

Université de Montréal

**Caractérisation et délétion de tous les systèmes d'adhésion connus de  
*Salmonella enterica* sérovar Typhi**

par  
Élise David

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

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

Avril 2012

© Élise David, 2012



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation et délétion de tous les systèmes d'adhésion connus de  
*Salmonella enterica* sérovar Typhi

Présenté par :  
Élise David

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr George Szatmari,  
Président-rapporteur

Dre France Daigle,  
Directrice de recherche

Dr Mario Jacques,  
Membre du jury



## Résumé

Les fimbriae sont des structures protéiques extracellulaires retrouvées chez une vaste diversité de bactéries. Ces structures ont fait l'objet de nombreuses études et sont maintenant reconnus pour leur implication dans l'adhésion et l'invasion aux cellules eucaryotes, mais aussi dans la production de biofilms. Ils sont groupés selon leur voie de sécrétion. Certains utilisent une machinerie spécifique et individuelle, c'est le cas des pili de type IV, tandis que d'autres utilisent la voie de sécrétion générale suivit d'une voie spécifique telle que la voie du chaperon-placier (« Chaperon Usher Pathway ») (fimbriae CUP) ou la voie de nucléation précipitation (« nucleation precipitation pathway ») (Curli). Malgré toutes les connaissances actuelles concernant les fimbriae, très peu d'informations sont disponibles quant aux fimbriae de *Salmonella enterica* sérovar Typhi (*S. Typhi*). Ce pathogène unique à l'homme est l'agent étiologique de la fièvre typhoïde. Puisque les fimbriae sont reconnus pour être impliqués dans l'adaptation à l'hôte, nous avons décidé d'étudier davantage l'arsenal fimbriaire de *S. Typhi*, dans l'espoir d'identifier des facteurs de virulence uniques à *S. Typhi* et impliqués dans la ségrégation de l'hôte. La souche *S. Typhi* ISP1820 possède 14 opérons codant pour des systèmes d'adhésion, mais plusieurs contiennent des pseudogènes et leur expression n'a jamais été observée *in vitro*. Afin d'étudier les systèmes d'adhésion de *S. Typhi*, nous avons supprimé chaque opéron du génome individuellement et cumulativement à l'aide une technique de mutagénèse par échange allélique. Ainsi, nous avons testé chaque mutant individuel et la souche mutante pour tous les systèmes d'adhésion dans plusieurs essais tels que des infections de cellules épithéliales et de macrophages, de mobilité et de formation de biofilm. Nous avons aussi

évalué l'expression des fimbriae lors de différentes conditions de croissance en laboratoire par RT-PCR. Tous les tests réalisés nous ont permis de découvrir que plusieurs opérons fimbriaires de *S. Typhi* sont opérationnels et utilisés pour différentes fonctions par la bactérie.

**Mots-clés :** *Salmonella enterica* sérovar Typhi, fimbriae, systèmes d'adhésion, pili

## Abstract

Fimbriae are extracellular proteinaceous appendages found in many bacteria. They are widely studied and believe to be implicated in several cellular functions such as adhesion, invasion of eukaryotic cells, and biofilm production. They are classified depending on their pathway of secretion: some, like type IV pili, use self-specific machinery, while others use the general secretory pathway followed by their own assembly pathway such as the Chaperon Usher Pathway (CUP fimbriae) and the nucleation precipitation pathway (curli). Despite everything that is known about these structures, little has been discovered regarding fimbrial systems of *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*). This pathogen is a human restricted serovar and the etiological agent of typhoid fever. Since fimbriae have been implicated in host adaptation, we have decided to further study *S. Typhi* fimbrial arsenal in the hope of uncovering virulence factors unique to *S. Typhi* and implicated in host specificity. The *S. Typhi* ISP1820 strain carries 14 operons encoding for fimbrial structures, but many are believed pseudogenes or are not expressed *in vitro*. In order to study these different adhesion systems in *S. Typhi*, we have deleted each one individually and cumulatively by allelic exchange mutagenesis. Hence, we have tested every individual mutation and the mutant strain deprived of all 14 operons in many different assays including epithelial cell and macrophage infection, mobility, and biofilm formation. We also evaluate expression during growth under laboratory conditions by RT-PCR. These experiments have allowed us to discover that many of *S. Typhi* fimbriae are functional, expressed, and used by the bacteria in many different processes.

**Keywords :** *Salmonella enterica* serovar Typhi, fimbriae, adhesion system, pili



## Table des matières

|   |      |
|---|------|
| Résumé.....   | v    |
| Abstract.....   | vii  |
| Table des matières.....   | ix   |
| Liste des tableaux.....   | xii  |
| Liste des figures.....  | xiii |
| Liste des sigles et abréviations.....                                   | xv   |
| Introduction.....   | 1    |
| 1. Généralités sur les fimbriae.....                                    | 1    |
| 1.1. Historique.....  | 1    |
| 1.2. Fonction des fimbriae.....   | 4    |
| 1.3. Nomenclature des fimbriae.....                                     | 6    |
| 1.4. Organisation des opérons fimbriaires.....                          | 7    |
| 1.5. Structure protéique des fimbriae.....                              | 9    |
| 1.6. Biogenèse des fimbriae.....  | 11   |
| 2. Les fimbriae de <i>S. Typhi</i> .....                                | 19   |
| 2.1. Implication des fimbriae de <i>S. Typhi</i> dans la virulence..... | 24   |
| 2.2. Régulation des fimbriae chez <i>S. Typhi</i> .....                 | 27   |
| 3. <i>Salmonella</i> .....  | 30   |
| 3.1. Généralités sur les salmonelles.....                               | 30   |
| 3.2. Nomenclature de <i>Salmonella</i> .....                            | 31   |
| 3.3. Infection par <i>S. Typhi</i> .....                                | 33   |
| Problématique et objectifs.....   | 41   |
| Matériel et Méthodes.....   | 43   |
| 1. Souches et plasmides utilisées.....                                  | 43   |
| 2. Mutagenèse par la méthode d'échange allélique.....                   | 45   |
| 2.1. Construction d'un opéron tronqué.....                              | 45   |
| 2.2. Insertion dans un plasmide suicide.....                            | 46   |
| 2.3. Extraction plasmidique.....  | 46   |

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| 2.4.            | Digestion et ligation.....  | 46 |
| 2.5.            | Transformation d'ADN .....  | 47 |
| 2.6.            | Conjugaison bactérienne.....  | 47 |
| 3.              | Construction des souches complémentées.....                                       | 48 |
| 4.              | Électroporation de <i>S. Typhi</i> .....  | 49 |
| 5.              | Courbe de croissance.....   | 50 |
| 6.              | Tests d'adhésion et d'invasion dans les cellules épithéliales INT-407 .....       | 51 |
| 6.1.            | Indice de compétition.....  | 53 |
| 7.              | Tests de phagocytose et de survie dans les macrophages humains THP-1 ...          | 54 |
| 8.              | Tests de mobilité.....  | 55 |
| 9.              | RT-PCR.....   | 57 |
| 9.1.            | Extraction D'ARN .....  | 57 |
| 9.2.            | Synthèse d'ADNc.....  | 58 |
| 9.3.            | RT-PCR.....   | 58 |
| 10.             | Biofilms.....   | 59 |
| 11.             | Western blot.....   | 61 |
| 11.1.           | Surexpression de l'opéron <i>stg</i> .....  | 62 |
| 11.2.           | Extraction des protéines du surnageant.....                                       | 62 |
| 11.3.           | Migration dans un gel de polyacrylamide .....                                     | 63 |
| 11.4.           | Transfert sur membrane de PVDF .....  | 63 |
| 11.5.           | Adhésion des anticorps aux sites spécifiques .....                                | 63 |
| 11.6.           | Révélation.....   | 64 |
| Résultats ..... |   | 65 |
| 1.              | Mutagenèse de tous les systèmes d'adhésion de la bactérie <i>S. Typhi</i> ISP1820 | 65 |
| 2.              | Courbe de croissance.....   | 67 |
| 3.              | Mobilité.....   | 68 |
| 4.              | Adhésion et Invasion de cellules épithéliales humaines INT-407 .....              | 69 |
| 4.1.            | Adhérence aux cellules épithéliales .....   | 69 |

|                    |  |      |
|--------------------|--|------|
| 4.2.               | Invasion de cellules épithéliales.....   | 70   |
| 4.3.               | Infection de cellules épithéliales par des souches afimbriaires .....  | 71   |
| 5.                 | Phagocytose et survie dans les macrophages humains THP-1.....  | 73   |
| 5.1.               | Phagocytose par les macrophages humains.....   | 74   |
| 5.2.               | Survie dans les macrophages humains.....   | 75   |
| 5.3.               | Infection de macrophages par les souches afimbriaires.....   | 76   |
| 6.                 | Indice de compétition lors d'infection de cellules épithéliales INT-407 .....  | 78   |
| 7.                 | RT-PCR.....  | 79   |
| 7.1.               | RT-PCR révélant le profil d'expression des fimbriae de <i>S. Typhi</i> lorsque cultivée selon différentes conditions de culture in-vitro. .... | 79   |
| 7.2.               | RT-PCR révélant le profil d'expression des fimbriae de <i>S. Typhi</i> lors d'une infection de culture de cellules épithéliales.....           | 84   |
| 8.                 | Biofilms.....  | 87   |
| 9.                 | Surexpression du fimbriae <i>stg</i> à l'aide d'un vecteur inductible .....  | 89   |
| Discussion .....   |  | 91   |
| 1.                 | Courbe de croissance .....   | 92   |
| 2.                 | Mobilité.....  | 92   |
| 3.                 | Adhésion et invasion de cellules épithéliales.....   | 93   |
| 4.                 | Phagocytose et survie dans les macrophages .....   | 96   |
| 5.                 | Infections de cellules humaines avec les souches afimbriaires.....   | 98   |
| 6.                 | Les effets d'une souche dépourvue de systèmes d'adhésion.....  | 99   |
| 7.                 | Expression de fimbriae .....   | 101  |
| 8.                 | Essai de Biofilm.....  | 102  |
| 9.                 | Surexpression d'opérons fimbriaires .....  | 102  |
| Conclusion .....   |  | 104  |
| Bibliographie..... |  | i    |
| Annexe .....       |  | xvii |

## Liste des tableaux

|  |              |
|--|--------------|
| <b>Tableau I : Description générale de chacun des opérons fimbriaires de <i>S. Typhi</i>.</b>  | <b>21</b>    |
| <b>Tableau II : Systèmes d'adhésion de <i>S. Typhi</i> pour lesquels un rôle dans la virulence a été observé.</b>  | <b>25</b>    |
| <b>Tableau III : Nomenclature actuelle des espèces et sous-espèce de <i>Salmonella</i> associées aux nombre de sérovars répertoriés en 2002.</b>                         | <b>33</b>    |
| <b>Tableau IV : Description des souches et plasmides utilisés dans cette étude.</b>  | <b>44</b>    |
| <b>Tableau V : Caractéristiques des souches de <i>S. Typhi</i> utilisées lors des tests de surexpression des fimbriae.</b>   | <b>61</b>    |
| <b>Tableau VI : Mutants construits pour l'étude des systèmes d'adhésion de <i>S. Typhi</i> ISP1820</b>   | <b>66</b>    |
| <b>Tableau VII : Effet des mutations des tous les systèmes d'adhésion (<math>\Delta 14</math>) lors d'une infection de cellules épithéliales en essai de compétition</b> | <b>78</b>    |
| <b>Tableau VIII: Liste des amorces utilisées pour la création de mutants</b>   | <b>xvii</b>  |
| <b>Tableau IX: Liste des amorces utilisées pour les essais de RT-PCR</b>   | <b>xviii</b> |

