatory modifications and DNA repair mechanisms (6).

Biofilms are a common bacterial lifestyle in stressful environments. Coated in a self-produced extracellular matrix, the cells can resist mechanical forces while being protected from harmful compounds such as antibiotics and disinfectants. Contents and distribution of biofilm matrix can vary between strains and species, but some common biofilm components include cellulose, colanic acid, curli fimbriae and biofilm-associated protein (Bap) constituents. These components are essential for biofilm development in the *Enterobacteriaceae* family, including *E. coli* and *S. Typhimurium* (7, 8, 9). Unlike its most similar serovars, *S. Typhi* evolved to be human-specific over time and has accumulated many mutations and pseudogenes in the process (10). Interestingly, pseudogenes caused by premature stop codons are found in *S. Typhi* colanic acid synthesis genes *wcaA*, *wcaD* and *wcaK* (10, 11, 12, 13) and in the cellulose synthesis machinery gene *bcsC* involved in cellulose synthesis (14). Additionally, curli fimbriae expression has been shown to be impaired in *S. Typhi* (15). Despite this, *S. Typhi* can form a robust biofilm in recently-discovered optimized *in vitro* conditions (16). Although the biofilms of *S. Typhi* have yet to be characterized, all indications suggest that their composition may be unique.

In this study, we sought to gain insight on *S. Typhi* biofilm composition by investigating biofilm factors that are important in the closest relatives of *S. Typhi*. Following deletion of these factors, effects on biomass, composition and distribution were assessed qualitatively and quantitatively through staining and microscopy. In search of other potential influential factors, *S. Typhi* surface components were also deleted, and the biofilms of these mutants were characterized. Genetic deletion inhibiting elongation of the LPS chain was shown to induce a biofilm production advantage.

### 3.3 Results

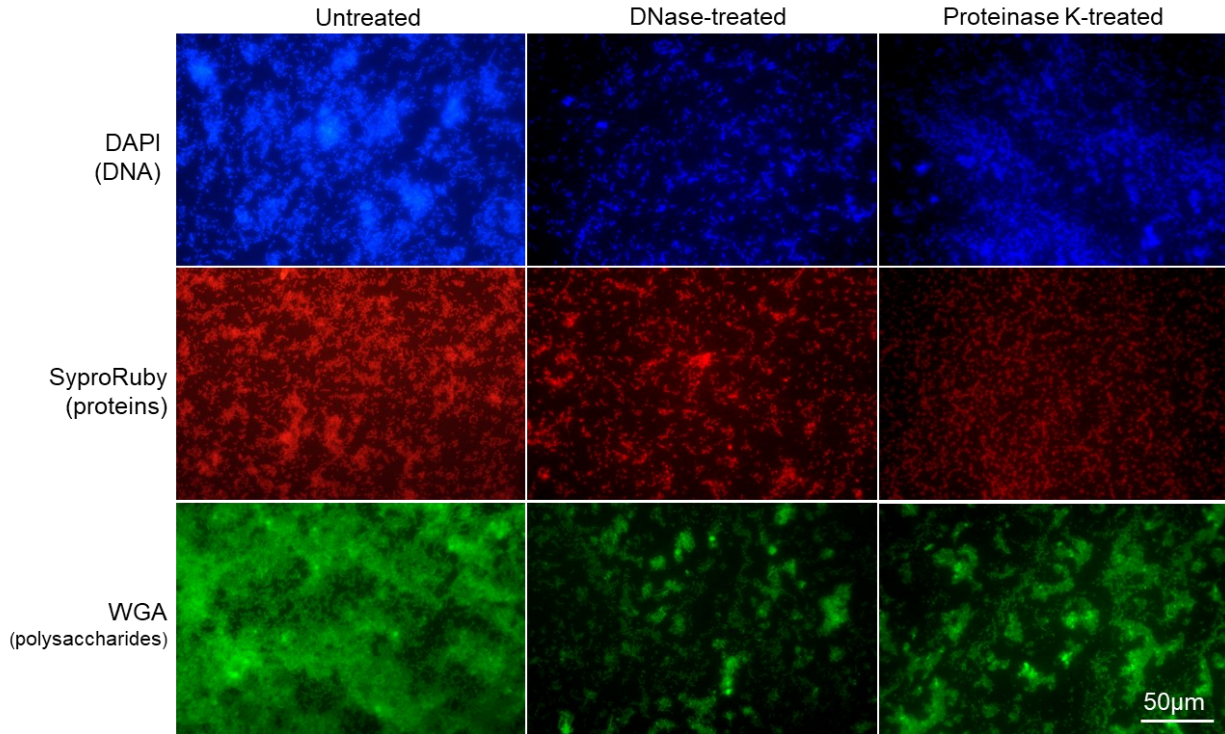
To emphasize ideal conditions for observation and analysis of *S. Typhi* biofilms, various media were tested, including the standard *Salmonella* biofilm media lysogeny broth without salt (LBNS) (17, 18). Addition of bile was also tested, as well as TSB + bile, which are the media frequently used for *S. Typhi* biofilm formation (19, 20, 21, 22). A complex media containing bile, potassium chloride and glucose developed by Dashti *et al.* 2016 was also tested. *S. Typhi* did not produce biofilm biomass in standard biofilm media as other *Salmonella* species do (Fig. 1A). Using Crystal Violet-staining of biofilms grown in multi-well dishes, it was observed that only a combination of bile and glucose with or without potassium chloride (BG and BGK media) allowed *S. Typhi* to produce non-negligible biofilm biomass. Then, we tested cell viability using the Live/Dead staining kit and most cells were still alive in a mature *S. Typhi* biofilm grown for 5 days in the BGK media (Fig. 1B).



**Figure 1.** Assessment of *S. Typhi* biofilm media and cell viability. **(A)** Biomass of *S. Typhi* biofilms in various media measured by crystal violet-staining after 5 days of incubation at 37 °C (LBNS: LB without salt; glu: glucose; BSK: nutrient broth, bile, sucrose, potassium chloride; GK: nutrient broth, glucose, potassium chloride; BK: nutrient broth, bile, potassium chloride; BGK: nutrient broth, bile, glucose, potassium chloride). Mean values of biological and technical triplicates  $\pm$  SEM are represented. **(B)** Green channel, red channel and overlay of green and red channels, microscopy image showing cell viability after 5 days of incubation at 37 °C on a glass coverslip in BGK media using Live/Dead staining kit.

To gain insight on matrix composition, we evaluated the presence and importance of eDNA, proteins and polysaccharides within *S. Typhi* biofilm structure by enzymatic treatment, staining and microscopy. When analyzed by specific fluorescent staining and microscopy, all three major molecular components were present in *S. Typhi* biofilms (Fig. 2). Biofilms were treated with DNase and proteinase K solutions for 24 hours at 37 °C. The DNase treatment disrupted the eDNA structure as well as the protein and polysaccharide structure, suggesting that eDNA is a major contributor to *S. Typhi* biofilm structure. Treating the biofilm with Proteinase K almost completely abolished protein-mediated biofilm structuration and had a similar effect on the DNA and polysaccharide structures. Thus, all the major molecular components were important for the structural integrity of the biofilm.

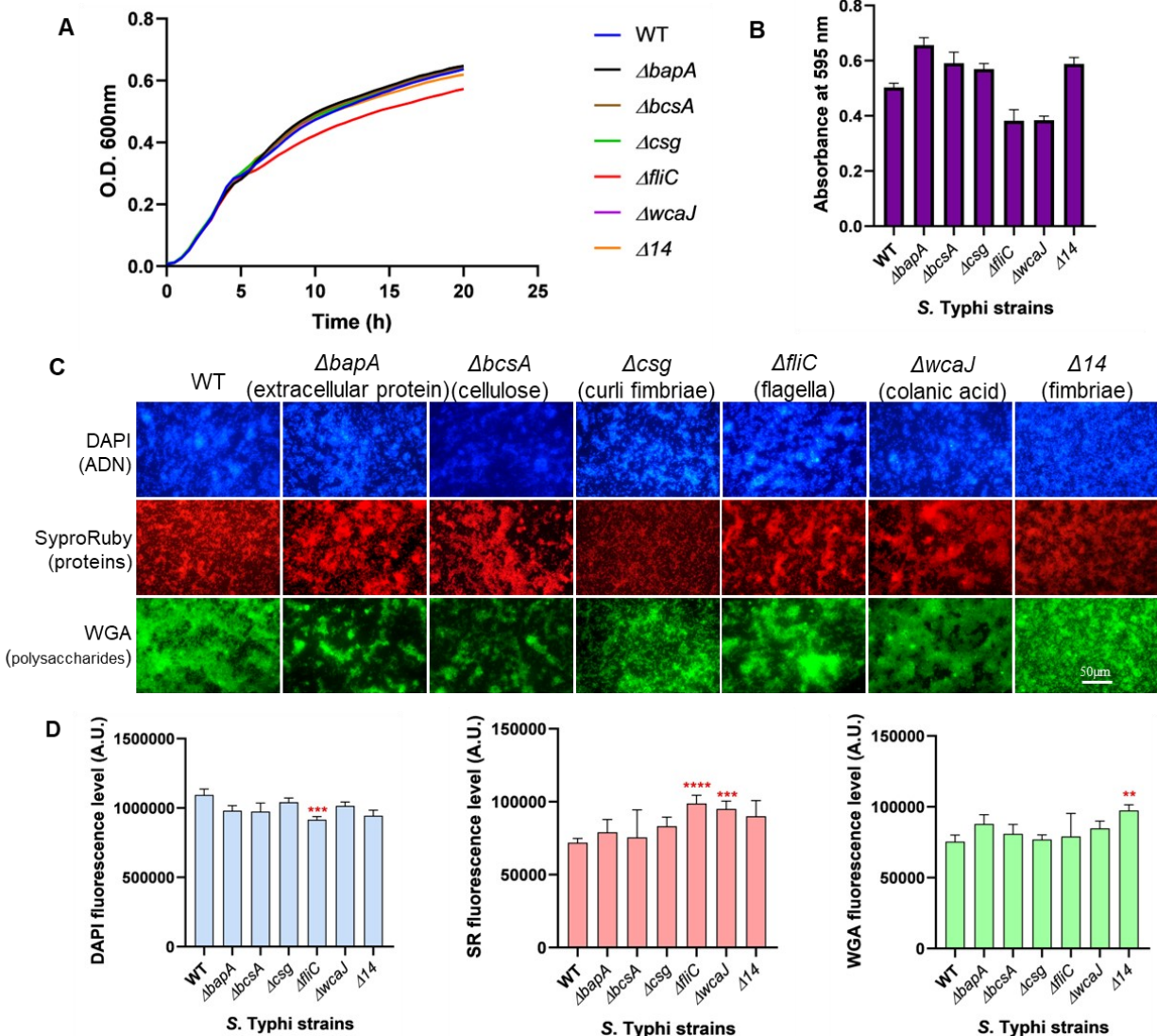




**Figure 2.** Enzymatic treatment of *S. Typhi* wild-type biofilms. Fluorescence microscopy of *S. Typhi* wild type untreated, DNase-treated or Proteinase K-treated biofilms. Labelling of biofilm components: DAPI-stained for total DNA, SyproRuby-stained for total proteins, WGA-stained for GlcNAc and sialic acid residues of polysaccharides.

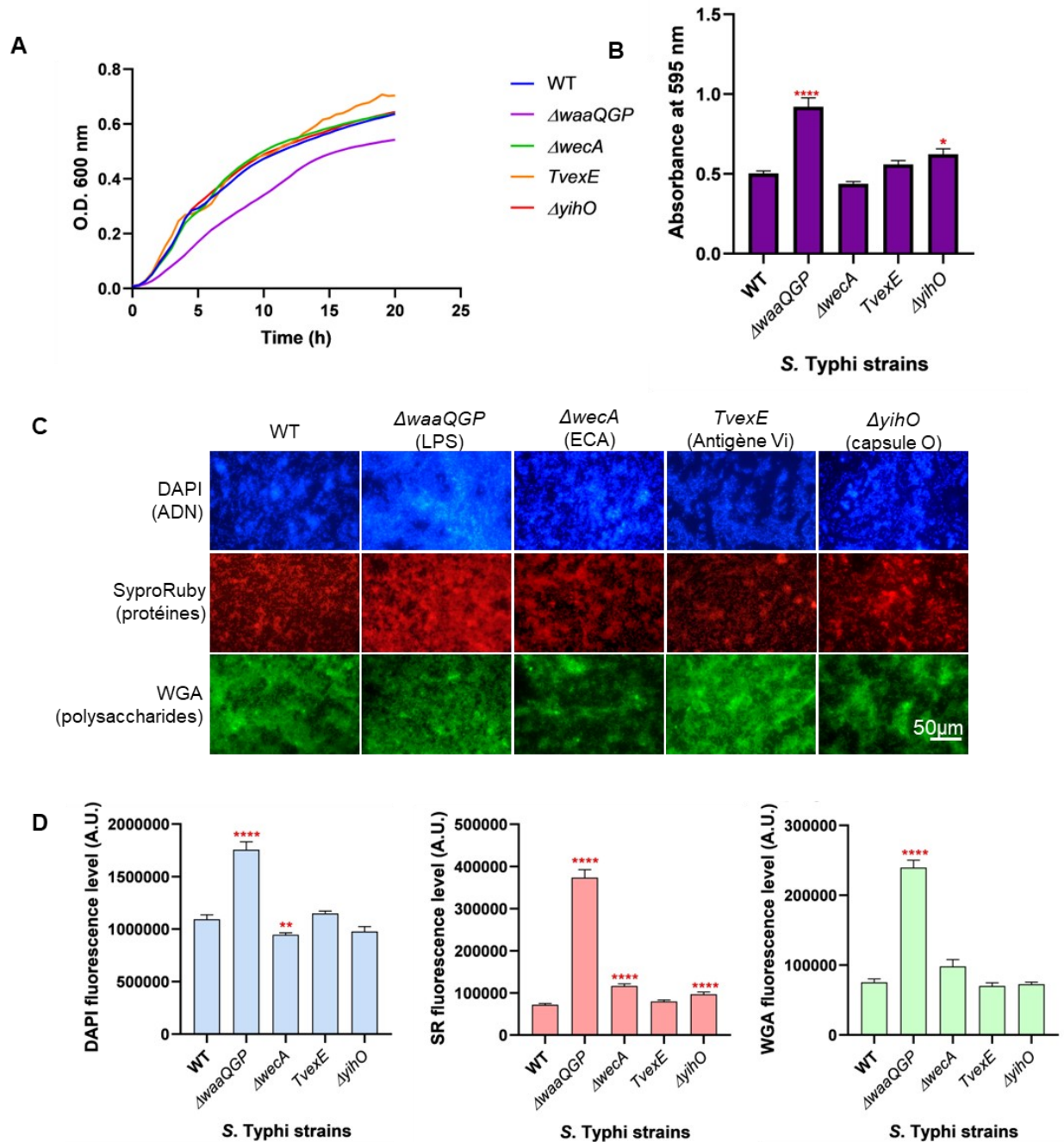
To determine the influence of major known biofilm components such as the BapA protein, cellulose, curli fimbriae, flagella, colanic acid and fimbriae on *S. Typhi* biofilms, we constructed isogenic deletion mutants for each component. Growth curves of these mutants were evaluated and no major growth defects or advantages compared to the wild type (WT) were observed in LB medium, except for the flagella mutant ( $\Delta$ *fliC*), which displayed a slight growth impairment (Fig. 3A). Biomass production was assessed in *S. Typhi* mutants and results showed that the deletion of genetic components commonly involved in biofilms had no effect on *S. Typhi* biofilm biomass as assayed via Crystal Violet staining (Fig. 3B). To investigate the effects of these deletions on biofilm structure and distribution, mature mutant biofilms grown on glass coverslips in BGK medium were stained with DAPI, SyproRuby, and WGA to detect DNA, proteins, and carbohydrates (respectively), then imaged via fluorescence microscopy (Fig. 3C). Slight variations in mature

biofilm structures were present among the mutants. Notable observations include less cohesive protein- and polysaccharide-mediated structuration of the curli ( $\Delta csg$ ) mutant biofilm and a lack of stained polysaccharides in the *bapA* and cellulose ( $\Delta bcsA$ ) mutants (Fig. 3C). Most mutant biofilms displayed a more “clumped” structure compared to the more evenly-dispersed structure of the wild-type biofilm, except for the total-fimbriae mutant ( $\Delta I4$ ), which resembled the wild type. The fluorescence levels of each staining were quantified by fluorimetry in a plate reader (Fig. 3D). Interestingly, a slight tendency can be observed with detection of less DNA and more proteins by fluorescence quantification in the flagella mutant ( $\Delta fliC$ ).



**Figure 3.** Assessment of *S. Typhi* biofilms – common *Salmonella* biofilm components. **(A)** Growth curves of *S. Typhi* mutants in LB media. Mean values of biological and technical triplicates are represented. **(B)** Biomass of *S. Typhi* mutants after 5 days of incubation at 37 °C. Mean values of biological and technical triplicates  $\pm$  SEM are represented. **(C)** Fluorescence microscopy labeling major components of biofilm. **(D)** Fluorescence quantification by fluorimetry of fluorescent-stained *S. Typhi* mutant biofilms in 24-well plates after 5 days of incubation at 37 °C. DAPI-stained for total DNA, SyproRuby-stained for total proteins, WGA-stained for GlcNAc and sialic acid residues of polysaccharides. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  using two-tailed unpaired parametric Student's t-test.