## Liste des figures

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figure 1: Première observation et description des fimbriae d'une culture d'<i>E. coli</i>.....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>Figure 2: Classes d'organelles non flagellaires retrouvées à la surface des bactéries à Gram-négatif.....</b>                                  | <b>4</b>  |
| <b>Figure 3: Arbre phylogénétique de la famille des protéines placiers fimbriaires.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>Figure 4 : Évolution de la structure de l'opéron fimbriaire ancestrale selon les familles phylogénétiques.....</b>                             | <b>8</b>  |
| <b>Figure 5 : Représentation schématique de la biogenèse des fimbriae de la voie CUP.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>Figure 6 : Représentation schématique de la biogenèse du système d'adhésion Curli par la voie de « nucleation precipitation pathway ».....</b> | <b>16</b> |
| <b>Figure 7: Représentation schématique du mécanisme d'assemblage du pilus de type IV et des protéines impliquées.....</b>                        | <b>18</b> |
| <b>Figure 8: Localisation et organisation des différents opérons fimbriaires du génome de <i>S. Typhi</i> CT18.....</b>                           | <b>19</b> |
| <b>Figure 9: Structures de surface de <i>S. Typhi</i> discutées dans ce mémoire.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>Figure 10 : Distribution global des souches de <i>S. Typhi</i> résistantes de 1990 à 2002. ....</b>  | <b>34</b> |
| <b>Figure 11 : Représentation schématique de la construction d'un opéron tronqué.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>Figure 12. Test de Mobilité.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>Figure 13: Courbe de croissance en milieu LB.....</b>  | <b>67</b> |
| <b>Figure 14: Mobilité des différentes souches mutantes.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>Figure 15: Taux d'adhérence dans les cellules épithéliales INT-407. ....</b>   | <b>69</b> |
| <b>Figure 16: Taux d'invasion dans les cellules épithéliales INT-407.....</b>   | <b>70</b> |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 17 : Taux d'adhérence et d'invasion dans les cellules épithéliales INT-407.</b> .....  | 72 |
| <b>Figure 18: Taux de phagocytose dans les macrophages THP-1.</b> .....  | 74 |
| <b>Figure 19: Taux de survie dans les macrophages THP-1.</b> .....   | 75 |
| <b>Figure 20 : Taux de phagocytose et taux de survie dans les macrophages THP-1.</b> .....   | 77 |
| <b>Figure 21: Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN d'une culture de <i>S. Typhi</i> en LB O/N avec agitation.</b> .....                   | 80 |
| <b>Figure 22: Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN d'une culture de <i>S. Typhi</i> en LB-NaCl 0.3M O/N sans agitation.</b> .....         | 81 |
| <b>Figure 23: Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN d'une culture de <i>S. Typhi</i> en M63 faible en fer O/N sans agitation.</b> .....    | 82 |
| <b>Figure 24: Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN d'une culture de <i>S. Typhi</i> en M63 riche en fer O/N sans agitation.</b> .....     | 83 |
| <b>Figure 25 : Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN du surnageant lors d'infection de cellules épithéliale par <i>S. Typhi</i>.</b> ..... | 84 |
| <b>Figure 26 :Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN de <i>S. Typhi</i> lors de l'adhésion aux cellules épithéliales.</b> .....             | 85 |
| <b>Figure 27 : Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN de <i>S. Typhi</i> lors de l'invasion des cellules épithéliales.</b> .....            | 86 |
| <b>Figure 28 : Essai de biofilm en tube.</b> .....   | 88 |
| <b>Figure 29 : Induction de l'expression fimbriaire <i>stg</i>.</b> .....  | 90 |

## Liste des sigles et abréviations

|                |  |
|----------------|--|
| ADN            | Acide Désoxyribonucléique                                  |
| ADNc           | Acide désoxyribonucléique complémentaire                   |
| Ap             | Ampicilline  |
| ARN            | Acide ribonucléique  |
| ARNt           | Acide ribonucléique de transfert                           |
| ATP            | Adénosine triphosphate                                     |
| CCMB           | Chlorure de Calcium à Base de Manganèse                    |
| CFTR           | <i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i> |
| Cm             | Chloramphénicol  |
| Crp            | <i>Cyclic AMP receptor</i>                                 |
| CUP            | <i>Chaperone Usher Pathway</i>                             |
| D.O.           | Densité Optique  |
| DAP            | acide DL- $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélique              |
| DEPC           | Diéthyl Pyrocarbonate                                      |
| diGMPc         | di Guanosine Monophosphate cyclique                        |
| dNTPs          | Désoxyribonucléotides Tri-Phosphate                        |
| DSC            | Donor Strand Complementation                               |
| DSE            | <i>Donor Strand Exchange</i>                               |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                                    |
| EMEM           | Eagle's Minimal Essential Medium                           |
| EPEC           | <i>Enteropathogenic E. coli</i>                            |
| FUP            | <i>Fimbrial Usher Proteins</i>                             |
| GC             | Guanine Cytosine   |
| Gm             | Gentamycine  |
| H-NS           | <i>Histone-like Nucleoid Structuring protein</i>           |
| IHF            | <i>Integration Host Factor</i>                             |
| Il-8           | Interleukine-8   |
| Kan            | Kanamycine   |
| LB             | Luria-Bertani  |
| LOL            | <i>Lipoprotein Outer-membrane Localization</i>             |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| LPS                   | Lipopolysaccharides                            |
| Lrp                   | <i>Leucine-responsive Regulatory Protein</i>   |
| ME                    | Membrane externe                               |
| MI                    | Membrane interne                               |
| MOI                   | <i>Multiplicity of Infection</i>               |
| Nal                   | Acide Nalidixique                              |
| NEB                   | New England Biolabs                            |
| ORFs                  | <i>Open Reading Frames</i>                     |
| PBS                   | <i>Phosphate Buffered Saline</i>               |
| PBS-DOC               | PBS-acide déoxycholique                        |
| PCR                   | <i>Polymerase Chain Reaction</i>               |
| PMA                   | Phorbol 12-Myristat 13-Acétate                 |
| RPMI                  | <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>  |
| RT-PCR                | Rétrotranscription-PCR                         |
| <i>S. Typhi</i>       | <i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi       |
| <i>S. Typhimurium</i> | <i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhimurium |
| SCV                   | <i>Salmonella Containing Vacuole</i>           |
| SPI                   | <i>Salmonella Pathogenicity Island</i>         |
| sRNA                  | <i>small RNA</i>                               |
| SRP                   | <i>Signal Recognition Particle</i>             |
| SST1-3-4-5 ou 6       | Système de sécrétion de type 1-3-4-5 ou 6      |
| SVF                   | sérum de veau fœtal                            |
| TAQ                   | <i>Thermophilus aquaticus</i>                  |
| TBA                   | <i>Tube Biofilm Assay</i>                      |
| TLR                   | <i>Toll-like Receptor</i>                      |
| UFC                   | Unité Formatrice de Colonie                    |
| UPEC                  | <i>Uropathogenic E. coli</i>                   |



*Ce qui compte ne peut pas toujours être compté,  
et ce qui peut être compté ne compte pas forcément.*

*Albert Einstein*

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma Directrice de recherche France Daigle, sans qui je ne serais pas ou j'en suis aujourd'hui. Merci de m'avoir donné la chance de découvrir le monde de la recherche. Merci d'être toujours à l'écoute. Merci d'être si enthousiaste, positive et inspirante. Tes qualités se reflètent dans l'ambiance de ton laboratoire, accueillant, énergique et enjoué.

Je souhaite aussi remercier Chantal pour sa grande générosité et ses conseils. Tu es inspirante, rayonnante et chaque matin tu égailtais le laboratoire avec ta bonne humeur, de la musique et une bonne tasse de café. Merci à Sébastien et Jean-Mathieu d'être toujours disponible pour m'aider, me conseiller ou m'enseigner. J'ai adoré nos discussions de science, de musique ou de toutes les joies de la vie. Merci à Marilyne d'avoir amené un peu de fraîcheur au laboratoire. Tous nos fous rires et tes conseils resto me manqueront. Christine, même si on se connaît depuis peu, ton sourire est contagieux et embellit mes matins. Vous êtes ce qui fait du V-630 un laboratoire unique et inoubliable.

Merci Jean-Philippe d'être l'homme que tu es et d'être toujours là quoi qu'il arrive. Ton ambition, ta bonne humeur et la confiance que tu as envers moi contribuent chaque jour à faire de moi une meilleure personne. Comment ferais-je pour si bien expliquer à nos amis quand ils me demandent : « C'est quoi au juste que tu fais? » si tu n'arriverais pas à la rescousse en t'exclamant : « elle enlève le velcro sur la salmonelle! »

Je souhaite également remercier ma mère, Claire, pour tous les encouragements et le support que tu m'as donné tout au long de ma vie. Tu m'as toujours soutenue et je ne serais pas la même sans toi. Merci Maman.

Je remercie aussi ma famille. Ma sœur, Anne, qui me pousse toujours à aller plus loin. Mon frère, Nathanaël, qui parle seulement pour dire quelque chose d'intelligent ou pour me faire rire. Mon père, Robert, qui s'intéresse à tout et qui essaie encore de comprendre la synthèse des protéines. Merci André pour tous tes conseils, tes jeux de mots et les « choses essentielles de la vie ».

Merci également à tous mes amis. Dominique qui est tellement occupée, mais qui a toujours un peu de temps pour moi et qui retrouve toujours ma bonne humeur lorsque qu'elle a décidé d'aller faire un tour. Merci à Josée, Daphnée et Catherine. Que ferais-je sans vous les filles? Vous faites partie de ma vie depuis tellement longtemps et j'ai moins peur de vieillir sachant que vous serez toujours là. Merci à Nicolas, Sarah, Vincent, Carole-Anne, Ian, Jonathan, Jean-Daniel, Mathieu, Benoit, Émilie, Rémi, Steven, Marie-Ève, Kathleen et Sean de faire partie de ma vie et d'être toujours partant pour faire les fous. Si tout le monde avait des amis comme vous, personne ne serai déprimé.

J'aimerais aussi remercier les membres du jury d'examen de ce mémoire Dr George Szatmari et Dr Mario Jacques. Votre expertise, vos recommandations et vos conseils sont très précieux à mes yeux.



# Introduction

## 1. Généralités sur les fimbriae

### 1.1. Historique

Les fimbriae sont des structures protéiques filiformes retrouvées à la surface des bactéries et plus souvent des bactéries à Gram négatif (49). Dans la littérature, ces structures sont aussi appelées pili. Cependant, une structure de surface est généralement appelée fimbriae lorsqu'elle est impliquée en pathogenèse et pili lorsqu'elle participe à la conjugaison bactérienne. Dans cette étude, le terme fimbriae est préféré puisqu'il fut attribué en premier (24, 49) et qu'il sera question d'observer l'effet de ces structures dans la pathogenèse.

Les fimbriae sont observés pour la première fois dans une publication de Hinterberger et Reitman en 1901. Sur les photos d'une coloration de *Bacillus anthracis*, ils observent des structures à la surface externe d'une culture vieille de trois semaines et posent l'hypothèse qu'il s'agirait de structures servant à capter des nutriments en milieu épuisé (91)

Ces appendices ont ensuite été décrits plus clairement par les Drs Houwink et van Iterson en 1950 (91). Dans une étude portant sur les flagelles, ils remarquent des filaments plus courts et plus rigides sur des photos d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (Fig. 1). Puisque ces filaments sont présents plus souvent sur les cultures fixées à des surfaces abiotiques, ils posent l'hypothèse selon laquelle ces structures pourraient contribuer à l'adhésion.

Quelques années plus tard, les propriétés d'agglutination aux érythrocytes furent les premiers indicateurs que Houwink et van Iterson avaient vu juste; les fimbriae, ainsi nommés par Duguid en 1955 (49) confèrent des propriétés adhésives aux bactéries (71). Depuis, plusieurs études ont été réalisées afin de mieux les caractériser, de les différencier et de les regrouper.



**Figure 1: Première observation et description des fimbriae d'une culture d'*E. coli*.** La flèche noire pointe les fimbriae et la flèche blanche pointe les flagelles. Adapté de (91).

Plusieurs méthodes furent développées afin de détecter la présence des fimbriae à la surface des cellules. Quelques-unes de ces méthodes sont très bien connues et ont été privilégiées par les chercheurs. D'abord, l'hémagglutination est une technique largement utilisée qui consiste à soumettre des érythrocytes à la présence de bactéries. L'agglutination observée révèle la capacité des bactéries d'adhérer aux cellules sanguines. Cette capacité d'adhérence expose la présence de structure d'adhésion à la surface de la bactérie. La technique d'hémagglutination a permis de découvrir et de classer plusieurs fimbriae particulièrement chez les *Enterobacteriaceae*. Malgré les avantages de cette

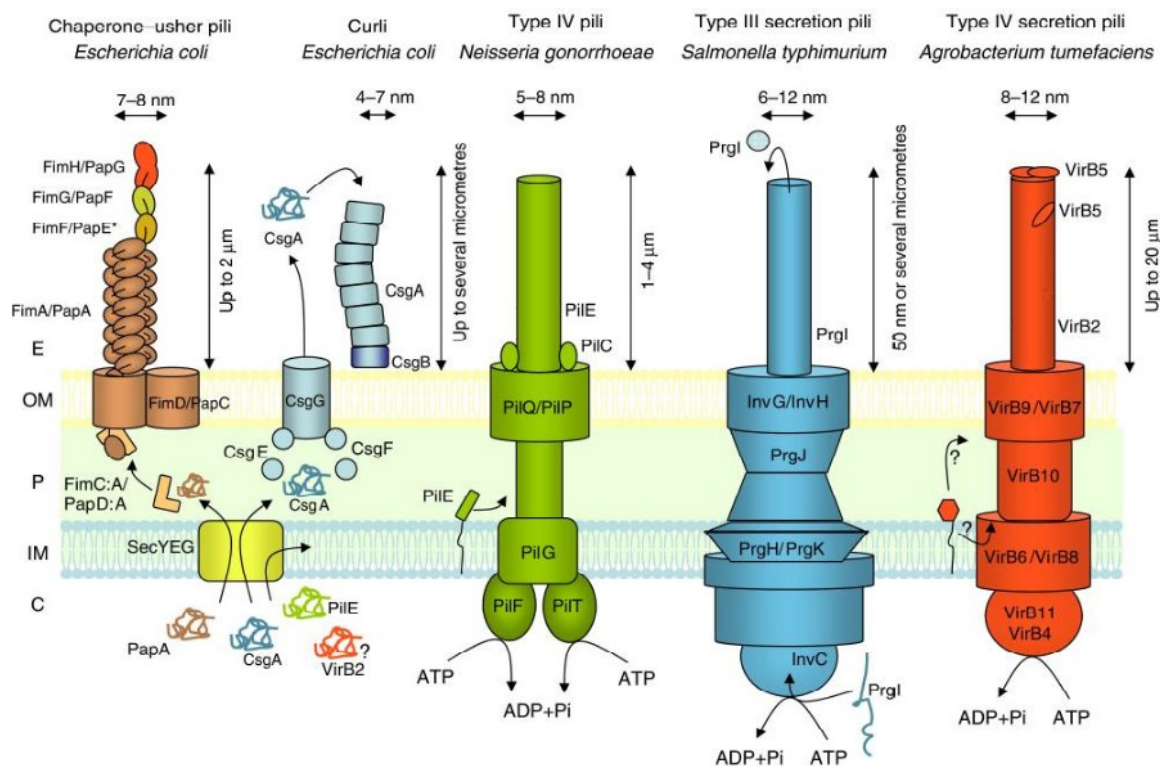
méthode (peu onéreuse et peu fastidieuse), elle peut mener à des irrégularités selon les techniques et le type d'érythrocytes utilisés (173).

Ensuite, l'agglutination de levures fut mise au point afin de révéler la présence de fimbriae capables de se lier au mannose. En exposant une culture bactérienne à des blastospores de *Candida albicans* ou des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* qui possèdent tous les deux une paroi riche en mannose, il est possible d'observer de l'agglutination seulement lorsque la bactérie présente des fimbriae pouvant lier le mannose (aujourd'hui classé parmi les fimbriae de type 1). Un contrôle souvent effectué est l'ajout de D-mannose qui inhibe l'agglutination permettant de confirmer que la liaison au mannose est bel et bien à l'origine de l'agglutination. Cette technique présente également des lacunes puisque la présence d'une capsule bactérienne peut provoquer des résultats faux-positifs si la capsule agglutine aux levures. Également, selon l'isotonicité de la solution utilisée, l'hydrophobicité des fimbriae peut provoquer une autoagglutination (173).

Finalement, puisque les fimbriae procurent des propriétés d'adhésion aux bactéries, l'essai le plus logique est d'évaluer l'adhérence à diverses cellules, culture de tissu, section de tissu ou encore à des organes de mammifères. Encore une fois, certains paramètres sont à prendre en considération et l'extrapolation de résultats est très délicate. Les nombreuses différences entre des essais *in vivo* et *in vitro* démontrent que les fimbriae ainsi que la présence des récepteurs membranaires sont étroitement régulés (173).

L'ensemble des observations réalisées depuis ont permis de regrouper les fimbriae à un ensemble de structures protéiques, dites non flagellaires, retrouvées à la surface des bactéries à Gram négatif. Les organelles non flagellaires des bactéries à Gram négatif sont maintenant divisées en cinq classes selon leurs voies de biogenèse. On y trouve les fimbriae empruntant la voie chaperon-placier (Chaperone-Usher Pathway (CUP)), les curli, les pili de type IV, les systèmes de sécrétion de type III (SST3) et les pili de sécrétion de

type IV (SST4) (Fig. 2) (61). Cette étude se concentre sur les systèmes d'adhésion de la bactérie *Salmonella enterica* sérovar Typhi (*S.Typhi*). Les fimbriae CUP, les curli et les pili de type IV sont discutés, mais les systèmes de sécrétion de type III et IV ne sont pas explorés de manière approfondie. *S. Typhi* possède aussi des SST1 et SST6 qui seront abordés brièvement.



**Figure 2: Classes d'organelles non flagellaires retrouvées à la surface des bactéries à Gram-négatif.** Représentation schématique des différentes organelles retrouvées à la surface des bactéries à Gram négatif. Tiré de (61) avec reproduction autorisée sans permission selon une « creative commons license »

## 1.2. Fonction des fimbriae

Les fimbriae sont des structures présentes chez la famille des *Enterobacteriaceae*, mais aussi chez de nombreux genres bactériens tels, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Xylella*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* et *Ralstonia* (166). Pour tous ces genres bactériens, la



bactérie doit établir un contact avec les cellules de l'hôte afin de le coloniser. Ce contact est assuré en partie par les fimbriae qui confèrent des propriétés d'adhésion aux bactéries (48). Les propriétés d'adhésion des fimbriae reposent sur leur capacité à reconnaître et à se lier à un récepteur présent à la surface des cellules hôtes. Ce mécanisme d'adhésion procure une spécificité d'hôte ou de tissu pour la bactérie. Pour la plupart des fimbriae répertoriés, le récepteur n'a pas encore été découvert. Cependant, quelques-uns sont bien caractérisés. Par exemple, la souche *E. coli* UPEC exprime des fimbriae afin d'entrer dans les cellules épithéliales de la vessie en adhérant aux  $\alpha$ -D-mannose (41, 155, 198).

Bien que l'adhérence soit une étape clé à l'établissement de l'infection, les fimbriae semblent être impliqués à plusieurs autres niveaux dans la pathogénèse. Chez *Salmonella*, les fimbriae sont impliqués dans l'adhérence et l'invasion de l'épithélium intestinal (3, 30, 193) ainsi que dans la formation de biofilms (19, 114). D'autres études suggèrent que les fimbriae de *Salmonella* soient également impliqués dans la phase systémique de l'infection (51, 113). Notamment, les fimbriae *csg* et *saf* de *S. Typhi* sont fortement exprimés dans les macrophages humains lors d'infections de cellules *in vitro* (55). Des communautés intracellulaires de bactéries comparable à des biofilms ont été observées et pourraient impliquer l'action de certains fimbriae (132, 198)

Le pilus de type IV procure une adhérence à *S. Typhi* en se liant au « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » (CFTR) un récepteur exprimé en surface des cellules épithéliales (124, 149, 186). Aussi, le pilus de type IV participe au phénomène de « twitching motility » (176). Ce phénomène consiste à rétracter rapidement le filament externe tout en restant attaché à la cellule hôte, créant ainsi un rapprochement entre les deux cellules (126). Les fimbriae de la famille « CUP » ne participent pas à la mobilité et certains sont inter-régulés de manière différentielle par rapport aux flagelles (160). Le

régulateur CsgD agit à la fois en tant qu'activateur de la transcription du fimbriae *csg* et en tant que répresseur transcriptionnel de certains composants des flagelles (142).

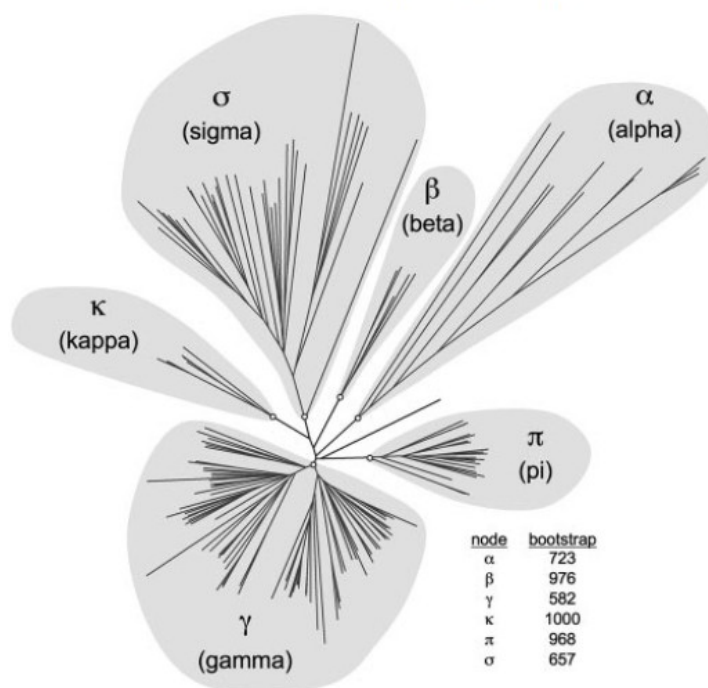
Malgré l'ubiquité des fimbriae chez les bactéries pathogènes, beaucoup d'informations sur leurs fonctions dans la virulence restent à découvrir. La complexité de leur régulation (Section 2.2.) ne fait que confirmer l'importance du rôle de ces structures dans la pathogenèse bactérienne.

### 1.3. Nomenclature des fimbriae

La très large distribution des fimbriae présente un défi majeur à leur classification. Leurs diverses propriétés d'adhésion furent d'abord ciblées afin de les classer en différents groupes (71). Par la suite, c'est en analysant leurs structures protéiques qu'une nomenclature fut établie (25, 48, 145). Une classification plus récente qui se basait sur le diamètre des filaments a été proposée, mais trop de variations étaient observées à l'intérieur d'un même groupe afin que cette classification soit valide (140, 146).

L'arrivée du séquençage a permis d'analyser les séquences des opérons fimbriaires donnant lieu à une nouvelle nomenclature. Puisqu'un opéron fimbriaire possède en général de 3 à 7 gènes, mais qu'il présente toujours 1 seul placier, la nouvelle classification est basée sur les séquences génétiques des placiers. En comparant tous les placiers d'opérons fimbriaires connus, la plupart découverts *in silico*, un arbre phylogénétique a été établi (Fig. 3). Cet arbre classe les fimbriae en 6 clades définis par les lettres grecques  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\kappa$ ,  $\pi$  et  $\sigma$ . Ensemble, ces 6 clades forment la famille des protéines placiers fimbriaires « fimbrial usher proteins » (*FUP family*) (140). Malgré que cette nouvelle classification soit acceptée par la communauté scientifique, plusieurs termes venant d'anciennes nomenclatures sont encore largement utilisés, tels fimbriae de type 1 (48) et pili de type IV (145).

### La famille des Protéines Placiers Fimbriaires Fimbrial Usher Protein (FUP) Family



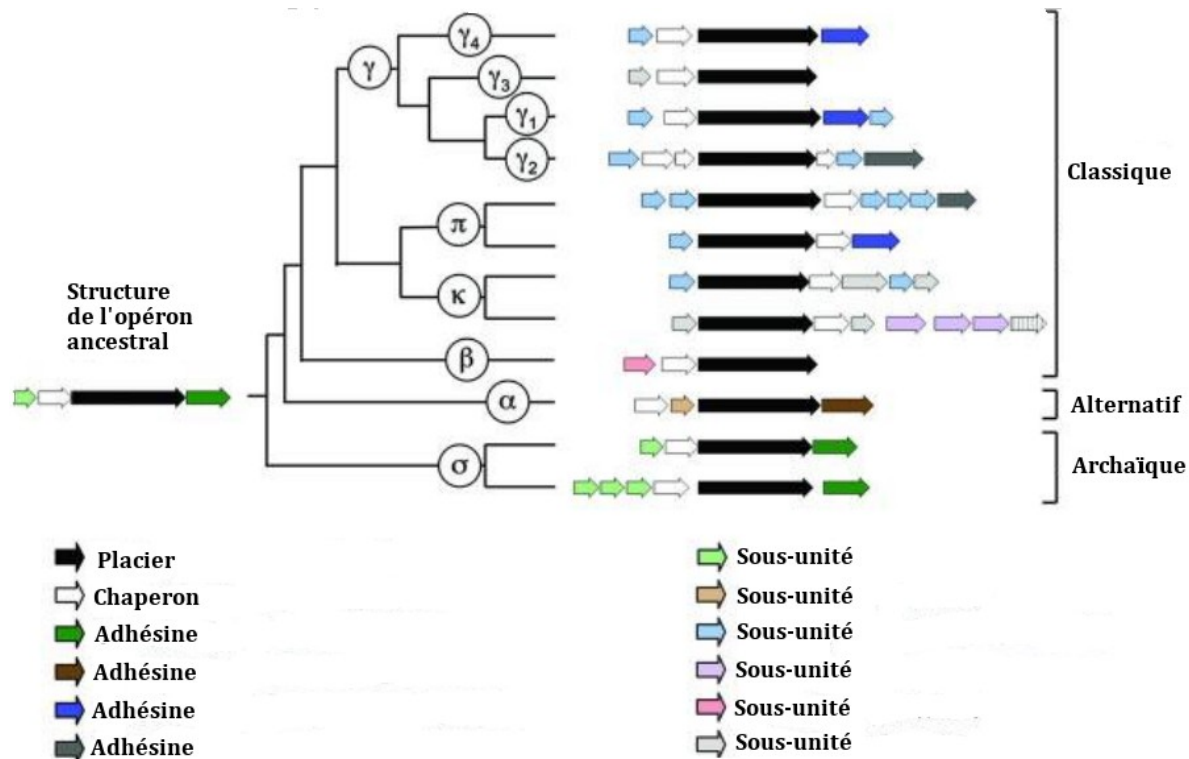
**Figure 3: Arbre phylogénétique de la famille des protéines placiers fimbriaires.** Les fimbriae d'intérêt dans l'étude sont associés aux clades  $\gamma$ 1- (*bcf, fim, stg, sth*),  $\gamma$ 3- (*saf, sef*),  $\gamma$ 4- (*sta, stb, stc*),  $\pi$ - (*std, ste*) ainsi que le clade  $\alpha$ -(*tcf*). Adapté de (140)

#### 1.4. Organisation des opérons fimbriaires

Comme mentionné précédemment, les opérons fimbriaires ont été pour la plupart découverts lors d'analyses *in silico* et chez *S. Typhi* ce fut lors du séquençage du génome (147, 184). En effet, en se basant sur les séquences fimbriaires connues, il est possible de déduire l'existence de nouveaux fimbriae par homologie. Les gènes composant l'opéron fimbriaire sont aussi, très souvent, disposés dans un ordre précis.