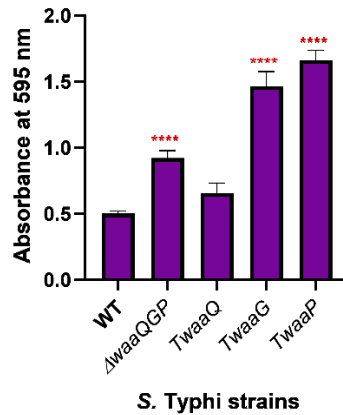
In search of contributors to biofilm formation in *S. Typhi*, we investigated the role of cell-surface components such as lipopolysaccharide (LPS), enterobacterial common antigen (ECA), Vi antigen and O-antigen capsule. To determine whether these components play a role in *S. Typhi* biofilms, genes involved in their respective biosynthesis were first deleted. Growth-curve analysis in LB medium revealed that the LPS-rough mutant ( $\Delta waaQGP$ ) showed slightly impaired growth compared to the WT (Fig. 4A). The mutants were analysed for biofilm production by biomass quantification via crystal violet staining and absorbance reading. The LPS mutant showed a significant increase in biomass in the mature biofilm compared to the WT (Fig. 4B). To determine the effects that these deletions had on biofilm structure, the mutant biofilms grown on glass coverslips in BGK medium were stained with DAPI (DNA), SyproRuby (proteins) and WGA (polysaccharides) and observed by fluorescence microscopy (Fig. 4C). Notable observations include the very dense and bright protein and DNA structures of the  $\Delta waaQGP$  LPS-mutant biofilm, the robust DNA network of the  $\Delta wecA$  mutant biofilm, and the more “clumped” structure of the  $\Delta yihO$  O-antigen capsule mutant biofilm (Fig. 4C). The fluorescence levels of each staining were quantified by fluorimetry in a plate reader (Fig. 4D). Of particular note, increased biomass and a substantial increase in DNA, protein and polysaccharide content was observed for the LPS mutant (Fig. 4D).



**Figure 4.** Assessment of *S. Typhi* biofilms – Surface polysaccharide mutants. **(A)** Growth curves of *S. Typhi* mutants in LB media. Mean values of biological and technical triplicates are represented. **(B)** Biomass of *S. Typhi* mutants after 5 days of incubation at 37 °C. Mean values of biological and technical triplicates  $\pm$  SEM are represented. **(C)** Fluorescence microscopy labeling major components of biofilm and **(D)** fluorescence quantification by fluorimetry of fluorescent-stained *S. Typhi* mutant biofilms in 24-well plates after 5 days of incubation at 37 °C. DAPI-stained

for total DNA, SyproRuby-stained for total proteins, WGA-stained for GlcNAc and sialic acid residues of polysaccharides. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  using two-tailed unpaired parametric Student's t-test.

The only observed factor showing potential to have a major influence on *S. Typhi* biofilm formation was LPS. Since we used a three-gene deletion mutant ( $\Delta waaQGP$ ), the effect of LPS integrity on biofilm formation was investigated by quantification of biomass production in individual strains with inhibited steps in the LPS synthesis pathway. The transposon-insertion strains *TwaaQ* (heptosyltransferase for addition of HepIII to HepII), *TwaaG* (glycosyltransferase adding glucose to HepII) and *TwaaP* (heptose kinase for phosphorylation of HepI), strains were tested to determine if a specific step of LPS biosynthesis played a role in the overproduction effect observed in the  $\Delta waaQGP$  mutant. The *TwaaQ* strain produced an amount of biomass similar to the WT, while the *TwaaG* and *TwaaP* strains produced almost triple the amount of biomass compared to the WT (Fig. 5).



**Figure 5.** Biomass of various *S. Typhi* strains with inhibited steps of LPS biosynthesis after 5 days of incubation at 37 °C. Mean values of biological and technical triplicates  $\pm$  SEM are represented. \*\*\*\* $p < 0.0001$  using two-tailed unpaired parametric Student's t-test.



### 3.4 Discussion

BGK media induces biofilm formation in *S. Typhi*. The development of a chronic carrier state after an *S. Typhi* infection is explained by the presence of biofilms in the gallbladder and hepatobiliary ducts (4, 23, 24). The gallbladder contains a high concentration of bile to which *S. Typhi* can adapt with its efficient stress response mechanisms (6). In BGK medium, bile acts as a stress factor to induce biofilm formation (16). However, bile alone was not sufficient to induce biofilm production, as observed by the low amount of biomass in other bile-containing media (Fig. 1A). Glucose was used as a basic carbon source in BGK medium, however replacing the carbon source by sucrose completely abolished biofilm formation capacity (Fig. 1A). This suggests that glucose may be specifically involved in *S. Typhi* biofilm induction. Interestingly, *S. Typhi* has been shown to cause glucose accumulation in the blood (hyperglycemia) during acute infection through induction of metabolic changes in macrophages (25). Coincidentally, hyperglycemia causes decreased gallbladder movement (26) and increases the risk of gallstone disease by 50% (27). Considering that there is a positive correlation between gallstone disease, gallbladder stasis, and bacterial colonization of the gallbladder (24, 28), the hyperglycemic state suffered during acute infection may favour the development of chronic carriage, although this link has never been studied directly.

Defining the structural role of proteins and eDNA in *S. Typhi* biofilms. The presence of extracellular DNA within biofilms of many different bacteria has been demonstrated and is often linked to increased biofilm stability and promotion of adhesion to abiotic surfaces (29). However, eDNA has been shown to play the opposite role in *Salmonella* strains such as *S. Typhimurium*, with cells attaching more efficiently in the presence of DNase and biofilms being undisrupted by enzymatic dispersal of DNA (30). Our results are in contrast of these findings. In this study, *S. Typhi* biofilms were treated with either DNase or Proteinase K and stained fluorescently to visualize the effects of each enzyme. Treatment with DNase completely disassembled the mature *S. Typhi* biofilm, as can be seen with the very little remaining polysaccharide and protein structures following treatment (Fig. 2). This suggests that extracellular DNA plays an important structural role in mature *S. Typhi* biofilms. It has been previously shown that biofilms produced by *S. Typhi* chronic carrier strains contain more eDNA than acute infection strains (31). Biofilm matrix is also known to include many different proteinaceous components, some of which are secreted (Bap components) and others that are cell-attached (fimbriae and flagella) (7, 32). Although not as

drastic as DNase treatment, Proteinase K treatment disassembled most of the polysaccharide structure within *S. Typhi* biofilms (Fig. 2). DNA distribution following Proteinase K treatment was also disturbed, which emphasizes that the biofilm is a cohesive structure depending on all major classes of components for structural integrity. Altogether, these results demonstrate that both eDNA and protein components are found within the mature *S. Typhi* biofilm and both play an important role in maintaining the integrity of this structure.

Deletion of conventional biofilm-related genes did not affect *S. Typhi* biofilm biomass. Unlike *S. Typhi*, other *Salmonella* strains such as *S. Typhimurium* can form robust biofilms in standard LBNS media (33, 34, 35, 36). The content of biofilm matrix is variable based on strain, medium and other conditions like temperature and surface composition. Despite variations, major recurring biofilm components include cellulose, curli and other fimbriae, flagella, colanic acid and Bap proteins (8). In our study, genetic deletions of these components in *S. Typhi* had no significant effect on biofilm biomass (Fig. 3B). This suggests that *S. Typhi* biofilms do not depend on the production of cellulose, curli, other fimbriae, flagella, colanic acid nor BapA protein. As mentioned, most *S. Typhi* strains contain pseudogenes in their cellulose and colanic acid biosynthesis clusters and display defective curli expression; therefore, it is not surprising that these three components were not major components of *S. Typhi* biofilms. The lack of an effect following the deletion of flagella and of all fimbriae is much more surprising, since flagella have been shown to be necessary for development of biofilms on gallstones and plastic in *S. Typhimurium* (37, 38), and fimbriae are known to be important adhesins involved in surface colonization in *Salmonella* (39).

Insights on the roles of common *Enterobacteriaceae* biofilm components in *S. Typhi* biofilm structuration. Fluorescent staining and quantification of DNA, proteins and polysaccharides of mutant biofilms allowed assessment of whether each component plays a role in wild-type biofilm structuration. Less DNA content and more protein content were detected in the flagella mutant biofilm (Fig. 3D), and the distribution also seemed more “clumped” than the wild type (Fig. 3C). Considering that its growth curve is slightly impaired (Fig. 3A) and its total biomass is unchanged compared to the wild type (Fig. 3B), these detections indicate that flagella and/or motility play a role in wild type biofilm structuration. Other notable microscopy observations include the dispersed polysaccharides of the BapA- and cellulose-mutant biofilms and the less

bright protein-stained image of the curli fimbriae-mutant biofilm (Fig. 3C). According to the fluorescence quantification, the colanic acid-mutant biofilm contained higher protein levels and the total fimbriae mutant  $\Delta I4$  contained higher polysaccharide levels (Fig. 3D). Thus, the flagella mutant aside, the other mutations in common *Enterobacteriaceae* biofilm components did not cause any changes in general biofilm distribution drastic enough to be detected by both methods. According to these results, BapA, cellulose, curli, all other fimbriae, and colanic acid each individually do not play a major role in *S. Typhi* biofilm structuration under these conditions.

Insights on the roles of ECA, Vi antigen, O-antigen capsule and LPS in *S. Typhi* biofilms.

In bacteria, cell-surface polysaccharides are known to be important modulators of adhesion, stress responses and environmental interactions (40, 41). We therefore hypothesized that *S. Typhi*'s surface polysaccharides may play a role in biofilm formation, especially since none of the more common biofilm components influenced biofilm structuration. A *wecA* deletion creates a strain unable to synthesize the enterobacterial common antigen (ECA) (42). In our study, this strain produced an amount of biomass equal to the wild type (Fig. 4B) and showed no major differences in biofilm structure (Fig. 4C) but contained significantly less DNA content and more protein content (Fig. 4D). The role of ECA in *S. Typhi* biofilms has never been elucidated, although it has been shown that ECA is necessary for biofilm formation in *S. enterica* serovar Enteritidis (33) and can upregulate colanic acid synthesis in *Serratia marcescens* (43). Despite this, our results demonstrate that ECA is not required for *S. Typhi* biofilm formation. A *vexE* deletion prevents the Vi antigen from being assembled at the cell surface (44). In previous studies, the *S. Typhi* Vi antigen has been shown to play no role in biofilm formation (23). Our results are in concordance with this, as a transposon insertion in *vexE* rendering it nonfunctional had no effect on biofilm biomass, structure or distribution of DNA, proteins or polysaccharides (Fig. 4B, C, D). Thus, the Vi antigen does not play a major role in biofilm formation in *S. Typhi*. A deletion of *yihO* prevents expression of the O-antigen capsule (45), and this deletion in *S. Typhi* had no significant effect on biofilm biomass (Fig. 4B). Biofilm structure in this mutant seems more “clumped” (Fig. 4C) and fluorescence quantification revealed that the biofilm contains slightly more protein content than the wild type (Fig. 4D). It has been shown in other *Salmonella* that the O-antigen capsule is not required for adhesion to plastic or glass but plays a major role in attachment to gallstones (46, 47). Our results also demonstrate that the O-antigen capsule is not required for adhesion of *S. Typhi* to polystyrene plastic, even in the presence of a gallbladder-mimicking environment. The *S. Typhi*



$\Delta waaQGP$  mutation induced a minor growth defect in LB (Fig. 4A), but greatly increased biofilm formation capacity in BGK media, reaching almost double the amount of biomass produced by the wild type (Fig. 4B). Biofilm structure was denser (Fig. 4C) and expectedly, DNA, protein, and polysaccharide content was increased in this mutant (Fig. 4D).

Investigating the role of LPS integrity in *S. Typhi* biofilms. Since the  $\Delta waaQGP$  mutant is a triple-gene knockout, we looked at each component individually in the *TwaaQ*, *TwaaG*, *TwaaP* strains. WaaQ is a transferase involved in the addition of a side-chain heptose to the core oligosaccharide, the 10th step of LPS biosynthesis (48), and this mutant produced a similar amount of biomass to the wild type (Fig. 5A). On the other hand, WaaG is a transferase that adds a glucose molecule to the main chain, the 12th step of LPS biosynthesis (49), and WaaP is a kinase responsible for the 8th step in *Salmonella* LPS biosynthesis which is the phosphorylation of the first heptose in the main chain (48). In contrast to *TwaaQ*, the *TwaaG* and *TwaaP* strains produced an amount of biofilm biomass nearly triple the level of the wild type (Fig. 5A). Despite not all LPS mutants producing the same effect, we investigated further on the cause of the biomass super-production seen in the *TwaaG*, *TwaaP* and  $\Delta waaQGP$  strains. LPS mutations have been shown to decrease motility and increase adhesion in *Salmonella* and *E. coli* (50, 51, 52, 53), which are both factors that can cause an increase in biofilm production (54, 55). Also, isolation and characterization of bile-resistant mutants often reveals modifications in LPS biosynthesis pathways (6). *In vivo* LPS modifications are known to be dynamic and highly regulated in *Salmonella*, allowing adaptation of the bacteria to its environment (56, 57). Therefore, LPS alterations may be advantageous to *S. Typhi* in the harsh gallbladder environment if they induce bile resistance and production of a protective and resistant biofilm. Interestingly, it has been shown that only 20% of stained cells within an *S. Typhi* biofilm grown on the surface of gallstones in the presence of bile were labeled for LPS (22). Thus, LPS alterations may play a significant role in *S. Typhi*'s ability to form biofilms.

### 3.5 Conclusion

Many previously studied *Salmonella* biofilms have been shown to be composed of BapA proteins, cellulose, curli fimbriae and colanic acid. *S. Typhi* biofilm composition has never been characterized and this serovar contains pseudogenes in its cellulose and colanic acid biosynthesis

clusters, as well as dysfunctional curli fimbriae expression. Here, we demonstrate that *S. Typhi* biofilm production is unique in its circumstances, being optimally induced by a complex medium combining bile, glucose and potassium chloride. We also show that eDNA is an important structural component of *S. Typhi* biofilms, and that the protein, nucleic acid and polysaccharide portions of the biofilm matrix are structurally interdependent. *S. Typhi* biofilm production does not depend on functional BapA, cellulose, curli fimbriae or colanic acid biosynthesis, nor on the presence of flagella or any other fimbriae. Also, surface polysaccharides ECA, O-antigen capsule and Vi antigen individually are not major *S. Typhi* biofilm components. On the other hand, defects in the LPS biosynthesis pathway mostly induce an overproduction of biofilm biomass. We suggest that this may be applicable in the environmental context of the gallbladder, as dynamic LPS modifications can allow bacteria to adapt to their environment.

### 3.6 Materials and methods

Bacterial strains & mutagenesis by allelic exchange. All bacterial strains used are listed in Supplementary Table S1 (**Annexes**). All strains were routinely grown in lysogeny broth (LB) or LB agar at 37 °C overnight. For mutant construction, mutagenesis by allelic exchange with suicide vector pMEG375 was used as described in Forest et al. (2007). Each mutant was constructed using two pairs of primers, named F1/R2 and F3/R4. All primers used are listed in Supplementary Table S2 (**Annexes**).

Growth of *S. Typhi* biofilms. Overnight cultures in LB medium at 37 °C were diluted 1:10 in BGK medium adapted from Dashti et al. 2016, containing 1.22% purified ox bile (Sigma), 2% glucose, 0.25% potassium chloride. In a sterile 24-well polystyrene plate (Sarstedt), 1 mL of prepared culture was deposited in each well. The plate was sealed with parafilm and incubated at 37 °C for 5 days under stationary conditions.

Growth curves. Overnight cultures in LB medium at 37 °C were diluted 1:100 in LB medium and 200µl were aliquoted in each well of a sterile polystyrene 96-well plate. The plate was incubated in a microplate reader under stationary conditions at 37 °C for 20 hours, with 3 seconds of orbital shaking before each read. Growth was measured by reading absorbance at 600nm every 30 min in

a microplate reader (Molecular Devices). Mean values of minimum three biological replicates containing technical triplicates were plotted.

Enzymatic dispersion assay. After 5 days of incubation, BGK medium was removed from the 24-well plate and replaced with 1 mL of fresh BGK medium containing either 1  $\mu$ l of a 20mg/mL Proteinase K solution (ThermoFisher) or 1  $\mu$ l of DNase solution (NEB) per mL of BGK. The plate was then incubated for 24 hours at 37 °C. Biomass quantification and microscopy were performed as described below.

Biomass quantification assay. After 5 days of incubation, BGK medium was removed from the 24-well plate and each well was delicately rinsed with 1 mL of water. Water was removed and the plate was dried in an oven at 40 °C. Once completely dry, 1 mL of 0.5% crystal violet solution was added to each well and incubated for 30 min. Wells were then washed three times with 1 mL of water and plate was dried at 40 °C again. Once completely dry, 1 mL of an 80:20 ethanol/acetone solution was placed in each well to release the stain. After 5 minutes, 150  $\mu$ l of this was transferred to a clear 96-well plate. Biomass was quantified by measuring absorbance at 595 nm in a microplate reader (Molecular Devices).