L'opéron ancestral tel que défini par Nuccio et Baumler (140) se caractérise par la présence de 4 cadres de lecture. Puisqu'ils sont tous organisés en opérons, ces quatre 4 gènes sont sous le contrôle d'un même promoteur, situé en amont du premier gène. Sur cet opéron ancestral, le premier cadre de lecture code pour la sous-unité majeure du fimbriae,

la piline. Le gène suivant code pour le chaperon suivi du placier et ensuite vient le gène codant l'adhésine. À partir de cette organisation ancestrale, les opérons ont subis de nombreux remaniements et c'est ce qui a fait en sorte, qu'aujourd'hui, certains opérons arborent 3 ou même plus de 7 gènes. Aussi l'ordre dans lequel ils se succèdent sur le génome a parfois été modifié (Fig. 4).



**Figure 4 : Évolution de la structure de l'opéron fimbriaire ancestrale selon les familles phylogénétiques.** Les fimbriae d'intérêt dans l'étude sont associées aux clades  $\gamma_1$ - (*bcf, fim, stg, sth*),  $\gamma_3$ - (*saf, sef*),  $\gamma_4$ - (*sta, stb, stc*),  $\pi$ - (*std, ste*) ainsi que le clade  $\alpha$ -(*tcf*). Adapté de (140)

En plus des 4 gènes constituant l'opéron ancestral, certains fimbriae présentent des gènes supplémentaires assurant des fonctions diverses. L'opéron de type 1 (*fim*) d'*E. coli* en est un exemple. Ce dernier possède des protéines servant d'ancrage à l'adhésine. Aussi, en plus des sous-unités majeures, certains opérons fimbriaires ont des sous-unités mineures. Dans d'autres cas, plus d'une protéine chaperonne peuvent être présentes dans

un même opéron cependant, ces protéines sont souvent pseudogènes. Certains opérons peuvent aussi contenir des gènes codant pour des protéines de régulation servant à réguler l'expression du fimbriae, mais pouvant également être impliquées dans d'autres systèmes de régulation (140).

Les opérons fimbriaires sont des éléments qui confèrent généralement un avantage aux bactéries. Par leur capacité à reconnaître différents récepteurs sur différents types cellulaires, ils permettent à celles-ci de coloniser différents hôtes qui ne sont pas accessibles aux bactéries non pathogènes. Actuellement, l'hypothèse acceptée de la communauté scientifique veut que ces éléments aient été incorporés dans le génome de la bactérie via un transfert horizontal contribuant ainsi à différencier chaque souche pathogène des souches non pathogènes. Chez la bactérie *Salmonella*, de grandes régions du chromosome appelées îlots de pathogénicité ou SPI (« *Salmonella* Pathogenicity Island») ont été acquises lors d'un transfert horizontal (151). Plusieurs observations soutiennent cette hypothèse. Notamment, le pourcentage en Guanine et Cytosine (GC) de ces régions est différent du pourcentage en GC du génome complet de la bactérie (76, 77). Aussi, ces SPIs sont souvent retrouvés dans des régions appelées « hotspot » d'insertion, flanqués de recombinaisons et de transposases et près de beaucoup de séquences d'ARNt.

### **1.5. Structure protéique des fimbriae**

À la surface, les fimbriae sont des micro-fibrilles protéiques larges de 2 à 8 nm de diamètre et de longueurs diverses, mais toujours plus courts et rigides que les flagelles. Cependant, chaque type de fimbriae présente une structure individuelle et spécifique (105). Ces filaments sont habituellement constitués d'au moins 3 protéines distinctes. Le filament est non ramifié et constitué d'une succession de la même protéine; la sous-unité majeure. Cette dernière diffère légèrement selon l'espèce bactérienne, mais présente

toujours un poids moléculaire de 12 à 20 kDa (190). À l'extrémité distale du filament se trouve une protéine dite adhésine qui est généralement responsable des propriétés d'adhésion puisqu'elle reconnaît un récepteur spécifique chez les cellules hôtes. Dû aux différences entre les sous-unités majeures ainsi que les adhésines de chaque fimbriae, certains filaments sont plus longs et minces, d'autres sont plus courts et solides, mais tous sont oligomériques et ancrés dans la membrane externe par une protéine transmembranaire d'environ 90 à 95 kDa; le placier. Une quatrième protéine, le chaperon, même si non-associée directement à la structure extracellulaire est essentielle à l'assemblage des fimbriae. Elle est située dans l'espace périplasmique et permet le transfert sécuritaire des sous-unités majeures et des adhésines entre la membrane interne et le placier. Ce mécanisme d'assemblage sera vu en détail à la section suivante (Section 1.6.).

Dans certains cas, les fimbriae peuvent présenter plusieurs protéines différentes à leur extrémité. Par exemple le fimbriae de type 1 chez *E.coli* et *Salmonella* possède trois protéines à son extrémité : FimH, FimI et FimJ, mais seul FimH sert d'adhésine. Les deux autres sont des protéines qui servent d'intermédiaires entre la sous-unité majeure et l'adhésine (Fig. 2.) (1, 100, 108, 157). Chaque espèce bactérienne a son propre répertoire de fimbriae. Une bactérie peut posséder divers types de fimbriae dans son génome. Ceux-ci peuvent être exprimés en plusieurs exemplaires chacun. On observe parfois de 100 à 1000 filaments du même fimbriae par cellule. Les mécanismes qui déterminent la quantité de chaque fimbriae à la surface ainsi que la localisation de ceux-ci sur la bactérie demeurent inconnus.

### 1.6. Biogenèse des fimbriae

Dans le cas des fimbriae CUP, l'exportation des protéines à la surface et la construction des filaments est assurée dans un premier temps par le système de translocation SecYEG (« general secretory pathway ») conservé chez un grand nombre de bactéries et également chez les cellules eucaryotes (46, 47). Ce complexe protéique forme un pore de 20 à 25 Å de diamètre, dans la membrane cytoplasmique (46) et permet la sécrétion de différentes protéines dans le périplasme ainsi que l'insertion de protéines dans la membrane interne. Cette structure est aussi appelée translocon et n'est pas spécifique à la sécrétion de protéines fimbriaires. Lorsqu'il s'agit de protéines insérées dans la membrane interne, elles sont transloquées de manière co-traductionnelle. Cependant, lorsqu'il s'agit de protéines sécrétées dans le périplasme elles sont transloquées de manière post-traductionnelle (47).

Le choix de la voie co- ou post-traductionnelle se réalise lorsque la chaîne peptidique naissante sort du ribosome. Si le peptide sortant du ribosome est très hydrophobe, il y aura association avec un signal de reconnaissance particulière (« signal recognition particle » SRP). Si tel est le cas, cette association entre la chaîne naissante et le SRP provoquera un ralentissement ou un arrêt de la synthèse. Ce temps d'attente permet au complexe SRP-ribosome-chaîne naissant de s'associer à la membrane interne via la protéine ancrée FtsY. Cette protéine veille à l'association entre le ribosome et le translocon SecYEG. La traduction peut ainsi se poursuivre permettant l'ancrage de la protéine dans la membrane interne.

Dans le cas des peptides naissants qui ne présentent pas une haute hydrophobicité, ils seront liés à un facteur déclenchant (« trigger factor »). C'est ce qui se produit avec les protéines fimbriaires. Ce facteur déclenchant empêche la liaison au SRP, ce qui provoque la traduction complète de la protéine dans le cytoplasme. Une fois synthétisées, les

préprotéines seront maintenues en conformation non repliée par les protéines SecB. C'est également ces protéines qui entraînent l'association entre la protéine non repliée et le translocon SecYEG. Dans le cytoplasme, le translocon expose SecA, une protéine qui permet le passage des préprotéines non repliées dans le pore transmembranaire au moyen d'ATP (47). Toutes les protéines fimbriaires doivent être sécrétées par ce système. Le chaperon et le placier ne font pas exception.

### 1.6.1. La voie CUP

Dans le périplasme, les différentes protéines des fimbriae (sous-unités majeure et adhésine) sont reconnues puis repliées par la protéine chaperonne. Celle-ci viendra insérer un brin- $\beta$  appelé G1 dans le sillon P5 de la sous-unité venant ainsi compléter le repliement incomplet de la protéine et protéger sa région hydrophobe. Cette opération se nomme la complémentation par le brin donneur (« donor strand complementation » DSC) (31, 164). Le chaperon est ensuite recruté au placier et l'association du complexe chaperon-adhésine provoque un changement de conformation du placier. Ce changement confère au placier un état propice à l'assemblage de la fimbriae (168). Les placiers fonctionnent en dimère. Un seul présente un pore ouvert, l'autre participe au recrutement des complexes chaperon-adhésine/sous-unité (Fig. 6) (116, 120, 125, 154).

Les complexes chaperon-adhésine sont ceux ayant la plus grande affinité pour le placier. Par conséquent, l'adhésine sera introduite dans le placier en premier puis les sous-unités majeures suivront assurant ainsi sa position à l'extrémité de la fimbriae (44, 153, 154, 167, 168). Cette grande affinité vient du fait que l'adhésine, une protéine similaire aux sous-unités, possède aussi une extrémité N-terminale servant de récepteur (9). Cette portion N-terminale permet une association plus forte au placier (9). Les autres sous-unités, mêmes si dépourvues de brins servant de récepteur peuvent s'associer au placier, mais moins fortement. Aussi, c'est ce même brin N-terminal qui permet le repliement



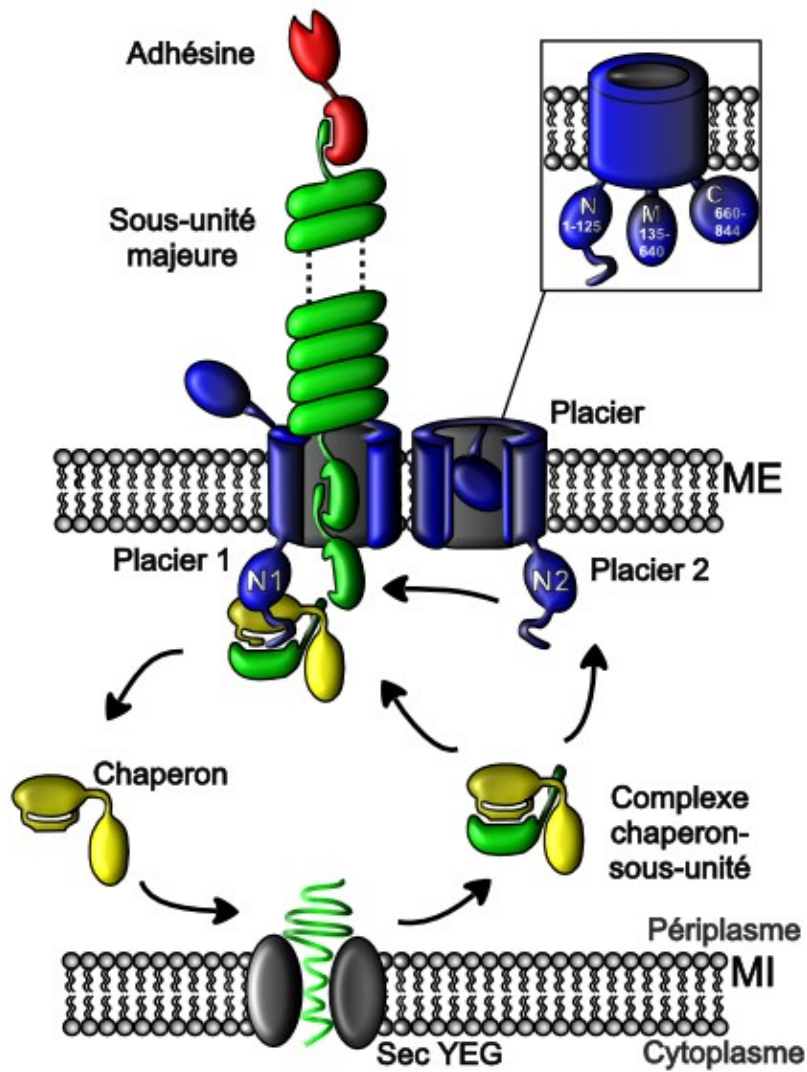
indépendant de l'adhésine dans le périplasme. Celui-ci s'insère directement dans son propre sillon P5. Cette protéine ne nécessite donc pas le chaperon pour son repliement ni pour la complémentation. L'adhésine s'associe tout de même au chaperon pour optimiser le recrutement au placier et permettre la suite de la polymérisation (9).

Lors de la polymérisation, l'extrémité N-terminale (résidu P5) d'une nouvelle sous-unité vient s'insérer dans le sillon de la sous-unité précédente et remplace ainsi le brin- $\beta$  du chaperon. Ce processus se nomme échange du brin donneur (« donor strand exchange » DSE) (153, 165, 203) et est aussi appelé « Zip-in Zip-out » puisqu'au fur et à mesure qu'une extrémité N-terminal insert son résidu P5 dans la pochette P5 du sillon de la sous-unité précédente, le brin- $\beta$  du chaperon glisse vers l'extérieur mimant ainsi le fonctionnement d'une « fermeture éclair » (Fig. 5) (153).