Fluorescent staining and microscopy. Sterile round glass coverslips (ThermoFisher) were placed in the bottom of a well in a 24-well plate. Biofilms were grown as described above. After 5 days of incubation, BGK medium was removed from the 24-well plate and each well was delicately rinsed once with 1 mL of PBS. Biofilms were fixed for 5 min with 1 mL of a 4% paraformaldehyde solution and washed gently with 1mL of PBS. According to manufacturer's instructions, biofilms were stained with FilmTracer SYPRO Ruby biofilm matrix stain (SR; Molecular Probes) for protein components, DAPI (ThermoFisher) for DNA components and wheat germ agglutinin-Alexa Fluor 488 (WGA; Invitrogen) for polysaccharide components. Plates were incubated at room temperature for 30 min protected from light and rinsed three times delicately with PBS. Coverslips were removed from wells with tweezers and flipped onto a glass slide with a drop of mounting oil. Biofilms were visualized by fluorescence microscopy on a Nikon Eclipse E600 upright fluorescence microscope using a 60X/0.85 air WD 0.3 objective. Light filters included the Chroma DAPI filter with excitation between 325-275 nm and emission between 435-485 nm, the Chroma FITC filter with excitation between 460-500 nm and emission between 510-560 nm, and the Chroma TRITC filter with excitation between 530-560 nm and emission between 590-650 nm.

Images were acquired at an exposure time of 500 ms using CMOS Nikon DS-Ri2 4908 x 3264 pixels and NIS-elements software (Nikon).

Fluorescence quantification assay. Biofilms were grown in 24-well plates as described above. After 5 days of incubation, BGK medium was removed from the 24-well plate and 1 mL of stain was added to each respective well as described above. Plates were incubated at room temperature for 30 min protected from light and rinsed three times delicately with PBS, the first two times with 2 mL and the third time with 1 mL. Finally, 1 mL of PBS was vigorously added to each well to create a suspension of the stained biofilm. 200 µl of this suspension was added to a well in an opaque black 96-well plate and fluorescence was quantified in a microplate reader (Molecular Devices). For SR, excitation 450 nm and emission 650 nm. For DAPI, excitation 359 nm and emission 461 nm. For WGA, excitation 488 nm and emission 528 nm.

Statistical analysis. All statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) two-tailed unpaired parametric Student's t-test. Where applicable, automatically generated mean  $\pm$  SEM is represented.

### **3.7 References**

See « Annexes II. Références bibliographiques – Publication en préparation (Section 3.7) ».

## 4. Discussion globale

L'état de porteur chronique asymptomatique de la fièvre typhoïde survient dans environ 5% des cas à la suite d'une infection à la bactérie *S. Typhi*. Cette dernière forme un biofilm dans la vésicule biliaire du patient et parvient à survivre dans l'environnement stressant de la vésicule biliaire ainsi qu'aux traitements antibiotiques. Les biofilms de plusieurs souches de *Salmonella* sont bien étudiés et sont principalement composés de cellulose, d'acide colanique, de protéines BapA, de fimbriae curli et d'ADN extracellulaire (Jonas et al., 2007; Steenackers et al., 2012). De son côté, *S. Typhi* a subi une évolution hôte-spécifique et a accumulé plusieurs pseudogènes avec le temps (Holt et al., 2009), dont certains sont dans les gènes de biosynthèse de la cellulose et de l'acide colanique (Deng et al., 2003; MacKenzie et al., 2019; Nuccio & Bäumlér, 2014; Pickard et al., 2003). De plus, l'expression de fimbriae curli est différente chez *S. Typhi* (Ou et al., 2023). Étant le seul réservoir de *S. Typhi*, le porteur chronique joue un rôle important dans la propagation de la fièvre typhoïde, mais la formation et la composition des biofilms de *S. Typhi* n'ont jamais été caractérisées *in vitro*. Considérant cela, l'objectif principal de mon étude était de caractériser les biofilms de *S. Typhi* sous conditions *in vitro* optimisées et mon hypothèse était que ces biofilms soient uniques dans leur composition.

### 4.1 Rôles de la bile, du glucose et du chlorure de potassium

L'environnement naturel du développement de biofilms de *S. Typhi* est la vésicule biliaire. Afin d'optimiser les conditions d'observation de biofilms de *S. Typhi* *in vitro*, une méthode a été développée par Dashti *et al.* (2016) (Dashti et al., 2016). Nous avons adapté notre milieu de culture de cette méthode et l'avons nommé le BGK, un acronyme dénommant la bile, le glucose et le chlorure de potassium (KCl). Ce milieu inclut de la bile pour simuler le facteur de stress principal de la vésicule biliaire. Plusieurs souches de *Salmonella* peuvent résister à la bile grâce à leurs nombreux mécanismes de réponse aux stress, et *S. Typhi* ne fait pas exception. Il est même proposé que lors de la pathogénèse, la bile agisse comme signal de localisation (Sistrunk et al., 2016). Cependant, nous observons que la bile n'est pas le seul facteur nécessaire pour la production de biofilms par *S. Typhi* (Section 3.3, **Figure 1A**). Le rôle du glucose dans l'induction des biofilms

chez *S. Typhi* n'est pas connu, mais nous avons démontré que son rôle est nécessaire et possiblement spécifique. Par exemple, le sucrose est un disaccharide composé de glucose et de fructose (NCBI, 2023). Si le rôle du glucose était simplement nutritif, le sucrose aurait potentiellement pu combler les besoins nutritifs de *S. Typhi*. Cependant, nous démontrons qu'un échange de glucose par le sucrose dans le milieu BGK diminue radicalement la quantité de biomasse produite (Section 3.3, **Figure 1A**). Comme mentionné dans la section 3.4, l'effet spécifique du glucose pourrait être lié à la pathogenèse de *S. Typhi*. En effet, un patient atteint d'une infection aiguë de la fièvre typhoïde souffre souvent aussi d'hyperglycémie, soit un taux élevé de glucose dans le sang (Wang et al., 2021). Par coïncidence, l'hyperglycémie est associée à la stase de la vésicule biliaire et à un risque augmenté de développer des calculs biliaires (Ruhl et al., 2018). Nous proposons donc un lien qui n'a jamais été étudié auparavant, soit celui entre l'hyperglycémie subit lors de l'infection aiguë et le développement de biofilms dans la vésicule biliaire et sur les calculs biliaires. Pour ce qui est du chlorure de potassium, Dashti *et al.* (Dashti et al., 2016) expliquent que la bile obtenue commercialement est dépourvue de sels retrouvés dans de la bile naturelle. Ainsi, ils rajoutent du chlorure de potassium afin de mimer plus précisément l'environnement naturel. Nous observons que le chlorure de potassium n'est pas nécessaire pour le développement de biofilms par *S. Typhi* car une quantité considérable de biomasse est observée en son absence (Section 3.3, **Figure 1A**). Néanmoins, la présence de chlorure de potassium contribue positivement à la biomasse obtenue.

## 4.2 Rôles structurels de l'ADN extracellulaire et des protéines

Dans le modèle classique de biofilm, il est proposé que la matrice extracellulaire soit structurellement soutenue par un entrelacement de polysaccharides, de protéines et d'ADNe (Donlan, 2002). Cependant, chez quelques bactéries, dont certaines souches de *Salmonella* et *Caulobacter*, il a été démontré que l'ADNe joue un rôle dans l'inhibition et dans la dispersion de biofilms (Berne et al., 2010; Wang et al., 2014). Puisque les biofilms de *S. Typhi* n'ont que rarement été étudiés à travers le temps, le rôle de l'ADNe dans ces biofilms n'a jamais été démontré. Lors d'un traitement enzymatique dispersant l'ADNe de la matrice du biofilm de *S. Typhi*, nous avons observé une destruction complète de la structure physique du biofilm (Section 3.3, **Figure 2**). Cela implique un rôle structurel important pour l'ADNe au sein des biofilms de *S. Typhi* en milieu BGK.

Ceci est soutenu par la découverte que les souches isolées chez des porteurs chroniques dans la vésicule biliaire contiennent davantage d'ADNe dans leurs biofilms par rapport aux souches isolées chez des patients en infection aiguë (Devaraj et al., 2021). En fait, un niveau élevé d'ADNe dans la matrice de son biofilm pourrait conférer à *S. Typhi* un avantage de protection du système immunitaire de l'hôte, un avantage d'adaptation de la population grâce au transfert horizontal de gènes, ainsi qu'un apport de stabilité de la matrice (Montanaro et al., 2011).

D'autre part, un traitement dispersant tout composant protéique de la matrice du biofilm de *S. Typhi* a eu un effet similaire à celui de la dispersion de l'ADN (Section 3.3, **Figure 2**). Comme l'ADNe, les protéines semblent jouer un rôle structurel important dans la matrice du biofilm de *S. Typhi*. Contrairement à l'ADNe, il y a plusieurs sortes de protéines qui peuvent se trouver dans la matrice. Certaines peuvent être secrétées, comme les Baps et d'autres adhésines, tandis que d'autres peuvent être attachées à la surface de la cellule comme les fimbriae et les flagelles (Fong & Yildiz, 2015). Nous proposons que ces protéines travaillent en tandem pour structurer la matrice extracellulaire. En fait, chez *Staphylococcus aureus*, il a été démontré que plusieurs protéines jouent des rôles complémentaires au cours du développement de son biofilm. Certains contribuent aux phases initiales d'attachement du biofilm à une surface, tandis que d'autres favorisent une accumulation de biomasse et une stabilité augmentée de la matrice (Speziale et al., 2014).

En somme, nous démontrons que les biofilms de *S. Typhi* ne sont pas simplement composés d'un entrelacement complexe d'exopolysaccharides, d'ADNe et de protéines. Les composants de chacune ces grandes classes moléculaires jouent un rôle structurel important pour soutenir la matrice extracellulaire, et cette découverte correspond au modèle classique démontré chez plusieurs autres bactéries (Flemming & Wingender, 2010; Fong & Yildiz, 2015; Montanaro et al., 2011). Dans des études ultérieures, il serait également pertinent d'examiner à quelle étape de formation de biofilm chaque composant joue son rôle.

### **4.3 Rôle des composants les plus communs de biofilms de *Salmonella***

Chez d'autres *Salmonella*, il a été démontré que les biofilms sont principalement composés de cellulose, d'acide colanique, de fimbriae curli, d'autres fimbriae, de flagelles et de protéines

BapA. Puisque *S. Typhi* contient des pseudogènes dans les gènes de biosynthèse de l'acide colanique et de cellulose (Deng et al., 2003; MacKenzie et al., 2019), il était attendu qu'aucun de ces deux composants ne soit produit en contexte de biofilm. Ce n'était donc pas surprenant qu'une délétion des gènes nécessaires pour la biosynthèse de ces composés n'ait aucun effet sur la biomasse de biofilm produit par *S. Typhi* (Section 3.3, **Figure 3B**). Nous démontrons toutefois que la formation de biofilms par *S. Typhi* ne dépend pas sur la présence de cellulose, ni sur l'acide colanique. De plus, l'expression de fimbriae curli n'a jamais été démontrée chez *S. Typhi*. Il est même proposé que *S. Typhi* soit incapable d'exprimer le fimbriae curli dû à un régulateur tronqué (Ou et al., 2023). Ainsi, il n'était pas non plus surprenant qu'une délétion complète de l'opéron *csg* n'ait eu aucun effet sur la biomasse du biofilm de *S. Typhi* (Section 3.3, **Figure 3B**), malgré le fait que les fimbriae curli soient un composant majeur dans les biofilms de *Salmonella* et d'*E. coli*.

Chez les bactéries, plusieurs fimbriae sont proposés de jouer un rôle majeur dans l'adhésion initiale à une surface afin de commencer la production de biofilm (Lasaro et al., 2009; Paranjpye & Strom, 2005; Schroll et al., 2010). *S. Typhi* contient des gènes de biosynthèse pour 14 fimbriae différents, dont 5 possèdent des pseudogènes dans leurs voies de biosynthèse (Dufresne et al., 2018; Townsend et al., 2001). Dans une étude caractérisant la fonctionnalité de ces fimbriae, il a été démontré qu'une surexpression des fimbriae Fim, Stc, Std et Tcf individuellement chez *S. Typhi* cause une augmentation de biomasse de biofilm (Dufresne et al., 2018). Cependant, nous démontrons qu'une délétion simultanée des 14 voies de biosynthèse de fimbriae de *S. Typhi* n'a aucun effet sur la biomasse de biofilm (Section 3.3, **Figure 3B**). Cela implique que *S. Typhi* est capable de s'attacher aux surfaces et d'initier la formation de biofilm malgré l'absence d'expression d'un seul fimbriae à sa surface. Ainsi, nous démontrons qu'aucun des 14 fimbriae n'est nécessaire pour l'adhésion de *S. Typhi* au polystyrène, ni au développement d'un biofilm mature chez *S. Typhi*.

D'un autre côté, il a été démontré que la motilité flagellaire est nécessaire pour le développement de biofilms de *Salmonella* sur la surface des calculs biliaires et sur le plastique polystyrène (Prouty & Gunn, 2003; Wang et al., 2020). Nos résultats sont en contraste avec cette découverte, puisque la délétion de *fliC*, un gène important dans la biosynthèse des flagelles, n'a aucun effet significatif sur la biomasse produite (Section 3.3, **Figure 3B**). En fait, la courbe de croissance de ce mutant démontre un léger défaut de croissance (Section 3.3, **Figure 3A**).



Considérant cela et puisque le niveau de biomasse reste inchangé par rapport à la souche sauvage, cela pourrait impliquer que le mutant de flagelle ait une production légèrement augmentée de biomasse, mais cela reste à être tester spécifiquement. D'autres recherches ont démontré que le flagelle agit comme facteur d'adhésion initiale chez plusieurs bactéries (Belas, 2014). Puisqu'une délétion de *fliC* inhibe la biosynthèse du flagelle, notre étude démontre que ni la motilité flagellaire, ni le flagelle intact n'est nécessaire pour la formation de biofilms de *S. Typhi* sur le polystyrène en milieu BGK. Il serait toutefois pertinent de mentionner que le flagelle pourrait potentiellement jouer un rôle dans la distribution ou la structure du biofilm, puisque les images de microscopie (Section 3.3, **Figure 3C**) et les mesures de fluorescence (Section 3.3, **Figure 3D**) à la suite des colorations fluorescentes spécifiques indiquent une structure plus rassemblée et des niveaux altérés d'ADN et de protéines par rapport à la souche sauvage.

Pour ce qui est de la protéine excrétée BapA, elle a été étudiée dans d'autres sérovars de *S. enterica*, mais n'a jamais été caractérisée chez le sérovar Typhi. Son rôle est essentiel dans le développement de biofilms de *S. Enteritidis*, mais elle n'est pas requise chez *S. Typhimurium*. La délétion du gène *bapA* chez *S. Typhi* inhibe la biosynthèse de la protéine BapA et cette délétion n'a aucun effet sur la biomasse de biofilm produite (Section 3.3, **Figure 3B**). Je démontre que la protéine BapA n'est donc pas requise pour la formation de biofilm chez *S. Typhi* en milieu BGK sur du plastique polystyrène.

#### 4.4 Rôles des polysaccharides de surface cellulaire

L'ECA est un polysaccharide de surface cellulaire dont le rôle est inconnu, malgré le fait que sa composition soit conservée à travers l'ordre des Enterobacterales. Il est parfois proposé de jouer un rôle dans les biofilms, comme chez *Serratia marcescens* et *S. Enteritidis* (Castelli & Vescovi, 2011; Solano et al., 2002), mais ce rôle n'a pas été étudié chez d'autres souches. Une délétion dans le gène *wecA* inhibe la biosynthèse de l'ECA. Je démontre que cette délétion n'a aucun effet sur la biomasse de biofilm produite par *S. Typhi* (Section 3.3, **Figure 4B**), ni sur la structure du biofilm (Section 3.3, **Figure 4C**). La distribution des éléments majeurs était légèrement différente par mesure de niveau de fluorescence (Section 3.3, **Figure 4D**). Je détermine toutefois que l'ECA ne joue pas de rôle majeur dans la formation de biofilms chez *S. Typhi* en milieu BGK sur le plastique polystyrène.

L'antigène Vi est un polysaccharide capsulaire retrouvé à la surface de seulement quelques bactéries, dont *S. Typhi*. Il joue un rôle important dans la pathogenèse de la fièvre typhoïde, soit celui de protéger *S. Typhi* du système immunitaire de l'hôte et permet ainsi en grande partie le développement d'une infection systémique. Une délétion du gène *vexE* inhibe l'assemblage de l'antigène Vi à la surface de la cellule. Chez un mutant possédant un transposon inséré dans *vexE*, nous n'avons observé aucun effet significatif sur la biomasse de biofilm de *S. Typhi* (Section 3.3, **Figure 4B**). Ainsi, nous démontrons que l'antigène Vi ne semble pas être impliqué dans la formation, la structure, ni dans la distribution des biofilms de *S. Typhi* en milieu BGK sur le plastique.

La capsule antigène O est un polysaccharide de surface cellulaire qui joue un rôle similaire à celui de l'antigène Vi en protégeant la bactérie du système immunitaire de l'hôte (Marshall & Gunn, 2015). Une délétion dans le gène *yihO* empêche la biosynthèse de la capsule antigène O, et nous montrons que cette délétion n'impacte pas la production de biomasse de biofilm par *S. Typhi* en milieu BGK (Section 3.3, **Figure 4B**). La structure semble être légèrement plus agglomérée que celle de la souche sauvage (Section 3.3, **Figure 4C**), mais la détection de fluorescence ne révèle qu'une petite augmentation au niveau du contenu protéique (Section 3.3, **Figure 4D**). Cette capsule est proposée de jouer un rôle dans l'adhésion de *Salmonella* à la surface d'un calcul biliaire (Adcox et al., 2016). Notre étude ne considère pas la surface des calculs biliaires, mais nous pouvons cependant confirmer que la capsule de l'antigène O ne joue pas de rôle majeur dans l'adhésion de *S. Typhi* au plastique polystyrène en milieu BGK.

## 4.5 Le rôle de LPS dans les biofilms de *S. Typhi*

À la recherche d'un facteur pouvant influencer la formation de biofilms par *S. Typhi*, nous avons testé la formation de biofilms par un autre mutant de composant de surface, soit le LPS. Étonnamment, tout en ayant un défaut de croissance mineur (Section 3.3, **Figure 4A**), nous avons observé une surproduction de biomasse (Section 3.3, **Figure 4B**) avec une structure plus dense (Section 3.3, **Figure 4C**) et des niveaux augmentés d'ADNe, de protéines et de polysaccharides (Section 3.3, **Figure 4D**) chez les biofilms de *S. Typhi*  $\Delta waaQGP$ . Ainsi, dans le contexte de cette étude, nous avons découvert un rôle pour le LPS dans la formation de biofilms par *S. Typhi* en milieu BGK. Afin d'approfondir cette découverte, nous avons testé une délétion de chaque

composant de *waaQGP* individuellement, soit  $\Delta waaQ$ ,  $\Delta waaG$  et  $\Delta waaP$ . Le mutant  $\Delta waaQ$  a produit un niveau de biomasse comparable à la souche sauvage (Section 3.3, **Figure 5**). Nous supposons donc que le WaaQ ne soit pas impliqué dans l'effet observé, ou que la chaîne LPS affichée par le mutant *waaQ* n'induit pas de production de biofilm différente que la souche sauvage. D'un autre côté, les mutants  $\Delta waaG$  et  $\Delta waaP$  ont produit presque trois fois plus de biomasse par rapport à la souche sauvage (Section 3.3, **Figure 5**), ce qui dépasse la biomasse élevée obtenue chez le triple mutant  $\Delta waaQGP$ . La biosynthèse de LPS a été résumée dans la section 1.4.3 (*An overview of LPS biosynthesis*), donc nous savons que  $\Delta waaQ$  et  $\Delta waaG$  ne diffèrent que d'une molécule d'heptose et idem pour  $\Delta waaQ$  et  $\Delta waaP$ . Dans la section 1.4, nous montrons que les mutations de LPS diminuent souvent la motilité cellulaire et augmentent l'adhésion aux surfaces (Section 1.4, **Table 1**). Cela pourrait être avantageux pour les bactéries dans un environnement favorable au développement de biofilm, car une diminution de la motilité et l'expression d'adhésines sont caractéristique des premières étapes de formation de biofilm (Guttenplan & Kearns, 2013; Jiang et al., 2021). Chez *Salmonella*, il est connu que la présence de bile dans l'environnement puisse induire des modifications de LPS afin d'améliorer la survie (Hernández et al., 2012). Dans des études caractérisant les cellules provenant de biofilm de *S. Typhi* isolé de la vésicule biliaire, il a été démontré que seulement 20% des cellules affichaient une molécule de LPS complètement intacte (Marshall et al., 2014) et que les gènes de biosynthèse et de modification des LPS sont souvent altérés (Thanh Duy et al., 2020).

De façon plus générale, les cellules de biofilm subissent souvent des modifications de LPS. En effet, il a été démontré chez plusieurs bactéries à Gram négatif que dans un biofilm, les bactéries subissent davantage de modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles de LPS (Chalabaev et al., 2014). Il est proposé que cela soit avantageux pour leur survie à l'intérieur d'un hôte humain en augmentant leur capacité à résister au système immunitaire de l'hôte. Similairement, il a été démontré chez *Pseudomonas* que le c-di-GMP, une molécule de signalisation qui influence le développement de biofilms, peut réguler les modifications de LPS (McCarthy et al., 2017). Encore une fois, il est proposé que cela aide la bactérie à évader les défenses de l'hôte. Dans un environnement naturel, les modifications de LPS surviennent de façon dynamique afin de faciliter l'adaptation d'une bactérie au milieu (Simpson & Trent, 2019); Steimle et al. (2016). Nous proposons donc que les modifications de LPS donnent un avantage de survie à *S. Typhi* lorsqu'elle colonise la vésicule biliaire de l'hôte en induisant une production robuste de

biofilm. Bien que nous n'ayons pas testé cela dans cette étude, nous considérons qu'il s'agit d'une hypothèse prometteuse pour une enquête plus approfondie.

## **4.6 Limites de l'analyse par coloration fluorescente**

Dans les premières étapes de notre étude, nous avons vérifié la viabilité des cellules au sein des biofilms à la fin de l'incubation. Pour se faire, nous avons utilisé une analyse qualitative par coloration avec la trousse Live/Dead BacLight (ThermoFisher) et microscopie à fluorescence. La trousse Live/Dead BacLight est composée de deux colorants, le SYTO-9 et l'iodure de propidium (PI). Le SYTO-9 est un colorant perméable aux cellules bactériennes, donc cela cible les cellules vivantes avec des membranes intactes. Le PI est un colorant imperméable et cible donc les cellules avec membranes endommagées (ThermoFisher, 2004). Cette coloration n'est pas conçue pour l'observation des biofilms, car les biofilms contiennent des acides nucléiques extracellulaires. De plus, notre étude a démontré que les biofilms de *S. Typhi* contiennent de l'ADNe. Ainsi, SYTO-9 et PI peuvent colorer l'ADNe dans la matrice du biofilm. Nous avons néanmoins décidé de poursuivre en utilisant cette méthode, car nous l'avons jugé suffisamment représentative de la viabilité cellulaire au sein du biofilm malgré le bruit de fond de l'ADN de la matrice.

Afin de déterminer l'effet d'une mutation sur la structure et la distribution du biofilm de *S. Typhi*, nous avons utilisé des techniques qualitatives et quantitatives de coloration fluorescente. Ces techniques incluent de l'observation par microscopie à fluorescence et la mesure de niveau de fluorescence par lecteur de fluorescence. Pour observer l'ADNe, les biofilms ont été colorés au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Ce colorant est perméable aux membranes bactériennes et cible l'ADN spécifiquement, mais peut aussi parfois interagir avec l'ARN dépendant de la structure du brin (Manzini et al., 1985). Cela implique qu'une coloration au DAPI ne représente pas seulement l'ADNe contenu dans la matrice mais aussi le contenu d'ADN de cellules vivantes et de cellules mortes et potentiellement aussi l'ARN intra- et extracellulaire. Pour observer les protéines, les biofilms ont été colorés au SyproRuby. Ce colorant marque les protéines totales, incluant les glycoprotéines, les phosphoprotéines, les lipoprotéines, les protéines liant le calcium et les protéines fibrillaires. De plus, ce colorant interagit préférentiellement avec les régions hydrophobes des protéines, donc la capacité de coloration dépend grandement de la structure des protéines (ThermoFisher). Ainsi, rien ne garantit que SyproRuby colore certaines protéines de biofilm telles

que la BapA, les fimbriae et les flagelles. Pour observer les polysaccharides de la matrice, les biofilms ont été colorés au WGA. Cette lectine se lie principalement aux résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylneuraminique (acide sialique), mais peut aussi se lier moins fortement à d'autres résidus. Comme mentionné auparavant, les polysaccharides les plus communs retrouvés dans les biofilms de *Salmonella* sont la cellulose et l'acide colanique. La cellulose ne contient pas ces résidus, et n'est donc pas coloré par le WGA (McNamara et al., 2015). Au contraire, l'acide colanique est coloré par le WGA car sa structure contient des résidus de GlcNAc (Sutherland, 1969). Nous avons proposé que *S. Typhi* ne produise ni la cellulose ni l'acide colanique dû à des pseudogènes dans les voies de biosynthèse de ces deux polysaccharides (Deng et al., 2003; MacKenzie et al., 2019). Comme prévu, les biofilms de *S. Typhi* ont été colorés au WGA (Section 3.3, **Figure 3C**) malgré des délétions dans les voies de biosynthèse de la cellulose et de l'acide colanique. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la matrice du biofilm de *S. Typhi* contient un polysaccharide, possiblement avec des résidus GlcNAc ou acide sialique. Cependant, les polysaccharides de la surface cellulaire tels que l'antigène Vi et la capsule O peuvent contenir des résidus GlcNAc. Ainsi, le WGA peut colorer ces deux polysaccharides de surface, ce qui peut contribuer à ce que nous observons par microscopie.

Nous avons effectué la quantification de chaque coloration par lecture de fluorescence. Cela nous a permis d'obtenir des données représentant la quantité de matière colorée par chaque coloration fluorescente, soit la quantité d'ADNe, de protéines et de polysaccharides. Cependant, la quantification n'a pas toujours corrélé avec les images de microscopie. Cela pourrait être expliqué par un champ de vue plutôt limité dans le microscope par rapport à la lecture de fluorescence. Lors du traitement des échantillons dans le lecteur à fluorescence, un style de lecture « *endpoint* » a été choisi pour obtenir des données. Selon le manuel d'utilisation du lecteur de fluorescence, ce style de lecture collecte des données uniquement au centre du puits. Ceci pourrait aussi être un autre facteur contribuant aux disparités entre les deux méthodes, puisque le reste du puits n'est pas directement pris en compte. De plus, les images de microscopie provenaient de biofilms sur des lamelles en verre, tandis que pour la quantification de la fluorescence, les biofilms provenaient d'une surface en plastique. Cela pourrait contribuer aux différences observées également.

## 5. Conclusions et perspectives

Jusqu'à présent, peu était connu à propos des biofilms de *S. Typhi*. Puisque *S. Typhi* contient plusieurs pseudogènes dans des composants communs de biofilms de *Salmonella*, nous avons émis l'hypothèse que les biofilms de *S. Typhi* soient uniques dans leur composition. L'objectif principal de cette étude était de caractériser les biofilms de *S. Typhi* en milieu BGK. Idéalement, nous identifierions des facteurs clés dans la formation de biofilms par *S. Typhi*.

Dans cette étude, nous démontrons l'efficacité du milieu BGK par rapport aux milieux classiques de formation de biofilms de *Salmonella*. Nous démontrons également qu'une combinaison de bile et de glucose est nécessaire pour atteindre une biomasse non négligeable *in vitro*, et aussi que la présence de chlorure de potassium a un effet positif sur la quantité de biomasse produite. Ensuite, on observe qu'une inhibition de la biosynthèse de composants communs de biofilm chez d'autres souches de *Salmonella*, incluant BapA, fimbriae curli, cellulose, acide colanique et flagelles, n'a aucun effet significatif sur la biomasse du biofilm produit par *S. Typhi*, ni sur la distribution de l'ADN, des protéines et des polysaccharides. Nous déterminons aussi que les polysaccharides de surface ECA, antigène Vi et capsule antigène O ne jouent non plus de rôle majeur dans la formation de biofilms par *S. Typhi* en milieu BGK. Le seul facteur identifié exerçant une influence majeure sur le développement de biofilms de *S. Typhi* était la glycoforme des molécules de LPS. Nous proposons que cela démontre l'importance de la modification de LPS dans la formation de biofilms par *S. Typhi* dans la vésicule biliaire d'un humain.

Beaucoup de caractéristiques du biofilm de *S. Typhi* restent à élucider, mais cette étude crée une base d'informations à partir de laquelle pourrait être trouvée des pistes pour de nouvelles études. Dans cette étude, nous confirmons que la formation du biofilm de *S. Typhi* est unique dans ses conditions d'induction et dans sa composition, puisque BapA, curli, cellulose, acide colanique, flagelles ou tout autres fimbriae ne sont pas des facteurs majeurs de biofilm comme chez les autres *Enterobacteriaceae*. Bien que notre étude suggère que *S. Typhi* ne produise ni cellulose ni acide colanique, il serait pertinent de le démontrer plus spécifiquement dans des études futures. Il serait également intéressant d'identifier le principal exopolysaccharide dont dépend *S. Typhi* pour former ses biofilms. De plus, nous avons élucidé un rôle pour le LPS dans la formation de biofilms par *S. Typhi*, mais ce rôle reste à être caractérisé spécifiquement.

## Références bibliographiques

- Adcox, H. E., Vasicek, E. M., Dwivedi, V., Hoang, K. V., Turner, J., & Gunn, J. S. (2016). *Salmonella* Extracellular Matrix Components Influence Biofilm Formation and Gallbladder Colonization. *Infect Immun*, 84(11), 3243-3251. <https://doi.org/10.1128/iai.00532-16>
- Ahmad, I., Rouf, S. F., Sun, L., Cimdins, A., Shafeeq, S., Le Guyon, S., Schottkowski, M., Rhen, M., & Römling, U. (2016). BcsZ inhibits biofilm phenotypes and promotes virulence by blocking cellulose production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Cell Fact*, 15(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0576-6>
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol*, 59(4), 1114-1128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x>
- Anriany, Y., Sahu, S. N., Wessels, K. R., McCann, L. M., & Joseph, S. W. (2006). Alteration of the rugose phenotype in *waaG* and *ddhC* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. *Appl Environ Microbiol*, 72(7), 5002-5012. <https://doi.org/10.1128/aem.02868-05>
- Armijo, R., Pizzi, A., & Lobos, H. (1967). [Prevalence of typhoid carriers after treatment with chloramphenicol]. *Bol Oficina Sanit Panam*, 62(4), 295-302. (Prevalencia de protadores tíficos después del tratamiento con cloramfenicol.)
- Arricau, N., Hermant, D., Waxin, H., Ecobichon, C., Duffey, P. S., & Popoff, M. Y. (1998). The RcsB–RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Molecular Microbiology*, 29(3), 835-850. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00976.x>
- Awofisayo-Okuyelu, A., McCarthy, N., Mgbakor, I., & Hall, I. (2018). Incubation period of typhoidal salmonellosis: a systematic review and meta-analysis of outbreaks and experimental studies occurring over the last century. *BMC Infect Dis*, 18(1), 483. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3391-3>
- Axelrod, L., Munster, A. M., & O'Brien, T. F. (1971). Typhoid cholecystitis and gallbladder carcinoma after interval of 67 years. *Jama*, 217(1), 83.
- Barak, J. D., Jahn, C. E., Gibson, D. L., & Charkowski, A. O. (2007). The Role of Cellulose and O-Antigen Capsule in the Colonization of Plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 20(9), 1083-1091. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-9-1083>
- Barker, J., & Bloomfield, S. F. (2000). Survival of *Salmonella* in bathrooms and toilets in domestic homes following salmonellosis. *J Appl Microbiol*, 89(1), 137-144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01091.x>
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2006). Curli Biogenesis and Function. *Annual Review of Microbiology*, 60(1), 131-147. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106>

- Barr, K., Klena, J., & Rick, P. D. (1999). The Modality of Enterobacterial Common Antigen Polysaccharide Chain Lengths Is Regulated by *o349* of the *wec* Gene Cluster of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6564-6568. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.181.20.6564-6568.1999>
- Baucheron, S., Nishino, K., Monchaux, I., Canepa, S., Maurel, M. C., Coste, F., Roussel, A., Cloeckaert, A., & Giraud, E. (2014). Bile-mediated activation of the *acrAB* and *tolC* multidrug efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of *ramA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother*, 69(9), 2400-2406. <https://doi.org/10.1093/jac/dku140>
- Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*, 22(9), 517-527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.002>
- Beloin, C., & Ghigo, J.-M. (2005). Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 16-19. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.008>
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322, 249-289. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_12)
- Berne, C., Kysela, D. T., & Brun, Y. V. (2010). A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. *Molecular Microbiology*, 77(4), 815-829. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07267.x>
- Biswas, R., Agarwal, R. K., Bhilegaonkar, K. N., Kumar, A., Nambiar, P., Rawat, S., & Singh, M. (2011). Cloning and sequencing of biofilm-associated protein (*bapA*) gene and its occurrence in different serotypes of *Salmonella*. *Lett Appl Microbiol*, 52(2), 138-143. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02975.x>
- Boyer, J. L. (2013). Bile formation and secretion. *Compr Physiol*, 3(3), 1035-1078. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120027>
- Bridge, D. R., Whitmire, J. M., Gilbreath, J. J., Metcalf, E. S., & Merrell, D. S. (2015). An enterobacterial common antigen mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a vaccine candidate. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(6), 511-522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.05.004>
- Butt, M. H., Saleem, A., Javed, S. O., Ullah, I., Rehman, M. U., Islam, N., Tahir, M. A., Malik, T., Hafeez, S., & Misbah, S. (2021). Rising XDR-Typhoid Fever Cases in Pakistan: Are We Heading Back to the Pre-antibiotic Era? *Front Public Health*, 9, 794868. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.794868>
- Canada, G. o. (2021, 2021). *Typhoid vaccines: Canadian Immunization Guide*. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/healthy-living/canadian-immunization-guide-part-4-active-vaccines/page-23-typhoid-vaccine.html>
- Castelli, M. E., & Vescovi, E. G. (2011). The Rcs signal transduction pathway is triggered by enterobacterial common antigen structure alterations in *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 193(1), 63-74. <https://doi.org/10.1128/jb.00839-10>
- Chalabaev, S., Chauhan, A., Novikov, A., Iyer, P., Szczesny, M., Beloin, C., Caroff, M., & Ghigo, J.-M. (2014). Biofilms Formed by Gram-Negative Bacteria Undergo Increased Lipid A