Une fois la polymérisation en cours, aucune adhésine ne sera incorporée dans le filament puisque la portion N-terminale servant de récepteur ne peut s'insérer dans le sillon de la sous-unité précédente. Ce mécanisme limite les fimbriae à une seule adhésine par filament et celle-ci est localisée à l'extrémité distale seulement. Ce processus de polymérisation ne nécessite pas d'ATP. L'énergie libérée lors du repliement des sous-unités, lorsque celles-ci sont relâchées par le chaperon, semble être appropriée et suffisante afin de stimuler la polymérisation du filament (61). C'est un processus très efficace qui s'effectue en termes de minutes (139, 153, 189).

Dans le cas du fimbriae *pap* chez *E. coli*, l'arrêt de la polymérisation est causée par l'incorporation d'une sous-unité (PapH) ne présentant pas la « pochette P5 » dans son sillon (6, 139, 188). Le DSE ne peut donc plus avoir lieu. Pour les autres fimbriae sécrétés par la voie CUP, l'arrêt de la polymérisation est un phénomène encore inconnu. Une régulation de la quantité de sous-unité majeure au niveau transcriptionnel ou

traductionnel pourrait être en cause. La présence d'une protéine homologue à PapH pourrait aussi être impliquée.

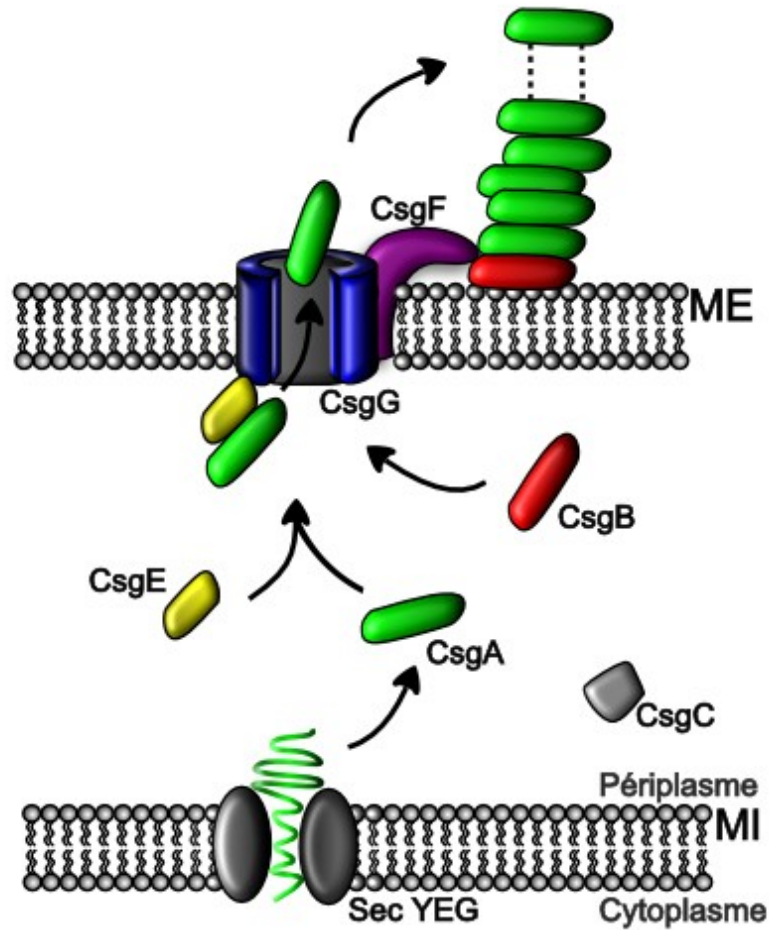


**Figure 5 : Représentation schématique de la biogenèse des fimbriae de la voie CUP.**  
ME : Membrane externe, MI : Membrane interne Adapté de (60).

### 1.6.2. Curli

Le fimbriae agrégatif, aussi appelé curli, est codé par deux opérons adjacents et transcrits de manière divergente. D'une part, *csgBAC* code pour une protéine associée à la membrane externe CsgB qui permet la précipitation des sous-unités majeures CsgA ainsi qu'une protéine périplasmique CsgC dont la fonction est encore inconnue (28, 69, 79). D'autre part, l'opéron *csgDEFG* code pour une protéine formatrice de pores dans la membrane externe CsgG (156). Les protéines CsgE et CsgF sont des protéines accessoires périplasmiques pouvant interagir avec CsgG (156). CsgD est un régulateur transcriptionnel positif de *csgBAC* (8) qui participe aussi à la régulation globale modulant plusieurs voies de signalisation chez *S. Typhi* (20, 142).

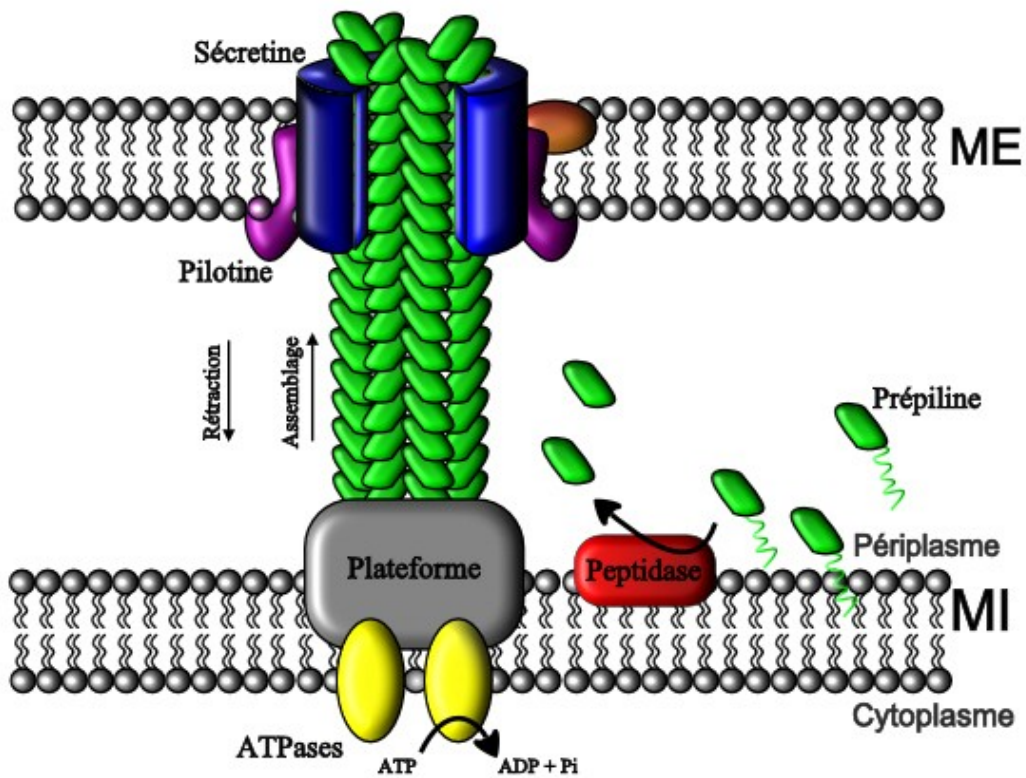
La biogenèse du curli débute, tout comme la voie CUP, par la sécrétion à travers la membrane interne via le système *secYEG* de toutes protéines Csg à l'exception du régulateur CsgD. Une fois dans le périplasme, les protéines CsgG sont prises en charge par le système de transport LOL (« lipoprotein outer-membrane localization ») (54, 134) afin d'être insérées de manière à former un pore dans la membrane externe. La protéine CsgF est insérée dans la membrane et associée à CsgG. Elle expose une extrémité à l'extérieur qui sert à diriger la localisation de CsgB ainsi que la polymérisation des sous-unités CsgA (28, 54, 80, 137). Il apparaît que la protéine CsgE pourrait servir de chaperon à la protéine CsgA lorsque celle-ci se trouve dans le périplasme (136). Dans le milieu extracellulaire, la protéine CsgA est soluble, mais elle est rapidement polymérisée via la voie « nucleation precipitation pathway » (16, 121). Lors de cet assemblage, les sous-unités CsgA vont précipiter et polymériser à CsgB pour former un agrégat protéique insoluble (Fig. 6) (79).



**Figure 6 : Représentation schématique de la biogenèse du système d'adhésion Curli par la voie de « nucleation precipitation pathway »** ME : Membrane externe, MI : Membrane interne.

### 1.6.3. Pili type IV

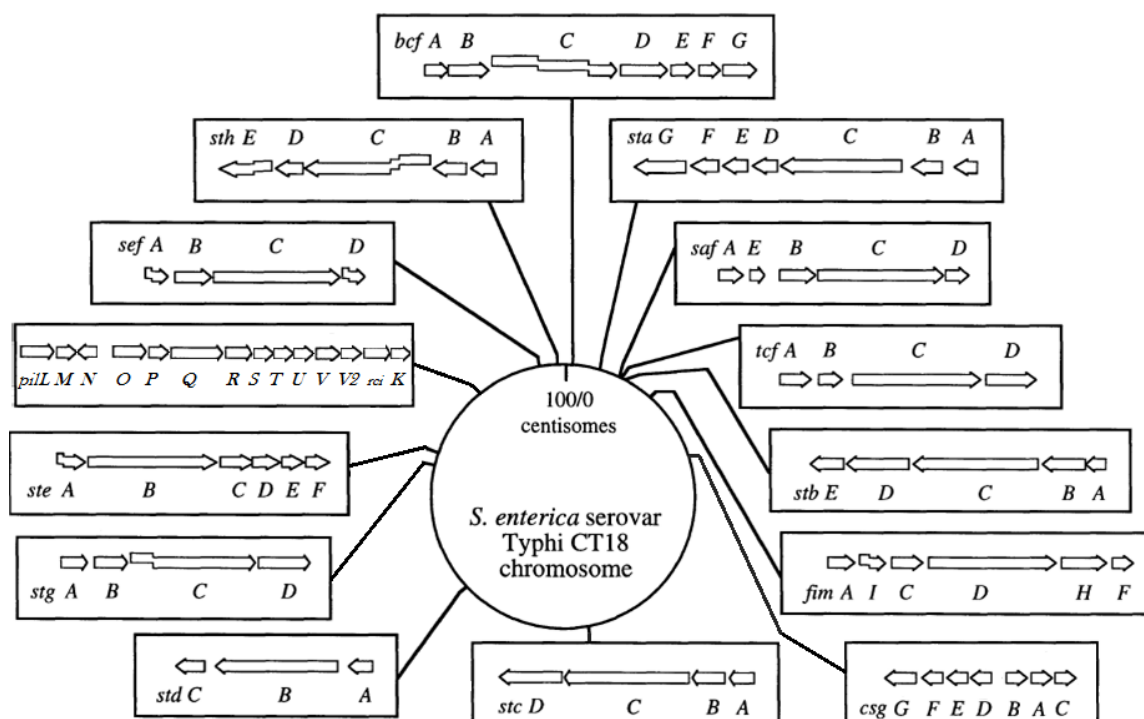
La voie de sécrétion des pili de type IV est très différente de la voie CUP et de curli. D'abord parce qu'elle nécessite de l'ATP comme source d'énergie, ensuite parce que la structure des pili reste connectée aux deux membranes (externe et interne) de la bactérie (Fig. 7). C'est cette connexion qui permet au pilus d'être rétracté rapidement à l'intérieur de la cellule lors du phénomène de « twitching motility » (126, 176). Les sous-unités principales du pilus sont codées par *pilS* et sont appelées prépilines. Ces dernières, une fois dans le périplasme, sont clivées par une peptidase (PilU) localisée dans la membrane interne, puis sécrétées par un pore, la sécrétine, à travers la membrane externe (35). Le glissement du pilus vers l'extérieur de la cellule par le pore de la sécrétine permet le recrutement, dans le périplasme, d'une nouvelle prépiline. La pilotine est une autre protéine insérée dans la membrane externe qui pourrait participer à la localisation ainsi qu'à la stabilisation de la sécrétine (61). Les ATPases nécessaires à l'assemblage ainsi qu'à la rétraction du pilus sont dans le cytoplasme, mais associées à une protéine servant de plateforme dans la membrane interne (Fig. 7)



**Figure 7: Représentation schématique du mécanisme d'assemblage du pilus de type IV et des protéines impliquées localisées dans la membrane interne (MI) et dans la membrane externe (ME).**

## 2. Les fimbriae de *S. Typhi*

Les salmonelles possèdent un répertoire unique de fimbriae spécifique à chaque sérovar. La bactérie *S. Typhi* possède 14 opérons de type fimbriaire. Ces derniers ont tous, à l'exception du fimbriae de type 1 (*fim*) été découverts par analyse *in silico* (184). Parmi ces 14 opérons, 12 sont des fimbriae exprimés par la voie CUP (*bdf*, *fim*, *saf*, *sef*, *sta*, *stb*, *stc*, *std*, *ste*, *stg*, *sth* et *tcf*), 1 fimbriae est dit agrégatif (*curli*, *csg*) et un dernier opéron code pour un pilus de type IV (*pil*) (Fig. 8). Chez les fimbriae CUP on retrouve des membres du clade  $\gamma$ 1- (*bcf*, *fim*, *stg*, *sth*),  $\gamma$ 3- (*saf*, *sef*),  $\gamma$ 4- (*sta*, *stb*, *stc*),  $\pi$ - (*std*, *ste*) ainsi que le clade  $\alpha$ - (*tcf*) (Fig. 3).