- Palmitoylation, Enhancing *In Vivo* Survival. *mBio*, 5(4), e01116-01114. <https://doi.org/doi:10.1128/mBio.01116-14>
- Chattaway, M. A., Langridge, G. C., & Wain, J. (2021). *Salmonella* nomenclature in the genomic era: a time for change. *Sci Rep*, 11(1), 7494. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86243-w>
- Chirwa, N. T., & Herrington, M. B. (2003). CsgD, a regulator of curli and cellulose synthesis, also regulates serine hydroxymethyltransferase synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology (Reading)*, 149(Pt 2), 525-535. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25841-0>
- Collinson, S. K., Emödy, L., Trust, T. J., & Kay, W. W. (1992). Thin aggregative fimbriae from diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174(13), 4490-4495. <https://doi.org/10.1128/jb.174.13.4490-4495.1992>
- Crawford, R. W., Gibson, D. L., Kay, W. W., & Gunn, J. S. (2008). Identification of a Bile-Induced Exopolysaccharide Required for *Salmonella* Biofilm Formation on Gallstone Surfaces. *Infection and Immunity*, 76(11), 5341-5349. <https://doi.org/doi:10.1128/iai.00786-08>
- Crawford, R. W., Rosales-Reyes, R., Ramírez-Aguilar, M. d. I. L., Chapa-Azuela, O., Alpuche-Aranda, C., & Gunn, J. S. (2010). Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4353-4358. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1000862107>
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., & Penadés, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*, 183(9), 2888-2896. <https://doi.org/10.1128/jb.183.9.2888-2896.2001>
- Da Re, S., & Ghigo, J. M. (2006). A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 188(8), 3073-3087. <https://doi.org/10.1128/jb.188.8.3073-3087.2006>
- Danese, P. N., Pratt, L. A., & Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol*, 182(12), 3593-3596. <https://doi.org/10.1128/jb.182.12.3593-3596.2000>
- Das, T., Sharma, P. K., Busscher, H. J., Mei, H. C. v. d., & Krom, B. P. (2010). Role of Extracellular DNA in Initial Bacterial Adhesion and Surface Aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10), 3405-3408. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.03119-09>
- Dell, A., Oates, J., Lugowski, C., Romanowska, E., Kenne, L., & Lindberg, B. (1984). The enterobacterial common-antigen, a cyclic polysaccharide. *Carbohydrate Research*, 133(1), 95-104. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85186-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85186-1)
- Deng, W., Liou, S.-R., Plunkett, G., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Burland, V., Kodoyianni, V., Schwartz, D. C., & Blattner, F. R. (2003). Comparative Genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18. *Journal of Bacteriology*, 185(7), 2330-2337. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.185.7.2330-2337.2003>
- Devaraj, A., González, J. F., Eichar, B., Thilliez, G., Kingsley, R. A., Baker, S., Allard, M. W., Bakaletz, L. O., Gunn, J. S., & Goodman, S. D. (2021). Enhanced biofilm and extracellular matrix production by chronic carriage versus acute isolates of *Salmonella* Typhi. *PLOS Pathogens*, 17(1), e1009209. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009209>

- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9), 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Doran, J. L., Collinson, S. K., Burian, J., Sarlós, G., Todd, E. C., Munro, C. K., Kay, C. M., Banser, P. A., Peterkin, P. I., & Kay, W. W. (1993). DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *J Clin Microbiol*, 31(9), 2263-2273. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.9.2263-2273.1993>
- Dufresne, K., Saulnier-Bellemare, J., & Daigle, F. (2018). Functional Analysis of the Chaperone-Usher Fimbrial Gene Clusters of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 26. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00026>
- Dutta, U., Garg, P. K., Kumar, R., & Tandon, R. K. (2000). Typhoid carriers among patients with gallstones are at increased risk for carcinoma of the gallbladder. *Am J Gastroenterol*, 95(3), 784-787. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.01860.x>
- Erdmann, J. F. (1903). IX. Primary Typhoidal Perforation of the Gall-Bladder. *Ann Surg*, 37(6), 878-882.
- Erickson, K. D., & Detweiler, C. S. (2006). The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/commensals and activates *ydeI*, a gene important for persistent *Salmonella* infection of mice. *Molecular Microbiology*, 62(3), 883-894. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05420.x>
- Federle, M. J., & Bassler, B. L. (2003). Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest*, 112(9), 1291-1299. <https://doi.org/10.1172/jci20195>
- Feng, Y., Wang, Z., Chien, K.-Y., Chen, H.-L., Liang, Y.-H., Hua, X., & Chiu, C.-H. (2022). “Pseudo-pseudogenes” in bacterial genomes: Proteogenomics reveals a wide but low protein expression of pseudogenes in *Salmonella enterica*. *Nucleic Acids Research*, 50(9), 5158-5170. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac302>
- Ferrari, R. G., Rosario, D. K. A., Cunha-Neto, A., Mano, S. B., Figueiredo, E. E. S., & Conte-Junior, C. A. (2019). Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. *Appl Environ Microbiol*, 85(14). <https://doi.org/10.1128/aem.00591-19>
- Flemming, H.-C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945-7947. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.00858-07>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fong, J. N. C., & Yildiz, F. H. (2015). Biofilm Matrix Proteins. *Microbiol Spectr*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014>
- Freitag, J. L. (1964). TREATMENT OF CHRONIC TYPHOID CARRIERS BY CHOLECYSTECTOMY. *Public Health Rep (1896)*, 79(7), 567-570.
- Gaines, S., Sprinz, H., Tully, J. G., & Tigertt, W. D. (1968). Studies on Infection and Immunity in Experimental Typhoid Fever: VII. The Distribution of *Salmonella typhi* in Chimpanzee Tissue following Oral Challenge, and the Relationship between the Numbers of Bacilli and

- Morphologic Lesions. *The Journal of Infectious Diseases*, 118(3), 293-306. <http://www.jstor.org/stable/30102155>
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C., & Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front Microbiol*, 5, 391. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391>
- Gal-Mor, O., Elhadad, D., Deng, W., Rahav, G., & Finlay, B. B. (2011). The *Salmonella enterica* PhoP Directly Activates the Horizontally Acquired SPI-2 Gene *sseL* and Is Functionally Different from a *S. bongori* Ortholog. *PLOS ONE*, 6(5), e20024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020024>
- Ganjali Dashti, M., Abdesahian, P., Sudesh, K., & Phua, K. K. (2016). Optimization of *Salmonella* Typhi biofilm assay on polypropylene microtiter plates using response surface methodology. *Biofouling*, 32(4), 477-487. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1135328>
- Geetha, A. (2002). Evidence for oxidative stress in the gall bladder mucosa of gall stone patients. *J Biochem Mol Biol Biophys*, 6(6), 427-432. <https://doi.org/10.1080/1025814021000036179>
- Gibson, D. L., White, A. P., Snyder, S. D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., Surette, M., & Kay, W. W. (2006). *Salmonella* Produces an O-Antigen Capsule Regulated by AgfD and Important for Environmental Persistence. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7722-7730. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.00809-06>
- Gipson, K. S., Nickerson, K. P., Drenkard, E., Llanos-Chea, A., Dogiparthi, S. K., Lanter, B. B., Hibbler, R. M., Yonker, L. M., Hurley, B. P., & Faherty, C. S. (2020). The Great ESKAPE: Exploring the Crossroads of Bile and Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens. *Infect Immun*, 88(10). <https://doi.org/10.1128/iai.00865-19>
- Goldman, R. C., White, D., Orskov, F., Orskov, I., Rick, P. D., Lewis, M. S., Bhattacharjee, A. K., & Leive, L. (1982). A surface polysaccharide of *Escherichia coli* O111 contains O-antigen and inhibits agglutination of cells by O-antiserum. *J Bacteriol*, 151(3), 1210-1221. <https://doi.org/10.1128/jb.151.3.1210-1221.1982>
- Gonzalez-Escobedo, G., Marshall, J. M., & Gunn, J. S. (2011). Chronic and acute infection of the gall bladder by *Salmonella* Typhi: understanding the carrier state. *Nat Rev Microbiol*, 9(1), 9-14. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2490>
- Grant, W. D., Sutherland, I. W., & Wilkinson, J. F. (1969). Exopolysaccharide Colanic Acid and Its Occurrence in the *Enterobacteriaceae*. *Journal of Bacteriology*, 100(3), 1187-1193. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.100.3.1187-1193.1969>
- Grattagliano, I., Ciampi, S. A., & Portincasa, P. (2017). Chapter 14 - Gallbladder Disease: Relevance of Oxidative Stress. In J. Gracia-Sancho & J. Salvadó (Eds.), *Gastrointestinal Tissue* (pp. 187-194). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805377-5.00013-8>
- Gualdi, L., Tagliabue, L., Bertagnoli, S., Ieranò, T., De Castro, C., & Landini, P. (2008). Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces

- in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 154(7), 2017-2024. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018093-0>
- Gunn, J. S. (2000). Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*, 2(8), 907-913. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00392-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00392-0)
- Gunn, J. S., & Miller, S. I. (1996). PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *Journal of Bacteriology*, 178(23), 6857-6864. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.178.23.6857-6864.1996>
- Guttenplan, S. B., & Kearns, D. B. (2013). Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev*, 37(6), 849-871. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12018>
- Guttula, D., Yao, M., Baker, K., Yang, L., Goult, B. T., Doyle, P. S., & Yan, J. (2019). Calcium-mediated Protein Folding and Stabilization of *Salmonella* Biofilm-associated Protein A. *Journal of Molecular Biology*, 431(2), 433-443. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.11.014>
- Hahn, M. M., González, J. F., Hitt, R., Tucker, L., & Gunn, J. S. (2021). The Abundance and Organization of *Salmonella* Extracellular Polymeric Substances in Gallbladder-Mimicking Environments and *In Vivo*. *Infect Immun*, 89(11), e0031021. <https://doi.org/10.1128/iai.00310-21>
- Hancuh, M., Walldorf, J., Minta, A. A., Tevi-Benissan, C., Christian, K. A., Nedelec, Y., Heitzinger, K., Mikoleit, M., Tiffany, A., Bentsi-Enchill, A. D., & Breakwell, L. (2023). Typhoid Fever Surveillance, Incidence Estimates, and Progress Toward Typhoid Conjugate Vaccine Introduction - Worldwide, 2018-2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 72(7), 171-176. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7207a2>
- Hanna, A., Berg, M., Stout, V., & Razatos, A. (2003). Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 69(8), 4474-4481. <https://doi.org/10.1128/aem.69.8.4474-4481.2003>
- Harrell, J. E., Hahn, M. M., D'Souza, S. J., Vasicek, E. M., Sandala, J. L., Gunn, J. S., & McLachlan, J. B. (2020). *Salmonella* Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 624622. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.624622>
- Hawkins, F. (1897). On Jaundice and on Perforation of the Gall-bladder in Typhoid Fever. *Med Chir Trans*, 80, 131-140. <https://doi.org/10.1177/095952879708000111>
- Hengge-Aronis, R. (2002). Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the RpoS Subunit of RNA Polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 373-395. <https://doi.org/doi:10.1128/mnbr.66.3.373-395.2002>
- Hernández, S. B., Cota, I., Ducret, A., Aussel, L., & Casadesús, J. (2012). Adaptation and Preadaptation of *Salmonella enterica* to Bile. *PLOS Genetics*, 8(1), e1002459. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002459>
- Hoffman, S. A., Sikorski, M. J., & Levine, M. M. (2023). Chronic *Salmonella* Typhi carriage at sites other than the gallbladder. *PLoS Negl Trop Dis*, 17(3), e0011168. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011168>

- Holt, K. E., Thomson, N. R., Wain, J., Langridge, G. C., Hasan, R., Bhutta, Z. A., Quail, M. A., Norbertczak, H., Walker, D., Simmonds, M., White, B., Bason, N., Mungall, K., Dougan, G., & Parkhill, J. (2009). Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics*, *10*, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-36>
- Hone, D. M., Harris, A. M., Chatfield, S., Dougan, G., & Levine, M. M. (1991). Construction of genetically defined double aro mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine*, *9*(11), 810-816. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90218-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90218-U)
- Ibáñez de Aldecoa, A. L., Zafra, O., & González-Pastor, J. E. (2017). Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities [Review]. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01390>
- Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E., & Romeo, T. (2002). Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *184*(1), 290-301. <https://doi.org/10.1128/jb.184.1.290-301.2002>
- Jiang, Z., Nero, T., Mukherjee, S., Olson, R., & Yan, J. (2021). Searching for the Secret of Stickiness: How Biofilms Adhere to Surfaces [Review]. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.686793>
- Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Römling, U., Belova, L. M., & Melefors, Ö. (2007). Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiology*, *7*(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-70>
- Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *73*(2), 310-347. <https://doi.org/doi:10.1128/mubr.00041-08>
- Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A., Naito, S., & Yoshida, S. (2005). Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol Immunol*, *49*(9), 875-884. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03678.x>
- Kim, I. M., & Szurmant, H. (2020). A bacterial Goldilocks mechanism. *eLife*, *9*, e54244. <https://doi.org/10.7554/eLife.54244>
- Klemm, E. J., Shakoor, S., Page, A. J., Qamar, F. N., Judge, K., Saeed, D. K., Wong, V. K., Dallman, T. J., Nair, S., Baker, S., Shaheen, G., Qureshi, S., Yousafzai, M. T., Saleem, M. K., Hasan, Z., Dougan, G., & Hasan, R. (2018). Emergence of an Extensively Drug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi Clone Harboring a Promiscuous Plasmid Encoding Resistance to Fluoroquinolones and Third-Generation Cephalosporins. *mBio*, *9*(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.00105-18>
- Kragh, K. N., Tolker-Nielsen, T., & Lichtenberg, M. (2023). The non-attached biofilm aggregate. *Commun Biol*, *6*(1), 898. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05281-4>
- Kröger, C., Colgan, A., Srikumar, S., Händler, K., Sivasankaran, Sathesh K., Hammarlöf, Disa L., Canals, R., Grissom, Joe E., Conway, T., Hokamp, K., & Hinton, Jay C. D. (2013). An Infection-Relevant Transcriptomic Compendium for *Salmonella enterica* Serovar



- Typhimurium. *Cell Host & Microbe*, 14(6), 683-695. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.010>
- Kunin, C. M., Beard, M. V., & Halmagyi, N. E. (1962). Evidence for a Common Hapten Associated with Endotoxin Fractions of *E. coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111(1), 160-166. <https://doi.org/10.3181/00379727-111-27734>
- Lasa, I., & Penadés, J. R. (2006). Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, 157(2), 99-107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.003>
- Lasaro, M. A., Salinger, N., Zhang, J., Wang, Y., Zhong, Z., Goulian, M., & Zhu, J. (2009). F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Appl Environ Microbiol*, 75(1), 246-251. <https://doi.org/10.1128/aem.01144-08>
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol*, 58(5), 1322-1339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04907.x>
- Levine, M. M., Black, R. E., & Lanata, C. (1982). Precise Estimation of the Numbers of Chronic Carriers of *Salmonella typhi* in Santiago, Chile, an Endemic Area. *The Journal of Infectious Diseases*, 146(6), 724-726. <https://doi.org/10.1093/infdis/146.6.724>
- Levine, M. M., Kaper, J. B., Black, R. E., & Clements, M. L. (1983). New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev*, 47(4), 510-550. <https://doi.org/10.1128/mr.47.4.510-550.1983>
- Levine, M. M., & Simon, R. (2018). The Gathering Storm: Is Untreatable Typhoid Fever on the Way? *mBio*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00482-18>
- Lewenza, S. (2013). Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 4, 21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00021>
- Li, P., Liu, Q., Huang, C., Zhao, X., Roland, K. L., & Kong, Q. (2017). Reversible synthesis of colanic acid and O-antigen polysaccharides in *Salmonella* Typhimurium enhances induction of cross-immune responses and provides protection against heterologous *Salmonella* challenge. *Vaccine*, 35(21), 2862-2869. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.002>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>
- Liston, S. D., Ovchinnikova, O. G., & Whitfield, C. (2016). Unique lipid anchor attaches Vi antigen capsule to the surface of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(24), 6719-6724. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1524665113>
- Maciejewska, A., Kaszowska, M., Jachymek, W., Lugowski, C., & Lukasiewicz, J. (2020). Lipopolysaccharide-Linked Enterobacterial Common Antigen (ECALPS) Occurs in Rough

- Strains of *Escherichia coli* R1, R2, and R4. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6038. <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6038>
- MacKenzie, K. D., Palmer, M. B., Köster, W. L., & White, A. P. (2017). Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic *Salmonella* Strains to Colonize Multiple Host Species. *Front Vet Sci*, 4, 138. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00138>
- MacKenzie, K. D., Wang, Y., Musicha, P., Hansen, E. G., Palmer, M. B., Herman, D. J., Feasey, N. A., & White, A. P. (2019). Parallel evolution leading to impaired biofilm formation in invasive *Salmonella* strains. *PLOS Genetics*, 15(6), e1008233. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008233>
- Maczuga, N., Tran, E. N. H., & Morona, R. (2022). Subcellular localization of the enterobacterial common antigen GT-E-like glycosyltransferase, WecG. *Molecular Microbiology*, 118(4), 403-416. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mmi.14973>
- Manzini, G., Xodo, L., Barcellona, M. L., & Quadrifoglio, F. (1985). Interaction of DAPI with double-stranded ribonucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 13(24), 8955-8967. <https://doi.org/10.1093/nar/13.24.8955>
- Marineli, F., Tsoucalas, G., Karamanou, M., & Androustos, G. (2013). Mary Mallon (1869-1938) and the history of typhoid fever. *Ann Gastroenterol*, 26(2), 132-134.
- Marshall, J. M., Flechtner, A. D., La Perle, K. M., & Gunn, J. S. (2014). Visualization of Extracellular Matrix Components within Sectioned *Salmonella* Biofilms on the Surface of Human Gallstones. *PLOS ONE*, 9(2), e89243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089243>
- Marshall, J. M., & Gunn, J. S. (2015). The O-Antigen Capsule of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Facilitates Serum Resistance and Surface Expression of FliC. *Infect Immun*, 83(10), 3946-3959. <https://doi.org/10.1128/iai.00634-15>
- Maunder, E., & Welch, M. (2017). Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, 364(13). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx120>
- May, J. F., & Groisman, E. A. (2013). Conflicting roles for a cell surface modification in *Salmonella*. *Mol Microbiol*, 88(5), 970-983. <https://doi.org/10.1111/mmi.12236>
- McCarthy, R. R., Mazon-Moya, M. J., Moscoso, J. A., Hao, Y., Lam, J. S., Bordi, C., Mostowy, S., & Filloux, A. (2017). Cyclic-di-GMP regulates lipopolysaccharide modification and contributes to *Pseudomonas aeruginosa* immune evasion. *Nat Microbiol*, 2, 17027. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.27>
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Clifton, S. W., Latreille, P., Porwollik, S., Sabo, A., Meyer, R., Bieri, T., Ozersky, P., McLellan, M., Harkins, C. R., Wang, C., Nguyen, C., Berghoff, A., Elliott, G., Kohlberg, S., Strong, C., Du, F., Carter, J., . . . Wilson, R. K. (2004). Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nature Genetics*, 36(12), 1268-1274. <https://doi.org/10.1038/ng1470>
- McNamara, J. T., Morgan, J. L., & Zimmer, J. (2015). A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 84, 895-921. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033930>

- Mitchell, A. M., Srikumar, T., & Silhavy, T. J. (2018). Cyclic Enterobacterial Common Antigen Maintains the Outer Membrane Permeability Barrier of *Escherichia coli* in a Manner Controlled by YhdP. *mBio*, 9(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01321-18>
- Mohammed, M., Vignaud, M.-L., & Cadel-Six, S. (2019). Whole-Genome Sequences of Two *Salmonella enterica* Serovar Dublin Strains That Harbor the *viaA*, *viaB*, and *ompB* Loci of the Vi Antigen. *Microbiology Resource Announcements*, 8(14), 10.1128/mra.00028-00019. <https://doi.org/doi:10.1128/mra.00028-19>
- Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., & Arciola, C. R. (2011). Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs*, 34(9), 824-831. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000051>
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., & Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLOS Pathogens*, 4(11), e1000213. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000213>
- Murakawa, T. (1973). Slime Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Japanese Journal of Microbiology*, 17(4), 273-281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1973.tb00773.x>
- Murata, T., Tseng, W., Guina, T., Miller, S. I., & Nikaido, H. (2007). PhoPQ-Mediated Regulation Produces a More Robust Permeability Barrier in the Outer Membrane of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7213-7222. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.00973-07>
- Muszyński, A., Rabsztyn, K., Knapska, K., Duda, K. A., Duda-Grychoł, K., Kasperkiewicz, K., Radziejewska-Lebrecht, J., Holst, O., & Skurnik, M. (2013). Enterobacterial common antigen and O-specific polysaccharide coexist in the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Microbiology*, 159(Pt\_8), 1782-1793. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mic.0.066662-0>
- Narla, A. V., Borenstein, D. B., & Wingreen, N. S. (2021). A biophysical limit for quorum sensing in biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(21), e2022818118. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.2022818118>
- Nath, G., Singh, H., & Shukla, V. K. (1997). Chronic typhoid carriage and carcinoma of the gallbladder. *Eur J Cancer Prev*, 6(6), 557-559. <https://doi.org/10.1097/00008469-199712000-00011>
- NCBI. (2023). *Sucrose PubChem Compound Summary for CID 5988*. Retrieved Dec 17 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sucrose>
- Nichols, H. J. (1916). EXPERIMENTAL OBSERVATIONS ON THE PATHOGENESIS OF GALL-BLADDER INFECTIONS IN TYPHOID, CHOLERA, AND DYSENTERY. *J Exp Med*, 24(5), 497-514. <https://doi.org/10.1084/jem.24.5.497>
- Nikaido, E., Yamaguchi, A., & Nishino, K. (2008). AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem*, 283(35), 24245-24253. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804544200>
- Normark, S., Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., & Sierralta, W. D. (1998). Curli Fibers Are Highly Conserved between. *J. Bacteriol*, 180(3), 722.



- Nuccio, S.-P., & Bäumler, A. J. (2014). Comparative Analysis of *Salmonella* Genomes Identifies a Metabolic Network for Escalating Growth in the Inflamed Gut. *mBio*, 5(2), 10.1128/mbio.00929-00914. <https://doi.org/doi:10.1128/mbio.00929-14>
- Olsén, A., Jonsson, A., & Normark, S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, 338(6217), 652-655. <https://doi.org/10.1038/338652a0>
- Otto, K., & Silhavy, T. J. (2002). Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4), 2287-2292. <https://doi.org/10.1073/pnas.042521699>
- Ou, C., Dozois, C. M., & Daigle, F. (2023). Differential regulatory control of curli (*csg*) gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi requires more than a functional CsgD regulator. *Sci Rep*, 13(1), 14905. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42027-y>
- Özdemir, C., Akçelik, N., & Akçelik, M. (2018). The Role of Extracellular DNA in *Salmonella* Biofilms. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 33(1), 60-71. <https://doi.org/10.3103/S089141681801010X>
- Pando, J. M., Karlinsey, J. E., Lara, J. C., Libby, S. J., & Fang, F. C. (2017). The Rcs-Regulated Colanic Acid Capsule Maintains Membrane Potential in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *mBio*, 8(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00808-17>
- Paranjpye, R. N., & Strom, M. S. (2005). A *Vibrio vulnificus* Type IV Pilin Contributes to Biofilm Formation, Adherence to Epithelial Cells, and Virulence. *Infection and Immunity*, 73(3), 1411-1422. <https://doi.org/doi:10.1128/iai.73.3.1411-1422.2005>
- 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. G., Sebaihia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R. M., . . . Barrell, B. G. (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, 413(6858), 848-852. <https://doi.org/10.1038/35101607>
- Percival, S. L., Vuotto, C., Donelli, G., & Lipsky, B. A. (2015). Biofilms and Wounds: An Identification Algorithm and Potential Treatment Options. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(7), 389-397. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0574>
- Pickard, D., Wain, J., Baker, S., Line, A., Chohan, S., Fookes, M., Barron, A., Gaora, P. O., Chabalgoity, J. A., Thanky, N., Scholes, C., Thomson, N., Quail, M., Parkhill, J., & Dougan, G. (2003). Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol*, 185(17), 5055-5065. <https://doi.org/10.1128/jb.185.17.5055-5065.2003>
- Prieto, A. I., Ramos-Morales, F., & Casadesús, J. (2006). Repair of DNA damage induced by bile salts in *Salmonella enterica*. *Genetics*, 174(2), 575-584. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.060889>
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., & Dorel, C. (2001). Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in

- Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol*, 183(24), 7213-7223. <https://doi.org/10.1128/jb.183.24.7213-7223.2001>
- Prouty, A. M., & Gunn, J. S. (2003). Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infect Immun*, 71(12), 7154-7158. <https://doi.org/10.1128/iai.71.12.7154-7158.2003>
- Prouty, A. M., Schwesinger, W. H., & Gunn, J. S. (2002). Biofilm Formation and Interaction with the Surfaces of Gallstones by *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, 70(5), 2640-2649. <https://doi.org/doi:10.1128/iai.70.5.2640-2649.2002>
- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Dusold, R., Rubino, S., & Bäumlér, A. J. (2005). The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infect Immun*, 73(6), 3367-3374. <https://doi.org/10.1128/iai.73.6.3367-3374.2005>
- Rai, A. K., & Mitchell, A. M. (2020). Enterobacterial Common Antigen: Synthesis and Function of an Enigmatic Molecule. *mBio*, 11(4), 10.1128/mbio.01914-01920. <https://doi.org/doi:10.1128/mbio.01914-20>
- Ramos-Morales, F., Prieto, A. I., Beuzón, C. R., Holden, D. W., & Casadesús, J. (2003). Role for *Salmonella enterica* Enterobacterial Common Antigen in Bile Resistance and Virulence. *Journal of Bacteriology*, 185(17), 5328-5332. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.185.17.5328-5332.2003>
- Ranjit, D. K., & Young, K. D. (2016). Colanic Acid Intermediates Prevent De Novo Shape Recovery of *Escherichia coli* Spheroplasts, Calling into Question Biological Roles Previously Attributed to Colanic Acid. *J Bacteriol*, 198(8), 1230-1240. <https://doi.org/10.1128/jb.01034-15>
- Ray, S., Da Costa, R., Das, M., & Nandi, D. (2019). Interplay of cold shock protein E with an uncharacterized protein, YciF, lowers porin expression and enhances bile resistance in *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Biological Chemistry*, 294(23), 9084-9099. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008209>
- Raza, A., Sarwar, Y., Ali, A., Jamil, A., Haque, A., & Haque, A. (2011). Effect of biofilm formation on the excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhi in feces. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(11), e747-e752. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.06.003>
- Rehman, Z. U., Vrouwenvelder, J. S., & Saikaly, P. E. (2021). Physicochemical Properties of Extracellular Polymeric Substances Produced by Three Bacterial Isolates From Biofouled Reverse Osmosis Membranes. *Front Microbiol*, 12, 668761. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.668761>
- Reid, A. J., Eade, C. R., Jones, K. J., Jorgenson, M. A., & Troutman, J. M. (2021). Tracking Colanic Acid Repeat Unit Formation from Stepwise Biosynthesis Inactivation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 60(27), 2221-2230. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00314>
- Rinno, J., Golecki, J. R., & Mayer, H. (1980). Localization of Enterobacterial Common Antigen: Immunogenic and Nonimmunogenic Enterobacterial Common Antigen-Containing

- Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 141(2), 814-821.  
<https://doi.org/doi:10.1128/jb.141.2.814-821.1980>
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D., & Normark, S. (1998). Curli Fibers Are Highly Conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with Respect to Operon Structure and Regulation. *Journal of Bacteriology*, 180(3), 722-731.  
<https://doi.org/doi:10.1128/jb.180.3.722-731.1998>
- Römling, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol*, 23(9), 545-557.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005>
- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77(1), 1-52.  
<https://doi.org/10.1128/membr.00043-12>
- Römling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K., & Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular Microbiology*, 28(2), 249-264.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00791.x>
- Rooney, L. M., Amos, W. B., Hoskisson, P. A., & McConnell, G. (2020). Intra-colony channels in *E. coli* function as a nutrient uptake system. *The ISME Journal*, 14(10), 2461-2473.  
<https://doi.org/10.1038/s41396-020-0700-9>
- Ruhl, C. E., Clark, J. M., & Everhart, J. E. (2018). Liver and Gallbladder Disease in Diabetes. In C. C. Cowie, S. S. Casagrande, A. Menke, M. A. Cissell, M. S. Eberhardt, J. B. Meigs, E. W. Gregg, W. C. Knowler, E. Barrett-Connor, D. J. Becker, F. L. Brancati, E. J. Boyko, W. H. Herman, B. V. Howard, K. M. V. Narayan, M. Rewers, & J. E. Fradkin (Eds.), *Diabetes in America*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US).
- Rychlik, I., & Barrow, P. A. (2005). *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 1021-1040. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.005>
- Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., Leclerc, J.-M., & Daigle, F. (2010). So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiology Letters*, 305(1), 1-13.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x>
- Sabbagh, S. C., Lepage, C., McClelland, M., & Daigle, F. (2012). Selection of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes involved during interaction with human macrophages by screening of a transposon mutant library. *PLOS ONE*, 7(5), e36643.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036643>
- Saha, S., Sajib, M. S. I., Garrett, D., & Qamar, F. N. (2020). Antimicrobial Resistance in Typhoidal *Salmonella*: Around the World in 3 Days. *Clin Infect Dis*, 71(Suppl 2), S91-s95.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa366>
- Saldaña, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Avelino, F., Phillips, A. D., Kaper, J. B., Puente, J. L., & Girón, J. A. (2009). Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative

- regulator of curli. *Environ Microbiol*, 11(4), 992-1006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01824.x>
- Samain, E. (2007). 1.23 - Production of Oligosaccharides in Microbes. In H. Kamerling (Ed.), *Comprehensive Glycoscience* (pp. 923-947). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00122-7>
- Sande, C., & Whitfield, C. (2021). Capsules and Extracellular Polysaccharides in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus*, 9(2), eESP-0033-2020. <https://doi.org/doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0033-2020>
- Santander, J., Roland, K. L., & Curtiss, R., 3rd. (2008). Regulation of Vi capsular polysaccharide synthesis in *Salmonella enterica* serotype Typhi. *J Infect Dev Ctries*, 2(6), 412-420. <https://doi.org/10.3855/jidc.154>
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1140-1154. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol*, 20(10), 608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Schiøler, H., Christiansen, E. D., Høybye, G., Rasmussen, S. N., & Greibe, J. (1983). Biliary Calculi in Chronic *Salmonella* Carriers and Healthy Controls: A Controlled Study. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 15(1), 17-19. <https://doi.org/10.3109/inf.1983.15.issue-1.04>
- Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A., & Struve, C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiology*, 10(1), 179. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>
- Secchi, E., Savorana, G., Vitale, A., Eberl, L., Stocker, R., & Rusconi, R. (2022). The structural role of bacterial eDNA in the formation of biofilm streamers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119(12), e2113723119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113723119>
- Sengupta, C., Ray, S., & Chowdhury, R. (2014). Fine tuning of virulence regulatory pathways in enteric bacteria in response to varying bile and oxygen concentrations in the gastrointestinal tract. *Gut Pathogens*, 6(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13099-014-0038-9>
- Serra, D. O., & Hengge, R. (2021). Bacterial Multicellularity: The Biology of *Escherichia coli* Building Large-Scale Biofilm Communities. *Annual Review of Microbiology*, 75(1), 269-290. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-031921-055801>
- Simpson, B. W., & Trent, M. S. (2019). Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nat Rev Microbiol*, 17(7), 403-416. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0201-x>
- Singh, M., Chandra, D., Jagdish, S., & Nandi, D. (2023). Global transcriptome analysis reveals *Salmonella* Typhimurium employs the nitrate-dependent anaerobic pathway to combat bile stress. *bioRxiv*, 2023.2006.2015.545048. <https://doi.org/10.1101/2023.06.15.545048>

- Singh, S., Datta, S., Narayanan, K. B., & Rajnish, K. N. (2021). Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. *J Genet Eng Biotechnol*, 19(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00242-y>
- Sistrunk, J. R., Nickerson, K. P., Chanin, R. B., Rasko, D. A., & Faherty, C. S. (2016). Survival of the Fittest: How Bacterial Pathogens Utilize Bile To Enhance Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(4), 819-836. <https://doi.org/doi:10.1128/cmr.00031-16>
- Snyder, D. S., Gibson, D., Heiss, C., Kay, W., & Azadi, P. (2006). Structure of a capsular polysaccharide isolated from *Salmonella enteritidis*. *Carbohydrate Research*, 341(14), 2388-2397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.06.010>
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., & Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43(3), 793-808. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x>
- Soper, G. A. (1939). The Curious Career of Typhoid Mary. *Bull N Y Acad Med*, 15(10), 698-712.
- Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T. J., & Geoghegan, J. A. (2014). Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci* [Review]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00171>
- Spoering, A. L., & Gilmore, M. S. (2006). Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 133-137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.004>
- Sprinz, H., Gangarosa, E. J., Williams, M., Hornick, R. B., & Woodward, T. E. (1966). Histopathology of the upper small intestines in typhoid fever. *The American Journal of Digestive Diseases*, 11(8), 615-624. <https://doi.org/10.1007/BF02233509>
- Stanley, N. R., & Lazazzera, B. A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 52(4), 917-924. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04036.x>
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 502-531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038>
- Steimle, A., Autenrieth, I. B., & Frick, J.-S. (2016). Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(5), 290-301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.03.001>
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., & Reeves, P. R. (1996). Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *Journal of Bacteriology*, 178(16), 4885-4893. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.178.16.4885-4893.1996>
- Stevenson, G., Lan, R., & Reeves, P. R. (2000). The colanic acid gene cluster of *Salmonella enterica* has a complex history. *FEMS Microbiology Letters*, 191(1), 11-16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09312.x>