**Figure 8: Localisation et organisation des différents opérons fimbriaires du génome de *S. Typhi* CT18.** Chaque flèche représente un gène. Les flèches fractionnées représentent des pseudogènes. Chaque opéron est représenté selon sa localisation dans le génome de *S. Typhi*. Adapté de (94).

Certains opérons fimbriaires se retrouvent sur des SPIs. L'opéron *safAEB*CD (112) et l'opéron *tcf*ABCD (184) se situent sur le SPI-6. L'opéron *sef*ABCD se retrouve sur le SPI-10 de *S. Typhi*. Tandis que l'opéron codant pour un pili de type IV (*pil*) se situe sur le SPI-7 (147, 158). Parmi ceux-ci, seul l'opéron *sef*ABCD présente un ratio de GC qui diffère beaucoup de celui du génome de *S. Typhi*, soit 35 % (*sef*) par rapport à 51,9 % (*S. Typhi* souche CT18). Même si la plupart des fimbriae de *S. Typhi* ne sont pas localisés sur des SPIs, une majorité d'entre eux, tout comme les SPIs, sont retrouvés près de gènes qui codent pour des transposases, des intégrases, des séquences d'insertions (IS) ou des ARN-t.

Le répertoire spécifique de fimbriae de *S. Typhi* se distingue de celui de *S. Typhimurium* par la présence de 5 opérons uniques au sérovar Typhi (*sef*, *sta*, *ste*, *stg* et *tcf*), mais aussi par la présence du SPI-7 codant pour les pili de type IV et la capsule Vi qui sont absents chez *S. Typhimurium*. Parmi tous ces opérons quelques uns contiennent des pseudogènes (*bcf*, *sef*, *ste*, *stg* et *tcf*) (Tableau I). Une description détaillée de chaque opéron fimbriaire de *S. Typhi* est présentée dans le tableau I.



**Tableau I : Description générale de chacun des opérons fimbriaires de *S. Typhi*.** Détail pour chaque cadre de lecture ouvert (ORFs) ainsi que leur fonction associée (Les fonctions ont été attribuées selon les données retrouvées dans la littérature ainsi que par homologie de séquence)

| Opéron      | Longueur (pb) | % GC      | ORFs                                | Longueur        | Poids Mol. | Fonction  |   |
|-------------|---------------|-----------|-------------------------------------|-----------------|------------|-----------|---|
| <i>bcf</i>  | 6 743         | 52        | 7                                   | <i>bcfA</i>     | 543 pb     | 18.17 kDa | Recombinase (Paralogue de FimA chez <i>E.coli</i> ) |
|             |               |           |                                     | <i>bcfB</i>     | 687 pb     | 25.52 kDa | Chaperonne  |
|             |               |           |                                     | <i>bcfC</i>     | 2622 pb    | 94.64 kDa | Placier (Pseudogène)                                |
|             |               |           |                                     | <i>bcfD</i>     | 1008 pb    | 35.97 kDa | Adhésine  |
|             |               |           |                                     | <i>bcfE</i>     | 546 pb     | 19.49 kDa | Sous-unité  |
|             |               |           |                                     | <i>bcfF</i>     | 519 pb     | 17.72 kDa | Sous-unité mineure                                  |
|             |               |           |                                     | <i>bcfG</i>     | 705 pb     | 26.06 kDa | Chaperonne (Pseudogène)                             |
| <i>csg</i>  | 4 449         | 44        | 7                                   | <i>csgB</i>     | 456 pb     | 16.26 kDa | Sous-unité mineure (ancrage et agglutination)       |
|             |               |           |                                     | <i>csgA</i>     | 456 pb     | 15.31 kDa | Sous-unité majeure                                  |
|             |               |           |                                     | <i>csgC</i>     | 327 pb     | 11.71 kDa | Protéine périplasmique (fonction inconnue)          |
|             |               |           |                                     | <i>csgD</i>     | 627 pb     | 23.82 kDa | Régulateur transcriptionnel (DNA binding)           |
|             |               |           |                                     | <i>csgE</i>     | 396 pb     | 15.15 kDa | Chaperonne  |
|             |               |           |                                     | <i>csgF</i>     | 417 pb     | 15.16 kDa | Protéine membranaire (stabilisation/localisation)   |
|             |               |           |                                     | <i>csgG</i>     | 834 pb     | 34.99 kDa | Pore membrane externe (assemblage/transport)        |
| <i>fim</i>  | 9 183         | 50        | 10                                  | <i>fimA</i>     | 555 pb     | 18.80 kDa | Sous-unité majeure (Piline)                         |
|             |               |           |                                     | <i>fimI</i>     | 534 pb     | 18.97 kDa | Sous-unité majeure (Pseudogène)                     |
|             |               |           |                                     | <i>fimC</i>     | 693 pb     | 24.94 kDa | Chaperonne  |
|             |               |           |                                     | <i>fimD</i>     | 2613 pb    | 95.13 kDa | Placier   |
|             |               |           |                                     | <i>fimH</i>     | 1008 pb    | 36.11 kDa | Adhésine  |
|             |               |           |                                     | <i>fimF</i>     | 519 pb     | 17.99 kDa | Sous-unité mineure                                  |
|             |               |           |                                     | <i>fimZ</i>     | 633 pb     | 23.53 kDa | Régulateur transcriptionnel positif                 |
|             |               |           |                                     | <i>fimY</i>     | 723 pb     | 27.79 kDa | Régulateur transcriptionnel positif                 |
|             |               |           |                                     | <i>STY 0599</i> | 312 pb     | 11.43 kDa | Fonction inconnue                                   |
| <i>fimW</i> | 597 pb        | 23.43 kDa | Régulateur transcriptionnel négatif |                 |            |           |   |

| Opéron      | Longueur (pb) | % GC      | ORFs     | Longueur          | Poids Mol. | Fonction  |  |
|-------------|---------------|-----------|----------|-------------------|------------|-----------|--|
| <i>pil</i>  | 13 186        | 54        | 15       | <i>pilL</i>       | 1245 pb    | 43.87 kDa | Protéine Exportée (Putative)                 |
|             |               |           |          | <i>pilM</i>       | 365 pb     | 15.04 kDa | Protéine Exportée (Putative)                 |
|             |               |           |          | <i>pilN'</i>      | 426 pb     | 15.34 kDa | Lipoprotéine homologue de pilN               |
|             |               |           |          | <i>STY4541(N)</i> | 1256 pb    | 44.29 kDa | Protéine d'assemblage du pili                |
|             |               |           |          | <i>pilO</i>       | 1296 pb    | 48.03 kDa | Protéine d'assemblage du pili                |
|             |               |           |          | <i>pilP</i>       | 471 pb     | 15.91 kDa | Protéine d'assemblage du pili                |
|             |               |           |          | <i>pilQ</i>       | 1716 pb    | 62.91 kDa | Protéine se liant aux nucléotides            |
|             |               |           |          | <i>pilR</i>       | 1086 pb    | 40.08 kDa | Protéine membranaire                         |
|             |               |           |          | <i>pilS</i>       | 636 pb     | 21.64 kDa | Prépiline                                    |
|             |               |           |          | <i>pilT</i>       | 477 pb     | 17.96 kDa | Protéine membranaire                         |
|             |               |           |          | <i>pilU</i>       | 663 pb     | 24.33 kDa | Prépiline peptidase                          |
|             |               |           |          | <i>pilV</i>       | 1308 pb    | 46.44 kDa | Prépiline                                    |
|             |               |           |          | <i>pilV2</i>      | 261 pb     | 9.35 kDa  | Prépiline (extrémité C-Terminal Alternative) |
|             |               |           |          | <i>rci</i>        | 1152 pb    | 43.51 kDa | Recombinase                                  |
|             |               |           |          | <i>pilK</i>       | 468 pb     | 18.23 kDa | Protéine exportée (Putative)                 |
| <i>saf</i>  | 4 967         | 50        | 5        | <i>safA</i>       | 495 pb     | 17.38 kDa | Sous-unité majeure                           |
|             |               |           |          | <i>safE</i>       | 553 pb     | 17.27 kDa | Sous-unité (Pseudogene)                      |
|             |               |           |          | <i>safB</i>       | 741 pb     | 26.66 kDa | Chaperonne                                   |
|             |               |           |          | <i>safC</i>       | 2511 pb    | 91.44 kDa | Placier                                      |
|             |               |           |          | <i>safD</i>       | 471 pb     | 17.01 kDa | Adhésine                                     |
| <i>sef</i>  | 4351          | 35        | 4        | <i>sefA</i>       | 494 pb     | 16.93 kDa | Adhésine (Pseudogène)                        |
|             |               |           |          | <i>sefB</i>       | 753 pb     | 28.48 kDa | Chaperonne                                   |
|             |               |           |          | <i>sefC</i>       | 2517 pb    | 92.23 kDa | Placier                                      |
|             |               |           |          | <i>sefD</i>       | 443 pb     | 16.25 kDa | Sous-unité majeure (Pseudogène)              |
| <i>sta</i>  | 7148          | 49        | 7        | <i>staA</i>       | 585 pb     | 19.99 kDa | Sous-unité majeure                           |
|             |               |           |          | <i>staB</i>       | 735 pb     | 26.86 kDa | Chaperonne                                   |
|             |               |           |          | <i>staC</i>       | 2592 pb    | 94.66 kDa | Placier                                      |
|             |               |           |          | <i>staD</i>       | 567 pb     | 19.66 kDa | Sous-unité                                   |
|             |               |           |          | <i>staE</i>       | 615 pb     | 21.46 kDa | Fonction inconnue                            |
|             |               |           |          | <i>staF</i>       | 597 pb     | 21.42 kDa | Sous-unité                                   |
| <i>staG</i> | 1176 pb       | 42.55 kDa | Adhésine |                   |            |           |  |

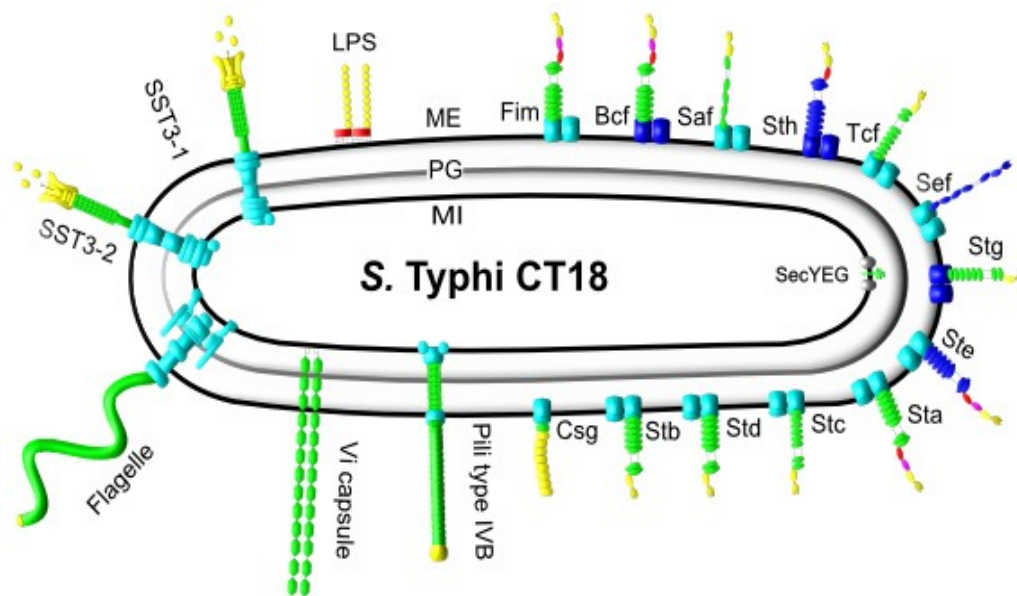
| Opéron     | Longueur (pb) | % GC | ORFs | Longueur    | Poids Mol. | Fonction  |                                       |
|------------|---------------|------|------|-------------|------------|-----------|---------------------------------------|
| <i>stb</i> | 5960          | 51   | 4    | <i>stbA</i> | 537 pb     | 18.36 kDa | Sous-unité majeure                    |
|            |               |      |      | <i>stbB</i> | 780 pb     | 28.04 kDa | Chaperonne                            |
|            |               |      |      | <i>stbC</i> | 2563 pb    | 94.53 kDa | Placier                               |
|            |               |      |      | <i>stbD</i> | 1326 pb    | 47.40 kDa | Placier (chez <i>S. Typhimurium</i> ) |
|            |               |      |      | <i>stbE</i> | 759 pb     | 28.54 kDa | Chaperonne                            |
| <i>stc</i> | 4796          | 44   | 4    | <i>stcA</i> | 531 pb     | 18.68 kDa | Sous-unité majeure                    |
|            |               |      |      | <i>stcB</i> | 684 pb     | 25.23 kDa | Chaperonne                            |
|            |               |      |      | <i>stcC</i> | 2490 pb    | 92.30 kDa | Placier                               |
|            |               |      |      | <i>stcD</i> | 1008 pb    | 36.47 kDa | Adhésine (Fonction inconnue)          |
| <i>std</i> | 3974          | 59   | 3    | <i>stdA</i> | 581 pb     | 20.23 kDa | Sous-unité majeure                    |
|            |               |      |      | <i>stdB</i> | 2490 pb    | 89.85 kDa | Placier                               |
|            |               |      |      | <i>stdC</i> | 744 pb     | 27.54 kDa | Chaperonne                            |
| <i>ste</i> | 5697          | 53   | 6    | <i>steA</i> | 588 pb     | 19.79 kDa | Sous-Unité fimbriaire (Pseudogène)    |
|            |               |      |      | <i>steB</i> | 2700 pb    | 98.64 kDa | Placier                               |
|            |               |      |      | <i>steC</i> | 773 pb     | 28.51 kDa | Chaperonne                            |
|            |               |      |      | <i>steD</i> | 507 pb     | 17.67 kDa | Sous-Unité fimbriaire                 |
|            |               |      |      | <i>steE</i> | 471 pb     | 16.80 kDa | Sous-Unité fimbriaire                 |
|            |               |      |      | <i>steF</i> | 537 pb     | 18.83 kDa | Sous-Unité fimbriaire                 |
| <i>stg</i> | 5007          | 49   | 4    | <i>stgA</i> | 576 pb     | 19.63 kDa | Sous-unité majeure                    |
|            |               |      |      | <i>stgB</i> | 699 pb     | 25.85 kDa | Chaperonne                            |
|            |               |      |      | <i>stgC</i> | 2535 pb    | 92.63 kDa | Placier (Pseudogène)                  |
|            |               |      |      | <i>stgD</i> | 1068 pb    | 38.02 kDa | Adhésine                              |
| <i>sth</i> | 5582          | 48   | 5    | <i>sthA</i> | 546 pb     | 18.95 kDa | Sous-unité majeure                    |
|            |               |      |      | <i>sthB</i> | 684 pb     | 24.83 kDa | Chaperonne                            |
|            |               |      |      | <i>sthC</i> | 2534 pb    | 89.87 kDa | Placier (Pseudogène)                  |
|            |               |      |      | <i>sthD</i> | 558 pb     | 19.43 kDa | Adhésine                              |
|            |               |      |      | <i>sthE</i> | 1085 pb    | 38.74 kDa | Protéine fimbriaire (Pseudogène)      |
| <i>tcf</i> | 5235          | 51   | 4    | <i>tcfA</i> | 711 pb     | 25.69 kDa | Chaperonne                            |
|            |               |      |      | <i>tcfB</i> | 576 pb     | 20.29 kDa | Sous-unité majeure                    |
|            |               |      |      | <i>tcfC</i> | 2688 pb    | 97.73 kDa | Placier                               |
|            |               |      |      | <i>tcfD</i> | 1080 pb    | 39.75 kDa | Adhésine                              |