- Sun, J., Rutherford, S. T., Silhavy, T. J., & Huang, K. C. (2022). Physical properties of the bacterial outer membrane. *Nat Rev Microbiol*, 20(4), 236-248. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00638-0>
- Sutherland, I. W. (1969). Structural studies on colanic acid, the common exopolysaccharide found in the *enterobacteriaceae*, by partial acid hydrolysis. *Biochem J*, 115(5), 935-945. <https://doi.org/10.1042/bj1150935>
- Suvarnapunya, A. E., Lagassé, H. A. D., & Stein, M. A. (2003). The role of DNA base excision repair in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 48(2), 549-559. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03460.x>
- Tetz, V. T., G. . (2010). Effect of Extracellular DNA Destruction by DNase I on Characteristics of Forming Biofilms. *DNA and Cell Biology*, 29(8), 399-405. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.1011>
- Thanh Duy, P., Thieu, N. T. V., Nguyen Thi Nguyen, T., Ngoc Dan Thanh, H., Dongol, S., Karkey, A., Carey, M., Basnyat, B., Dougan, G., Rabaa, M. A., & Baker, S. (2020). Gallbladder carriage generates genetic variation and genome degradation in *Salmonella* Typhi. *PLOS Pathogens*, 16(10), e1008998. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008998>
- ThermoFisher. (2004). *LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kits*. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp07007.pdf>
- ThermoFisher. (2009). *FilmTracer™ SYPRO™ Ruby Biofilm Matrix Stain Product Manual*. Retrieved December 16th from <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp10318.pdf>
- Thiennimitr, P., Winter, S. E., & Bäumlér, A. J. (2012). *Salmonella*, the host and its microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 108-114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.002>
- Townsend, S. M., Kramer, N. E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., Stevens, K., Maloy, S., Parkhill, J., Dougan, G., & Bäumlér, A. J. (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun*, 69(5), 2894-2901. <https://doi.org/10.1128/iai.69.5.2894-2901.2001>
- Tsai, M.-H., Liang, Y.-H., Chen, C.-L., & Chiu, C.-H. (2020). Characterization of *Salmonella* resistance to bile during biofilm formation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(4), 518-524. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.06.003>
- Vanderslott, S., Kumar, S., Adu-Sarkodie, Y., Qadri, F., & Zellweger, R. M. (2023). Typhoid Control in an Era of Antimicrobial Resistance: Challenges and Opportunities. *Open Forum Infect Dis*, 10(Suppl 1), S47-s52. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad135>
- Varghese, A., Ray, S., Verma, T., & Nandi, D. (2020). Multicellular String-Like Structure Formation by *Salmonella* Typhimurium Depends on Cellulose Production: Roles of

- Diguanylate Cyclases, YedQ and YfiN. *Front Microbiol*, *11*, 613704. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.613704>
- Velkinburgh, J. C. v., & Gunn, J. S. (1999). PhoP-PhoQ-Regulated Loci Are Required for Enhanced Bile Resistance in *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, *67*(4), 1614-1622. <https://doi.org/doi:10.1128/iai.67.4.1614-1622.1999>
- Virlogeux, I., Waxin, H., Ecobichon, C., Lee, J. O., & Popoff, M. Y. (1996). Characterization of the *rcaA* and *rcaB* genes from *Salmonella typhi*: *rcaB* through *tviA* is involved in regulation of Vi antigen synthesis. *J Bacteriol*, *178*(6), 1691-1698. <https://doi.org/10.1128/jb.178.6.1691-1698.1996>
- Virlogeux, I., Waxin, H., Ecobichon, C., & Popoff, M. Y. (1995). Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology*, *141*(12), 3039-3047. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3039>
- Wagner, C., & Hensel, M. (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol*, *715*, 17-34. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_2)
- Wald, P. (1997). Cultures and Carriers: "Typhoid Mary" and the Science of Social Control. *Social Text*(52/53), 181-214. <https://doi.org/10.2307/466739>
- Wang, F., Deng, L., Huang, F., Wang, Z., Lu, Q., & Xu, C. (2020). Flagellar Motility Is Critical for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Biofilm Development. *Front Microbiol*, *11*, 1695. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01695>
- Wang, H., Huang, Y., Wu, S., Li, Y., Ye, Y., Zheng, Y., & Huang, R. (2014). Extracellular DNA Inhibits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *S. enterica* Serovar Typhi Biofilm Development on Abiotic Surfaces. *Current Microbiology*, *68*(2), 262-268. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0468-5>
- Wang, J., Ma, S., Li, W., Wang, X., Huang, D., Jiang, L., & Feng, L. (2021). *Salmonella enterica* Serovar Typhi Induces Host Metabolic Reprogramming to Increase Glucose Availability for Intracellular Replication. *Int J Mol Sci*, *22*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms221810003>
- Wang, S., Shi, H., Li, Y., Shi, Z., Zhang, X., Baek, C.-H., Mothershead, T., & Curtiss, R. (2013). A Colanic Acid Operon Deletion Mutation Enhances Induction of Early Antibody Responses by Live Attenuated *Salmonella* Vaccine Strains. *Infection and Immunity*, *81*(9), 3148-3162. <https://doi.org/doi:10.1128/iai.00097-13>
- Wear, S. S., Sande, C., Ovchinnikova, O. G., Preston, A., & Whitfield, C. (2022). Investigation of core machinery for biosynthesis of Vi antigen capsular polysaccharides in Gram-negative bacteria. *J Biol Chem*, *298*(1), 101486. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101486>
- Welton, J. C., Marr, J. S., & Friedman, S. M. (1979). Association between hepatobiliary cancer and typhoid carrier state. *Lancet*, *1*(8120), 791-794. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(79\)91315-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(79)91315-1)
- Wetter, M., Goulding, D., Pickard, D., Kowarik, M., Waechter, C. J., Dougan, G., & Wacker, M. (2012). Molecular Characterization of the *viaB* Locus Encoding the Biosynthetic Machinery for Vi Capsule Formation in *Salmonella* Typhi. *PLOS ONE*, *7*(9), e45609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045609>

- White, A. P., Gibson, D. L., Collinson, S. K., Banser, P. A., & Kay, W. W. (2003). Extracellular Polysaccharides Associated with Thin Aggregative Fimbriae of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5398-5407. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.185.18.5398-5407.2003>
- WHO. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. Retrieved December 12th from <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- WHO. (2023). *Typhoid*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>
- Wilking, J. N., Zaburdaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M. P., & Weitz, D. A. (2013). Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 848-852. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1216376110>
- Winter, S. E., Raffatellu, M., Wilson, R. P., Rüssmann, H., & Bäumler, A. J. (2008). The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. *Cell Microbiol*, 10(1), 247-261. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01037.x>
- Winter, S. E., Winter, M. G., Atluri, V., Poon, V., Romão, E. L., Tsolis, R. M., & Bäumler, A. J. (2015). The flagellar regulator TviA reduces pyroptosis by *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun*, 83(4), 1546-1555. <https://doi.org/10.1128/iai.02803-14>
- Winter, S. E., Winter, M. G., Godinez, I., Yang, H.-J., Rüssmann, H., Andrews-Polymenis, H. L., & Bäumler, A. J. (2010). A Rapid Change in Virulence Gene Expression during the Transition from the Intestinal Lumen into Tissue Promotes Systemic Dissemination of *Salmonella*. *PLOS Pathogens*, 6(8), e1001060. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001060>
- Winter, S. E., Winter, M. G., Thiennimitr, P., Gerriets, V. A., Nuccio, S. P., Rüssmann, H., & Bäumler, A. J. (2009). The TviA auxiliary protein renders the *Salmonella enterica* serotype Typhi RcsB regulon responsive to changes in osmolarity. *Mol Microbiol*, 74(1), 175-193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06859.x>
- Woodward, T. E., Smadel, J. E., & Ley, H. L., Jr. (1950). Chloramphenicol and other antibiotics in the treatment of typhoid fever and typhoid carriers. *J Clin Invest*, 29(1), 87-99. <https://doi.org/10.1172/jci102238>
- Zhang, X., Liu, B., Ding, X., Bin, P., Yang, Y., & Zhu, G. (2022). Regulatory Mechanisms between Quorum Sensing and Virulence in *Salmonella*. *Microorganisms*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112211>
- Zhang, Y., Chong, X., Xia, L., Lu, R., Osei-Adjei, G., Zhang, Y., & Huang, X. (2018). 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>



## Annexes

### I. Références bibliographiques – Revue de littérature (Section 1.4.8)

1. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881-90.
2. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(9):623-33.
3. Armitano J, Méjean V, Jourlin-Castelli C. Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environmental Microbiology Reports*. 2014;6(6):534-44.
4. Cai YM. Non-surface Attached Bacterial Aggregates: A Ubiquitous Third Lifestyle. *Front Microbiol*. 2020;11:557035.
5. Balcázar JL, Subirats J, Borrego CM. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6.
6. Trautner BW, Darouiche RO. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control*. 2004;32(3):177-83.
7. Gunn JS, Marshall JM, Baker S, Dongol S, Charles RC, Ryan ET. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends Microbiol*. 2014;22(11):648-55.
8. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:249-89.
9. Harrell JE, Hahn MM, D'Souza SJ, Vasicek EM, Sandala JL, Gunn JS, et al. *Salmonella* Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:624622.
10. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*. 2012;45(2):502-31.
11. Vogeleer P, Tremblay YDN, Jubelin G, Jacques M, Harel J. Biofilm-Forming Abilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates Associated with Human Infections. *Appl Environ Microbiol*. 2015;82(5):1448-58.

12. Wang H, Wilksch JJ, Strugnell RA, Gee ML. Role of Capsular Polysaccharides in Biofilm Formation: An AFM Nanomechanics Study. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(23):13007-13.
13. Bertani B, Ruiz N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*. 2018;8(1).
14. Rick PD. 41. Lipopolysaccharide Biosynthesis. In: Neidhardt FC, editor. *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium Cellular and Molecular Biology. 1. Washington, D.C. : American Society for Microbiology; 1987. p. 806.
15. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:635-700.
16. Schnaitman CA, Klena JD. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev*. 1993;57(3):655-82.
17. Samuel G, Reeves P. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydrate Research*. 2003;338(23):2503-19.
18. Valvano MA. Chapter 4 - Genetics and Biosynthesis of Lipopolysaccharide. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Boston: Academic Press; 2015. p. 55-89.
19. Klein G, Raina S. Regulated Assembly of LPS, Its Structural Alterations and Cellular Response to LPS Defects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(2):356.
20. Gibbons HS, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR. Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in *Salmonella typhimurium* lipid A. Function of LpxO, A new Fe<sup>2+</sup>/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. *J Biol Chem*. 2000;275(42):32940-9.
21. Trent MS, Pabich W, Raetz CR, Miller SI. A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*. 2001;276(12):9083-92.
22. Desroy N, Moreau F, Briet S, Fralliec GL, Floquet S, Durant L, et al. Towards Gram-negative antivirulence drugs: New inhibitors of HldE kinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009;17(3):1276-89.

23. Yethon JA, Vinogradov E, Perry MB, Whitfield C. Mutation of the Lipopolysaccharide Core Glycosyltransferase Encoded by *waaG* Destabilizes the Outer Membrane of *Escherichia coli* by Interfering with Core Phosphorylation. *Journal of Bacteriology*. 2000;182(19):5620-3.
24. Gronow S, Brabetz W, Brade H. Comparative functional characterization *in vitro* of heptosyltransferase I (WaaC) and II (WaaF) from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267(22):6602-11.
25. Yethon JA, Heinrichs DE, Monteiro MA, Perry MB, Whitfield C. Involvement of *waaY*, *waaQ*, and *waaP* in the Modification of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide and Their Role in the Formation of a Stable Outer Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(41):26310-6.
26. Yethon JA, Gunn JS, Ernst RK, Miller SI, Laroche L, Malo D, et al. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *waaP* Mutants Show Increased Susceptibility to Polymyxin and Loss of Virulence *In Vivo*. *Infection and Immunity*. 2000;68(8):4485-91.
27. Bociek K, Ferluga S, Mardirossian M, Benincasa M, Tossi A, Gennaro R, et al. Lipopolysaccharide Phosphorylation by the WaaY Kinase Affects the Susceptibility of *Escherichia coli* to the Human Antimicrobial Peptide LL-37. *J Biol Chem*. 2015;290(32):19933-41.
28. Pradel E, Parker CT, Schnaitman CA. Structures of the *rfaB*, *rfaI*, *rfaJ*, and *rfaS* genes of *Escherichia coli* K-12 and their roles in assembly of the lipopolysaccharide core. *Journal of Bacteriology*. 1992;174(14):4736-45.
29. Heinrichs DE, Yethon JA, Whitfield C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*. 1998;30(2):221-32.
30. Heinrichs DE, Monteiro MA, Perry MB, Whitfield C. The Assembly System for the Lipopolysaccharide R2 Core-type of *Escherichia coli* Is a Hybrid of Those Found in *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella enterica*: STRUCTURE AND FUNCTION OF THE R2 WaaK AND WaaL HOMOLOGS. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(15):8849-59.
31. Klein G, Müller-Loennies S, Lindner B, Kobylak N, Brade H, Raina S. Molecular and structural basis of inner core lipopolysaccharide alterations in *Escherichia coli*:

- incorporation of glucuronic acid and phosphoethanolamine in the heptose region. *J Biol Chem.* 2013;288(12):8111-27.
32. Kalynych S, Morona R, Cygler M. Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen. *FEMS Microbiology Reviews.* 2014;38(5):1048-65.
  33. McConnell MR, Oakes KR, Patrick AN, Mills DM. Two functional O-polysaccharide polymerase *wzy* (*rfc*) genes are present in the *rfb* gene cluster of Group E1 *Salmonella enterica* serovar Anatum. *FEMS Microbiology Letters.* 2001;199(2):235-40.
  34. Franco AV, Liu D, Reeves PR. The *wzz* (*cld*) protein in *Escherichia coli*: amino acid sequence variation determines O-antigen chain length specificity. *J Bacteriol.* 1998;180(10):2670-5.
  35. Jorgenson MA, Young KD. Interrupting Biosynthesis of O Antigen or the Lipopolysaccharide Core Produces Morphological Defects in *Escherichia coli* by Sequestering Undecaprenyl Phosphate. *Journal of Bacteriology.* 2016;198(22):3070-9.
  36. Willis LM, Whitfield C. Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate Research.* 2013;378:35-44.
  37. Greenfield LK, Whitfield C. Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate Research.* 2012;356:12-24.
  38. Keenleyside WJ, Whitfield C. A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J Biol Chem.* 1996;271(45):28581-92.
  39. Wear SS, Hunt BA, Clarke BR, Whitfield C. Analysis of the Topology and Active-Site Residues of WbbF, a Putative O-Polysaccharide Synthase from *Salmonella enterica* Serovar Borreze. *Journal of Bacteriology.* 2020;202(5):e00625-19.
  40. Keenleyside WJ, Perry M, Maclean L, Poppe C, Whitfield C. A plasmid-encoded *rfbO*:54 gene cluster is required for biosynthesis of the O:54 antigen in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *Molecular Microbiology.* 1994;11(3):437-48.
  41. Nakao R, Ramstedt M, Wai SN, Uhlin BE. Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS One.* 2012;7(12):e51241.
  42. Maigaard Hermansen GM, Boysen A, Krogh TJ, Nawrocki A, Jelsbak L, Møller-Jensen J. HldE Is Important for Virulence Phenotypes in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:253.

43. Wang Z, Wang J, Ren G, Li Y, Wang X. Deletion of the genes *waaC*, *waaF*, or *waaG* in *Escherichia coli* W3110 disables the flagella biosynthesis. *J Basic Microbiol.* 2016;56(9):1021-35.
44. Mireles JR, Toguchi A, Harshey RM. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Swarming Mutants with Altered Biofilm-Forming Abilities: Surfactin Inhibits Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology.* 2001;183(20):5848-54.
45. Wang Z, Wang J, Ren G, Li Y, Wang X. Influence of Core Oligosaccharide of Lipopolysaccharide to Outer Membrane Behavior of *Escherichia coli*. *Mar Drugs.* 2015;13(6):3325-39.
46. Anriany Y, Sahu SN, Wessels KR, McCann LM, Joseph SW. Alteration of the rugose phenotype in *waaG* and *ddhC* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7):5002-12.
47. Yoshida M, Thiriet-Rupert S, Mayer L, Beloin C, Ghigo J-M. Selection for nonspecific adhesion is a driver of FimH evolution increasing *Escherichia coli* biofilm capacity. *microLife.* 2022;3.
48. Han Y, Han X, Wang S, Meng Q, Zhang Y, Ding C, et al. The *waaL* gene is involved in lipopolysaccharide synthesis and plays a role on the bacterial pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology.* 2014;172(3):486-91.
49. Parker CT, Kloser AW, Schnaitman CA, Stein MA, Gottesman S, Gibson BW. Role of the *rfaG* and *rfaP* genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology.* 1992;174(8):2525-38.
50. Toguchi A, Siano M, Burkart M, Harshey RM. Genetics of Swarming Motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: Critical Role for Lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology.* 2000;182(22):6308-21.
51. Beloin C, Michaelis K, Lindner K, Landini P, Hacker J, Ghigo J-M, et al. The Transcriptional Antiterminator RfaH Represses Biofilm Formation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 2006;188(4):1316-31.
52. Soto GE, Hultgren SJ. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol.* 1999;181(4):1059-71.

53. Genevaux P, Bauda P, DuBow MS, Oudega B. Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. Arch Microbiol. 1999;172(1):1-8.
54. Nagy G, Danino V, Dobrindt U, Pallen M, Chaudhuri R, Emödy L, et al. Down-regulation of key virulence factors makes the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *rfaH* mutant a promising live-attenuated vaccine candidate. Infect Immun. 2006;74(10):5914-25.
55. Landini P, Zehnder AJ. The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. J Bacteriol. 2002;184(6):1522-9.
56. Conway T, Cohen PS. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. Microbiol Spectr. 2015;3(3).
57. Hoare A, Bittner M, Carter J, Alvarez S, Zaldivar M, Bravo D, et al. The Outer Core Lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Is Required for Bacterial Entry into Epithelial Cells. Infection and Immunity. 2006;74(3):1555-64.
58. Park SY, Pontes MH, Groisman EA. Flagella-independent surface motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(6):1850-5.
59. Smith DR, Price JE, Burby PE, Blanco LP, Chamberlain J, Chapman MR. The Production of Curli Amyloid Fibers Is Deeply Integrated into the Biology of *Escherichia coli*. Biomolecules. 2017;7(4):75.
60. Toguchi A, Siano M, Burkart M, Harshey RM. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. J Bacteriol. 2000;182(22):6308-21.
61. Elpers L, Lüken L, Lange F, Hensel M. Factors Required for Adhesion of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to *Lactuca sativa* (Lettuce). Microbiology Spectrum. 2023;11(1):e03436-22.
62. Guttenplan SB, Kearns DB. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. FEMS Microbiol Rev. 2013;37(6):849-71.
63. Nwoko EQA, Okeke IN. Bacteria autoaggregation: how and why bacteria stick together. Biochem Soc Trans. 2021;49(3):1147-57.

64. Yuan J, Jin F, Glatter T, Sourjik V. Osmosensing by the bacterial PhoQ/PhoP two-component system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(50):E10792-E8.
65. Simpson BW, Trent MS. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(7):403-16.
66. Vadyvaloo V, Viall AK, Jarrett CO, Hinz AK, Sturdevant DE, Joseph Hinnebusch B. Role of the PhoP-PhoQ gene regulatory system in adaptation of *Yersinia pestis* to environmental stress in the flea digestive tract. *Microbiology (Reading)*. 2015;161(6):1198-210.
67. Wei C, Ding T, Chang C, Yu C, Li X, Liu Q. Global Regulator PhoP is Necessary for Motility, Biofilm Formation, Exoenzyme Production, and Virulence of *Xanthomonas citri* Subsp. *citri* on Citrus Plants. *Genes*. 2019;10(5):340.
68. Yin L, Li Q, Xue M, Wang Z, Tu J, Song X, et al. The role of the *phoP* transcriptional regulator on biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathology*. 2019;48(4):362-70.
69. Meng J, Young G, Chen J. The Rcs System in *Enterobacteriaceae*: Envelope Stress Responses and Virulence Regulation. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12.
70. Prigent-Combaret C, Brombacher E, Vidal O, Ambert A, Lejeune P, Landini P, et al. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol*. 2001;183(24):7213-23.
71. Shimada T, Takada H, Yamamoto K, Ishihama A. Expanded roles of two-component response regulator OmpR in *Escherichia coli*: genomic SELEX search for novel regulation targets. *Genes to Cells*. 2015;20(11):915-31.
72. Guillier M, Gottesman S. Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Molecular Microbiology*. 2006;59(1):231-47.
73. Ren G, Wang Z, Li Y, Hu X, Wang X. Effects of Lipopolysaccharide Core Sugar Deficiency on Colanic Acid Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2016;198(11):1576-84.

## II. Références – Article en préparation (Section 3.7)

1. WHO. Typhoid 2023 [cited 2023 August 18th]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>
2. Vanderslott S, Kumar S, Adu-Sarkodie Y, Qadri F, Zellweger RM. Typhoid Control in an Era of Antimicrobial Resistance: Challenges and Opportunities. *Open Forum Infect Dis.* 2023;10(Suppl 1):S47-s52.
3. Butt MH, Saleem A, Javed SO, Ullah I, Rehman MU, Islam N, et al. Rising XDR-Typhoid Fever Cases in Pakistan: Are We Heading Back to the Pre-antibiotic Era? *Front Public Health.* 2021;9:794868.
4. Levine MM, Black RE, Lanata C. Precise Estimation of the Numbers of Chronic Carriers of *Salmonella typhi* in Santiago, Chile, an Endemic Area. *The Journal of Infectious Diseases.* 1982;146(6):724-6.
5. Gunn JS, Marshall JM, Baker S, Dongol S, Charles RC, Ryan ET. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends Microbiol.* 2014;22(11):648-55.
6. Hernández SB, Cota I, Ducret A, Aussel L, Casadesús J. Adaptation and Preadaptation of *Salmonella enterica* to Bile. *PLOS Genetics.* 2012;8(1):e1002459.
7. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:249-89.
8. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International.* 2012;45(2):502-31.
9. Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Römling U, Belova LM, et al. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiology.* 2007;7(1):70.
10. Holt KE, Thomson NR, Wain J, Langridge GC, Hasan R, Bhutta ZA, et al. Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics.* 2009;10:36.
11. Nuccio S-P, Bäumlér AJ. Comparative Analysis of *Salmonella* Genomes Identifies a Metabolic Network for Escalating Growth in the Inflamed Gut. *mBio.* 2014;5(2):10.1128/mbio.00929-14.
12. Deng W, Liou S-R, Plunkett G, Mayhew GF, Rose DJ, Burland V, et al. Comparative Genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18. *Journal of Bacteriology.* 2003;185(7):2330-7.



13. Pickard D, Wain J, Baker S, Line A, Chohan S, Fookes M, et al. Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol.* 2003;185(17):5055-65.
14. MacKenzie KD, Wang Y, Musicha P, Hansen EG, Palmer MB, Herman DJ, et al. Parallel evolution leading to impaired biofilm formation in invasive *Salmonella* strains. *PLOS Genetics.* 2019;15(6):e1008233.
15. Ou C, Dozois CM, Daigle F. Differential regulatory control of curli (*csg*) gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi requires more than a functional CsgD regulator. *Sci Rep.* 2023;13(1):14905.
16. Ganjali Dashti M, Abdeshahian P, Sudesh K, Phua KK. Optimization of *Salmonella* Typhi biofilm assay on polypropylene microtiter plates using response surface methodology. *Biofouling.* 2016;32(4):477-87.
17. Gomez-Carretero S, Libberton B, Svennersten K, Persson K, Jager E, Berggren M, et al. Redox-active conducting polymers modulate *Salmonella* biofilm formation by controlling availability of electron acceptors. *npj Biofilms and Microbiomes.* 2017;3(1):19.
18. Jain S, Chen J. Attachment and Biofilm Formation by Various Serotypes of *Salmonella* as Influenced by Cellulose Production and Thin Aggregative Fimbriae Biosynthesis. *Journal of Food Protection.* 2007;70(11):2473-9.
19. Hahn MM, González JF, Hitt R, Tucker L, Gunn JS. The Abundance and Organization of *Salmonella* Extracellular Polymeric Substances in Gallbladder-Mimicking Environments and *In Vivo*. *Infect Immun.* 2021;89(11):e0031021.
20. González JF, Tucker L, Fitch J, Wetzel A, White P, Gunn JS. Human Bile-Mediated Regulation of *Salmonella* Curli Fimbriae. *J Bacteriol.* 2019;201(18).
21. Gonzalez-Escobedo G, Gunn JS. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes regulated during biofilm formation on cholesterol gallstone surfaces. *Infect Immun.* 2013;81(10):3770-80.
22. Marshall JM, Flechtner AD, La Perle KM, Gunn JS. Visualization of Extracellular Matrix Components within Sectioned *Salmonella* Biofilms on the Surface of Human Gallstones. *PLOS ONE.* 2014;9(2):e89243.
23. Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS. Biofilm Formation and Interaction with the Surfaces of Gallstones by *Salmonella* spp. *Infection and Immunity.* 2002;70(5):2640-9.
24. Crawford RW, Rosales-Reyes R, Ramírez-Aguilar MdL, Chapa-Azuela O, Alpuche-Aranda C, Gunn JS. Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(9):4353-8.

25. Wang J, Ma S, Li W, Wang X, Huang D, Jiang L, et al. *Salmonella enterica* Serovar Typhi Induces Host Metabolic Reprogramming to Increase Glucose Availability for Intracellular Replication. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18).
26. de Boer SY, Masclee AAM, Lam WF, Lemkes HHPJ, Schipper J, Fröhlich M, et al. Effect of hyperglycaemia on gallbladder motility in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1994;37(1):75-81.
27. Ruhl CE, Clark JM, Everhart JE. Liver and Gallbladder Disease in Diabetes. In: Cowie CC, Casagrande SS, Menke A, Cissell MA, Eberhardt MS, Meigs JB, et al., editors. *Diabetes in America.* Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US); 2018.
28. Swidsinski A, Lee SP. The role of bacteria in gallstone pathogenesis. *Front Biosci.* 2001;6:E93-103.
29. Das T, Sharma PK, Busscher HJ, Mei HCvd, Krom BP. Role of Extracellular DNA in Initial Bacterial Adhesion and Surface Aggregation. *Applied and Environmental Microbiology.* 2010;76(10):3405-8.
30. Wang H, Huang Y, Wu S, Li Y, Ye Y, Zheng Y, et al. Extracellular DNA Inhibits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *S. enterica* Serovar Typhi Biofilm Development on Abiotic Surfaces. *Current Microbiology.* 2014;68(2):262-8.
31. Devaraj A, González JF, Eichar B, Thilliez G, Kingsley RA, Baker S, et al. Enhanced biofilm and extracellular matrix production by chronic carriage versus acute isolates of *Salmonella* Typhi. *PLOS Pathogens.* 2021;17(1):e1009209.
32. Fong JNC, Yildiz FH. Biofilm Matrix Proteins. *Microbiol Spectr.* 2015;3(2).
33. Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo J-M, Gamazo C, et al. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology.* 2002;43(3):793-808.
34. Latasa C, García B, Echeverz M, Toledo-Arana A, Valle J, Campoy S, et al. *Salmonella* Biofilm Development Depends on the Phosphorylation Status of RcsB. *Journal of Bacteriology.* 2012;194(14):3708-22.
35. Anwar N, Rouf SF, Römling U, Rhen M. Modulation of biofilm-formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the periplasmic DsbA/DsbB oxidoreductase system requires the GGDEF-EAL domain protein STM3615. *PLoS One.* 2014;9(8):e106095.
36. Keelara S, Thakur S, Patel J. Biofilm Formation by Environmental Isolates of *Salmonella* and Their Sensitivity to Natural Antimicrobials. *Foodborne pathogens and disease.* 2016;13(9):509-16.

37. Prouty AM, Gunn JS. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infect Immun*. 2003;71(12):7154-8.
38. Wang F, Deng L, Huang F, Wang Z, Lu Q, Xu C. Flagellar Motility Is Critical for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Biofilm Development. *Front Microbiol*. 2020;11:1695.
39. Rehman T, Yin L, Latif MB, Chen J, Wang K, Geng Y, et al. Adhesive mechanism of different *Salmonella* fimbrial adhesins. *Microbial Pathogenesis*. 2019;137:103748.
40. Pérez-Burgos M, Søgaard-Andersen L. Biosynthesis and function of cell-surface polysaccharides in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. *Biol Chem*. 2020;401(12):1375-87.
41. Corbett D, Roberts IS. The role of microbial polysaccharides in host-pathogen interaction. *F1000 Biol Rep*. 2009;1:30.
42. Ramos-Morales F, Prieto AI, Beuzón CR, Holden DW, Casadesús J. Role for *Salmonella enterica* Enterobacterial Common Antigen in Bile Resistance and Virulence. *Journal of Bacteriology*. 2003;185(17):5328-32.
43. Castelli ME, Vescovi EG. The Rcs signal transduction pathway is triggered by enterobacterial common antigen structure alterations in *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*. 2011;193(1):63-74.
44. Wetter M, Goulding D, Pickard D, Kowarik M, Waechter CJ, Dougan G, et al. Molecular Characterization of the *viaB* Locus Encoding the Biosynthetic Machinery for Vi Capsule Formation in *Salmonella* Typhi. *PLOS ONE*. 2012;7(9):e45609.
45. Gibson DL, White AP, Snyder SD, Martin S, Heiss C, Azadi P, et al. *Salmonella* Produces an O-Antigen Capsule Regulated by AgfD and Important for Environmental Persistence. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(22):7722-30.
46. Crawford RW, Gibson DL, Kay WW, Gunn JS. Identification of a Bile-Induced Exopolysaccharide Required for *Salmonella* Biofilm Formation on Gallstone Surfaces. *Infection and Immunity*. 2008;76(11):5341-9.
47. Adcox HE, Vasicek EM, Dwivedi V, Hoang KV, Turner J, Gunn JS. *Salmonella* Extracellular Matrix Components Influence Biofilm Formation and Gallbladder Colonization. *Infect Immun*. 2016;84(11):3243-51.
48. Yethon JA, Heinrichs DE, Monteiro MA, Perry MB, Whitfield C. Involvement of *waaY*, *waaQ*, and *waaP* in the Modification of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide and Their Role in the Formation of a Stable Outer Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(41):26310-6.

49. Wang Z, Wang J, Ren G, Li Y, Wang X. Deletion of the genes *waaC*, *waaF*, or *waaG* in *Escherichia coli* W3110 disables the flagella biosynthesis. *J Basic Microbiol.* 2016;56(9):1021-35.
50. Kong Q, Yang J, Liu Q, Alamuri P, Roland KL, Curtiss R. Effect of Deletion of Genes Involved in Lipopolysaccharide Core and O-Antigen Synthesis on Virulence and Immunogenicity of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity.* 2011;79(10):4227-39.
51. Nakao R, Ramstedt M, Wai SN, Uhlin BE. Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS One.* 2012;7(12):e51241.
52. Toguchi A, Siano M, Burkart M, Harshey RM. Genetics of Swarming Motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: Critical Role for Lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology.* 2000;182(22):6308-21.
53. Elpers L, Lüken L, Lange F, Hensel M. Factors Required for Adhesion of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to *Lactuca sativa* (Lettuce). *Microbiology Spectrum.* 2023;11(1):e03436-22.
54. Guttenplan SB, Kearns DB. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(6):849-71.
55. Zheng S, Bawazir M, Dhall A, Kim HE, He L, Heo J, et al. Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:643722.
56. Steimle A, Autenrieth IB, Frick J-S. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *International Journal of Medical Microbiology.* 2016;306(5):290-301.
57. Simpson BW, Trent MS. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(7):403-16.

**III. Supplementary Table S1.** List of bacterial strains used in this study.

Name	Strain	Description	Reference
WT	DEF1045	ISP1820 wild type	(Hone et al., 1991)
$\Delta bapA$	DEF1927	ISP1820 $\Delta bapA$	This study
$\Delta bcsA$	DEF1592	ISP1820 $\Delta bcsA$	This study
$\Delta csg$	DEF510	ISP1820 $\Delta csg$	(Sabbagh et al., 2012)
$\Delta fliC$	DEF435	ISP1820 $\Delta fliC$	(Sabbagh et al., 2012)
$\Delta I4$	DEF664	ISP1820 afimbriaire	(Dufresne et al., 2018)
$\Delta yihO$	DEF1615	ISP1820 $\Delta yihO$	This study
$\Delta waaQGP$	DEF544	ISP1820 $\Delta waaQGP$	(Sabbagh et al., 2012)
<i>TwaaQ</i>	TRASH80	Transposon insertion in ISP1820 <i>waaQ</i>	This study
<i>TwaaG</i>	TRASH8	Transposon insertion in ISP1820 <i>waaG</i>	This study
<i>TwaaP</i>	TRASH3	Transposon insertion in ISP1820 <i>waaP</i>	This study
$\Delta wcaJ$	DE1988	ISP1820 $\Delta wcaJ$	This study
$\Delta wecA$	DEF1996	ISP1820 $\Delta wecA$	This study
<i>TvexE</i>	TRASH26	Transposon insertion in ISP1820 <i>vexE</i>	This study

**IV. Supplementary Table S2.** List of primers used in this study.

<i>S. Typhi</i> mutant	Primer	Sequence (5'-3')	Restriction enzyme*
$\Delta bapA$	bapA_F1	<u>CGGGATCC</u> AAAGCACTAGTCAGGCACAA	BamHI
	bapA_R2	GCTGGTATGGTGATCGTTTCGCCGGAATG	
	bapA_F3	AACGATCACCATAACCAGCGGCGCCAATA	
	bapA_R4	<u>GCTCTAGAT</u> CTGGTCCGTTGCTAATCCT	XbaI
$\Delta bcsA$	bcsA_F1	<u>CGGGATCC</u> CGGTCGAAACAGCCGTTAG	BamHI
	bcsA_R2	TTTCCAGCGGATGCTCAAGCGGAAACACT	
	bcsA_F3	TTGAGCATCCGCTGGAAAGCTTGCTGGAT	
	bcsA_R4	<u>GCTCTAGAC</u> CGTCATGAAAGCAGGAAAC	XbaI
$\Delta yihO$	yihO_F1	<u>CGGGATCC</u> ATGTACGTGCGAATTGTGGA	BamHI

	yihO_R2	<i>GGCAATTT</i> CGAATTCGCCACCAGAAAGA	
	yihO_F3	<i>GCGAAATTC</i> GAAATTGCCCAACGAAAGA	
	yihO_R4	<u>GCTCTAGAT</u> TCAGACGCCAGGTTATAGG	XbaI
<i>ΔwcaJ</i>	wcaJ_F1	<u>CGGGATCC</u> GATATTCCGCTGATGGAAGC	BamHI
	wcaJ_R2	<i>TGGCGTAGCT</i> GGCAGTCCACTGACTTCAC	
	wcaJ_F3	<i>GGACTGCC</i> AGCTACGCCACAAGATGAAG	
	wcaJ_R4	<u>GCTCTAGAC</u> AAACTGGTGGTTGTCGATG	XbaI
<i>ΔwecA</i>	wecA_F1	<u>CGGGATCC</u> GGGATATGCGCTACAGAGT	BamHI
	wecA_R2	<i>TACGCCTACA</i> ACGCCCTGATGTCGTTTA	
	wecA_F3	<i>CAGGGCGTT</i> GTAGGCGTAACGGCAGAA	
	wecA_R4	<u>GCTCTAGAC</u> CGGAATATCCAGTTCATT	XbaI

\*Restriction enzyme sequence underlined. Letters in italics represent overlapping sequences.