## 2.1. Implication des fimbriae de *S. Typhi* dans la virulence

*S. Typhi* possède son propre répertoire de fimbriae et 5 des opérons fimbriaires présents chez *S. Typhi* (*sef*, *sta*, *ste*, *stg* et *tcf*) sont absents dans le sérovar Typhimurium. Ce dernier peut infecter l'humain, mais ne peut pas causer d'infection systémique. Plusieurs ont posé l'hypothèse que la clé permettant au sérovar Typhi d'infecter systématiquement l'humain résidait dans ces fimbriae uniques. À l'exception du fimbriae de type I, *fim*, les fimbriae de *S. Typhi* n'ont jamais été observés. Plusieurs provoquent néanmoins des effets observables lors d'infection *in vitro* ou *in vivo* (Tableau II). De plus, plusieurs opérons fimbriaires de *S. Typhi* présentent des pseudogènes et sont par conséquent réputés non-fonctionnels (*bcf*, *sef*, *ste*, *sth*, *stg* et *fim*) (Tableau I). Toutefois, malgré la présence occasionnelle d'au moins un pseudogène, plusieurs de ces fimbriae participent à la virulence lors de l'infection. En effet, des anticorps contre *bcf*, *stb*, *tcf* et *csg* ont été retrouvés dans le sérum de patients atteints de la fièvre typhoïde (83). De plus, une mutation du fimbriae *stg* provoque une diminution dans l'adhésion aux cellules épithéliales lors d'essai *in vitro* (58). Finalement le fimbriae de type 1 est impliqué dans l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales (163). Un résumé des observations relatives aux fimbriae de *S. Typhi* ayant un rôle dans la virulence est présenté au Tableau II et la figure 9 détaille les organelles extracellulaires discutées dans cette étude.

**Tableau II : Systèmes d'adhésion de *S. Typhi* pour lesquels un rôle dans la virulence a été observé.** Adapté de (60)

| Structure de surface | Rôle dans la virulence  | Observé chez <i>S. Typhi</i> | Observé chez d'autres sérovars |
|----------------------|---|------------------------------|--------------------------------|
| Bcf et Stb           | Séroconversion  | Harris 2006; Hu 2009         |                                |
|                      | Persistance intestinal chez la souris                                 |                              | Weening 2005                   |
| Fim                  | Association au mannose, adhésion et invasion de cellules épithéliales | Satta 1993                   | Althouse 2003                  |
|                      | Biofilms  |                              | Boddicker 2002                 |
| Stg                  | Adhésion aux cellules épithéliales                                    | Forest 2007                  |                                |
| Sth                  | Infection prolongée chez la souris                                    |                              | Lawley 2006                    |
| Saf                  | Colonisation intestinale du porc,                                     |                              | Carnell 2007                   |
|                      | Infection prolongée chez la souris                                    |                              | Lawley 2006                    |
| Sef                  | Interactions avec les macrophages                                     |                              | Edwards 2000                   |
| Stc                  | Persistance intestinale chez la souris                                |                              | Weening 2005                   |
| Std                  | Se lie au $\alpha(1,2)$ fucose  |                              | Chessa 2009                    |
|                      | Persistance intestinale chez la souris                                |                              | Weening 2005                   |
| Tcf                  | Séroconversion  | Harris 2006                  |                                |
| Csg                  | Séroconversion  | Harris 2006                  |                                |
|                      | Biofilms  |                              | Ledeboer 2006                  |
| Pili de Type IVB     | Se lie à CFTR, invasion cellulaire                                    | Pan 2005; Pier 1998          |                                |
|                      | Auto-association bactérienne  | Morris 2003b                 | Morris 2003a                   |



**Figure 9: Structures de surface de *S. Typhi* discutées dans ce mémoire.** Les protéines d'adhésion sont représentées en jaune, les protéines membranaires en cyan et les protéines provenant de pseudogènes en bleu foncé. Les 12 membres de la famille CUP sont représentés selon des observations antérieures (162) ou selon des observations de leurs homologues chez *E. coli* K12 (105) ME : Membrane externe, PG : Peptidoglycane, MI : Membrane interne. Adapté de (60).

## 2.2. Régulation des fimbriae chez *S. Typhi*

La régulation des fimbriae de *S. Typhi* est peu connue. Cependant, *E. coli* et *S. Typhimurium* ont permis d'élucider certains mécanismes de régulation des fimbriae. *In vitro*, dans un bouillon LB, les fimbriae ne sont généralement pas exprimés (93, 123), à l'exception de l'opéron *fim* (93, 105). La régulation s'effectue à plusieurs niveaux. D'abord, les conditions environnementales peuvent influencer l'expression des fimbriae. La réponse aux stress environnementaux agit sur l'expression fimbriaire. Le facteur sigma de réponse générale au stress RpoS est un activateur de transcription de *csgD* (143). Le type de régulation le plus fréquemment observé s'effectue au niveau transcriptionnel et implique la liaison de protéines régulatrices dans la région promotrice des opérons. Les protéines régulatrices impliquées peuvent être retrouvées à proximité sur le génome tel que FimY-Z et W qui régulent tous les trois l'expression du fimbriae *fim*. D'une part, FimY et FimZ régulent positivement l'expression de *fimA* et d'autre part, FimW régule négativement l'expression du fimbriae *fim* (181, 182, 199). Certains régulateurs métaboliques sont également impliqués dans la régulation fimbriaire comme les protéines Lrp (« Leucine-responsive regulatory protein ») et Crp (« Cyclic AMP receptor ») (5, 128, 131).

La topologie de l'ADN peut aussi être un facteur qui influence l'expression des gènes. Certaines protéines contribuent au surenroulement de manière globale influençant ainsi l'expression de plusieurs gènes (144) et par conséquent les opérons fimbriaires (34). La gyrase et la topoisomérase I travaillent de manière divergente et peuvent tous les deux influencer la transcription des fimbriae (179). D'une manière plus spécifique, la topologie de l'ADN peut être modifiée localement et influencer la transcription d'un seul gène. Les

protéines H-NS, LeuO, IHF et Fis peuvent toutes influencer l'initiation de la transcription de l'ADN. Chez *E. coli* K12 et *S. Typhimurium*, H-NS est un régulateur négatif de plusieurs fimbriae (67, 105, 128). Un mutant H-NS chez *E. coli* K12 provoque l'expression de plusieurs fimbriae *in vitro* dans un milieu LB (105). La protéine LeuO peut interagir avec l'ADN dans les mêmes régions que la protéine H-NS prévenant ainsi l'action inhibitrice d'H-NS et permettant la transcription des gènes inhibés par H-NS (175). Ce mécanisme a déjà été observé chez *S. Typhi* mais, pour l'instant, aucune étude ne démontre que LeuO est un anti-inhibiteur direct de la transcription des fimbriae. La protéine IHF est un régulateur positif de l'expression des fimbriae. Elle peut provoquer un changement de topologie de l'ADN de manière à empêcher la liaison de H-NS ce qui favorise la liaison avec l'ARN polymérase (34, 67, 142). Finalement, Fis peut interagir avec l'ADN et agit parfois en tant que répresseur et d'autres fois en tant qu'activateur. Il est un répresseur de l'expression fimbriaire, mais un activateur nécessaire pour la formation de biofilms (73, 161, 170).

La variation de phase est aussi une méthode de régulation qui permet aux cellules d'alterner entre un état fimbriaire et afimbriaire. Chez *E. coli*, la transcription de l'opéron *fim* dépend de l'orientation du promoteur de *fimA* (52). Des recombinaisons site spécifique propre à l'opéron *fim*, FimB et FimE, peuvent inverser le promoteur de *fimA* grâce à deux séquences reconnues de 9pb inversées, situées en amont et en aval du promoteur de *fimA* (64, 99, 101).

La méthylation de l'ADN est également impliquée dans la régulation des fimbriae. Ce phénomène a d'ailleurs été démontré pour les fimbriae *pap* chez *E. coli* ainsi que *pef* et *std* chez *S. Typhimurium* (7, 18, 138). Le second messager, diGMP cyclique, est aussi impliqué dans la régulation de certains fimbriae. Chez *Salmonella* et *E. coli*, on observe que



l'expression des fimbriae ainsi que la production de biofilms sont favorisés en présence d'une forte concentration de diGMPc (97, 174). Aussi, de l'inter-régulation entre les fimbriae *pap* et *fim* a été démontrée chez *E. coli*. Chez *E. coli*, PapB peut inhiber l'activité de FimB empêchant ainsi l'expression de l'opéron *fim* (88).

Récemment, la régulation au niveau post-transcriptionnel a aussi été démontrée pour le régulateur CsgD chez *E. coli*. De petits ARN (sRNA) peuvent se lier à l'extrémité 5' de l'ARMm de *csgD*. Jusqu'à maintenant, les sRNA OmrA, OmrB, GcvB, McaS et PrpA ont été identifiés en tant que répresseurs de la traduction de *csgD* (20, 89, 130, 180).

### **3. *Salmonella***

#### **3.1. Généralités sur les salmonelles**

Le nom du genre *Salmonella* fut attribué en 1900, en l'honneur du chercheur ayant fait la découverte de *S. Choleraesuis*, Daniel Elmer Salmon (21). Toutefois, la découverte de *S. Typhi* revient à Karl Joseph Eberth en 1880 (53). Les bactéries *Salmonella* font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bacilles à paroi Gram-négative et des anaérobies facultatives. Ce sont aussi des bactéries mobiles munies de flagelles péritriches. Les salmonelles sont classées parmi les bactéries mésophiles et neutrophiles puisque leur température de croissance optimale se situe à 37 °C et qu'elles prolifèrent mieux à pH situé entre 6 et 7. Cependant, elles peuvent croître à des températures allant de 6 à 47 °C ainsi qu'à des pH variant entre 4 et 9 (13, 53). La plupart des espèces de salmonelles sont phototrophes, mais *S. Typhi* est auxotrophe (53).

Elles peuvent être isolées chez plusieurs animaux, les humains et dans l'environnement (171). Chez l'hôte, les bactéries *Salmonella* peuvent causer des infections localisées et systémiques. Elles peuvent aussi coloniser certains hôtes de manière asymptomatique. Ce sont ces caractéristiques qui font des salmonelles un genre unique qui présente une immense diversité de niches écologiques (151).

Le genre *Salmonella* aurait divergé d'avec *E. coli* il y a environ 120 millions d'années, période qui coïncide avec l'apparition des mammifères (141). L'ADN génomique de *Salmonella* et d'*E. coli* partagent encore 80 % d'homologie (127). Cependant, l'acquisition, au fil de son évolution, de deux systèmes de sécrétion de type trois (SST3), d'un système de flagelle biphasique (Section 3.3.1.3. et 3.2.) et d'une capacité de colonisation des animaux à

sang chaud sont les principaux évènements qui ont contribué à faire diverger les salmonelles par rapport à *E. coli* et à diversifier le genre *Salmonella* et ses espèces (10, 12, 151).

### **3.2. Nomenclature de *Salmonella***

Pendant plusieurs années, la nomenclature des salmonelles était chaotique. D'abord classées selon les symptômes qu'elles provoquent chez l'hôte et ensuite selon le lieu de leur découverte. Plusieurs sérovars portent encore aujourd'hui le nom du lieu de leur découverte. Les salmonelles sont maintenant divisées en deux espèces, *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica* (23). Ces dernières sont divisées en différents sérovars selon trois antigènes de surface. Les antigènes O (somatique), H (flagelle) et Vi (capsule). Les antigènes O et H sont très variables et peuvent présenter des différences au sein d'une même espèce. Ce sont ces différences qui contribuent à définir les multiples sérovars.

L'antigène O est utilisé pour différencier plusieurs groupes d'entérobactéries. Il réfère aux structures de lipopolysaccharides (LPS) présentes à la surface des bactéries à Gram négatif. Ces LPS sont très immunogéniques et très divergents d'une espèce à l'autre. Lors de l'infection l'hôte développera des anticorps contre ces structures, mais afin d'évader au système immunitaire, la bactérie peut parfois modifier ses LPS. Les anticorps présents dans le sérum d'un patient provoqueront une agglutination si le sérum est mis en présence d'une bactérie du même sérovar que celle ayant préalablement infecté le patient. C'est donc une première ligne de sérotypage largement utilisée avec plusieurs entérobactéries.

L'antigène H réfère aux flagelles qui sont eux aussi des structures de surface très immunogéniques. Chez certains sérovars, les flagelles sont dits diphasiques (23). En effet, la bactérie possédera 2 gènes codant pour la sous-unité majeure du flagelle, la flagelline (*fliC* et *fliB*), mais n'en exprime qu'un seul à la fois. Dans une population certaines cellules expriment la phase 1 tandis que d'autres expriment la phase 2. C'est un autre exemple des nombreuses stratégies utilisées par les bactéries afin d'évader au système immunitaire. Toutefois, *S. Typhi* est monophasique et ne possède qu'un seul gène de flagelline, *fliC*.

L'antigène Vi, qui réfère à la capsule d'exopolysaccharides, est présent chez les sérovars Typhi et Paratyphi seulement. La capsule, sous le contrôle des locus *viaA* et *viaB*, est composée d'homopolymères linéaires d'acide  $\alpha(1\rightarrow4)$ -2 acetamido-3-*O*-acetyl-2-deoxy- $\alpha$ -D-galacturonique (85) et est sécrétée d'une manière fortement régulée (53, 185). La présence de cette capsule peut masquer la présence de l'antigène O. L'implication de la capsule Vi dans la virulence de *S. Typhi* est discutée à la section 3.3.1.2.

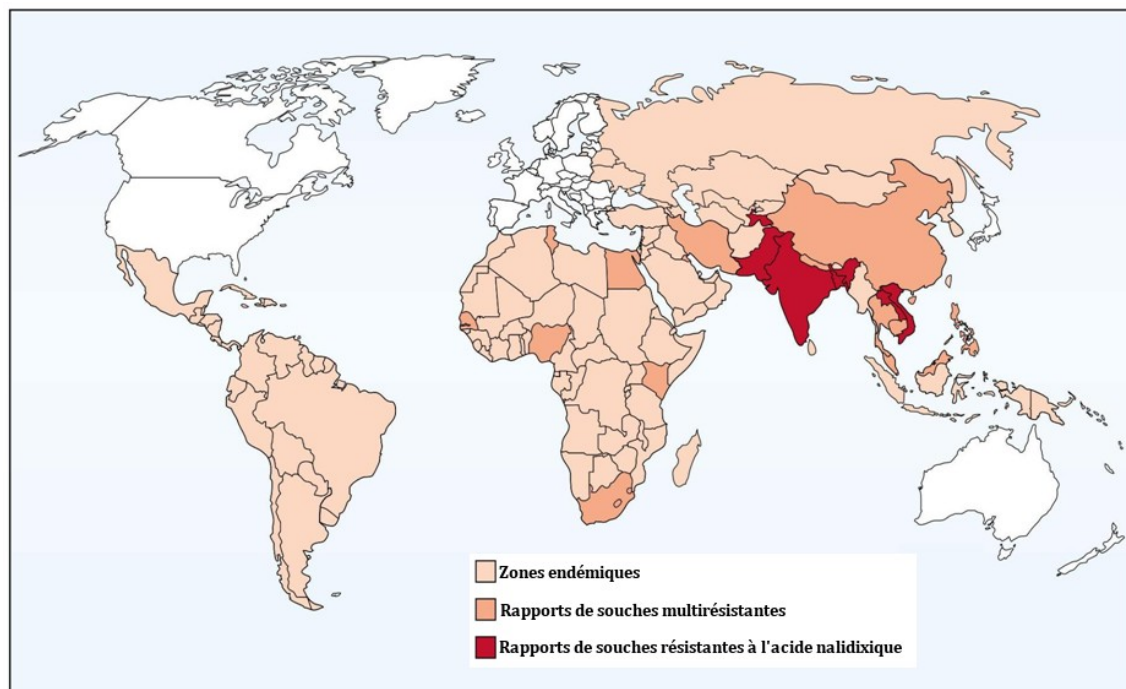
Selon ces trois antigènes, le genre *Salmonella* est maintenant divisé en deux espèces (*S. enterica* et *S. bongori*), mais l'émergence d'une nouvelle souche, *Salmonella subteranea* isolée en 2004, pourrait devenir une troisième espèce. L'espèce *S. enterica* est subdivisée en 6 sous-espèces (Tableau III). Ces différentes sous-espèces renferment plus de 2500 sérovars. *S. Typhi* fait partie des 1504 sérovars de la sous-espèce *enterica*. Son nom complet et officiel est maintenant *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sérovar Typhi.

**Tableau III : Nomenclature actuelle des espèces et sous-espèce de *Salmonella* associées aux nombre de sérovars répertoriés en 2002, adapté de (59, 150, 177) .**

| <b>Espèce</b>         | <b>Sous-espèce</b>       | <b>Nombre de sérovar répertoriés</b> |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| <i>S. enterica</i>    | subsp. <i>enterica</i>   | 1504                                 |
|                       | subsp. <i>salamae</i>    | 502                                  |
|                       | subsp. <i>arizonae</i>   | 95                                   |
|                       | subsp. <i>diarizonae</i> | 333                                  |
|                       | subsp. <i>houtenae</i>   | 72                                   |
|                       | subsp. <i>indica</i>     | 13                                   |
| <i>S. bongori</i>     |                          | 22                                   |
| <i>S. subterranea</i> |                          |                                      |

### 3.3. Infection par *S. Typhi*

Chez l'homme, *S. Typhi* est l'agent étiologique de la fièvre typhoïde. En 1986, la fièvre typhoïde était responsable de 16 millions de cas et 600 000 décès par année. Entre 1986 et 2004, l'accessibilité et la disponibilité d'antibiotiques de nouvelles générations ont permis de faire descendre le nombre de décès à 216 000. Cependant, le nombre de cas augmente toujours. Encore aujourd'hui, cette maladie touche plus de 21 millions de personnes par année dans le monde (39). Ce nombre de cas grandissant est dû, d'une part, aux nombreuses résistances aux antibiotiques acquises par diverses souches dans le monde (Fig. 10), mais aussi, à la voie d'infection difficilement contrôlable dans certains pays. En effet, les patient infectés par des souches résistantes seront plus difficiles à traiter et resteront porteurs plus longtemps, risquant ainsi d'infecter d'autres personnes. De plus, les infections à salmonellose s'acquièrent par la voie orale, elles peuvent donc être contractées en ingérant de l'eau ou des aliments qui ont été contaminés par une personne infectée.



**Figure 10 : Distribution global des souches de *S. Typhi* résistantes de 1990 à 2002.** Toutes les zones colorées sont des zones endémiques. Adapté de (32)

### 3.3.1. Pathogénèse et principaux facteurs de virulence de *S. Typhi*

*S. Typhi* possède plusieurs facteurs de virulence qui lui permettent de causer une infection systémique chez l'homme. Il est problématique d'étudier ces facteurs de virulence puisqu'il n'existe aucun bon modèle animal pouvant recréer les nombreuses conditions rencontrées par *S. Typhi* durant les différentes phases de l'infection chez l'homme. Beaucoup d'observations réalisées avec *S. Typhimurium* lors d'infection chez la souris et lors d'études *in vitro* ont permis d'identifier certains facteurs de virulence précieux pour *S. Typhi*. Les flagelles, la capsule, les deux SST3 ainsi que son arsenal de fimbriae en sont quelques exemples.

### 3.3.1.1. Ingestion

Afin de causer une infection, *S. Typhi* doit être ingérée par l'homme. Une des premières défenses de l'homme contre les pathogènes est l'acidité. Dans le système digestif, la bactérie peut résister au faible pH de l'estomac grâce à des systèmes de tolérance à l'acide (65). Aussi, certaines études tendent à démontrer que le fimbriae agrégatif curli pourrait contribuer, en autoagréant les cellules, à la résistance contre le pH acide (41). Ces mécanismes permettent aux bactéries d'atteindre en toute sécurité les muqueuses intestinales et en particulier le petit intestin.

### 3.3.1.2. Interactions hôte pathogène

Les flagelles contribuent à la virulence par plusieurs mécanismes. D'abord, l'interaction hôte pathogène est essentielle à l'initiation de l'infection et ces interactions se manifestent le plus souvent dans les muqueuses de l'hôte. La motilité, orientée par les propriétés chimiotactiques des flagelles, augmente les chances de contact entre les cellules de l'hôte et le pathogène dans ces muqueuses (152). Les flagelles semblent également jouer un rôle important dans l'adhérence aux cellules épithéliales de l'hôte. Ces phénomènes ont été observés notamment chez *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli* EPEC (72, 118, 178). Les flagelles d'*Yersinia enterocolitica* contribuent à son invasion dans les cellules épithéliales et peuvent jouer un rôle semblable au système de sécrétion de type trois (SST3) en sécrétant des facteurs de virulences dans le milieu extracellulaire (200, 201). Il semble que les flagelles de *S. Typhi* sont également impliqués dans l'invasion des cellules hôte. Un mutant pour le gène *fliC* perd ses capacités d'invasion des cellules épithéliales humaines *in vitro* (119, 196). Si les flagelles travaillent à augmenter les interactions, la capsule permet de les éviter. Le sérovar Typhi est un des rares à présenter une capsule

d'exopolysaccharides. En plus d'être utilisée comme facteur déterminant pour la nomenclature de *Salmonella*, cette capsule est importante pour la virulence (104). En permettant à *S. Typhi* d'éviter la phagocytose ainsi que l'opsonisation par les composants du complément, la capsule Vi s'avère un facteur de virulence très important dans la pathogenèse (106). La présence d'une capsule permet de camoufler le LPS présent à la surface, évitant ainsi la reconnaissance par le TLR4 et le dépôt des éléments C3 du complément (122) ce qui permet donc à *S. Typhi* d'éviter d'être éliminée par le système immunitaire (195). La capsule Vi est également importante pour la survie dans les macrophages (86), mais elle est régulée négativement de manière graduelle au fil de l'infection (40, 55, 95). Malgré les propriétés de protection conférées par la capsule Vi, elle diminue l'invasion des cellules épithéliales en masquant plusieurs organelles de surface telles que les SST3 (4, 205) et diverses adhésines dont les fimbriae.

### **3.3.1.3. Adhésion et Invasion**

L'adhésion aux cellules épithéliales est médiée par les fimbriae et notamment le fimbriae de type 1 *fim* qui se lie au  $\alpha$ -D-mannose (163). Même si *S. Typhi* possède plusieurs opérons fimbriaires dans son génome, jusqu'à maintenant seul le fimbriae de type 1 (*fim*) est a été observé (48, 78, 163). L'adhésion aux cellules de l'hôte est essentielle au processus d'invasion, mais cette étape pourrait aussi contribuer à amorcer tout le processus d'infection. Certains chercheurs qui travaillent sur *E. coli* UPEC et *Neisseria* ont démontré que le contact entre le fimbriae et son récepteur peut déclencher une réponse spécifique d'une part chez la cellule hôte, mais aussi chez la bactérie (1).



Ensuite, les salmonelles peuvent forcer leur entrée dans les cellules épithéliales, mais pénètrent préférentiellement par pinocytose dans les cellules M des plaques de Peyer (96, 103). Une théorie suggère que les bactéries pourraient aussi se laisser phagocyter par les cellules CD-18 positives (monocytes, macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques) afin de traverser la barrière de cellules épithéliales (82). Cette tactique permettrait à la bactérie d'atteindre la *lamina propria* sans causer de réaction inflammatoire importante. Pour provoquer son entrée dans les cellules épithéliales, *S. Typhi* modifie la paroi des cellules hôtes en injectant des effecteurs à l'intérieur de celles-ci en utilisant un premier système de sécrétion de type 3 (SST3-1). Les SST3 sont souvent décrits comme d'énormes aiguilles moléculaires traversant les deux parois de la bactérie et pouvant injecter des protéines dans la cellule hôte. *S. Typhi* injecte des protéines qui seront insérées dans la membrane interne de la cellule hôte. Ces protéines servent de canal dans la membrane interne de la cellule hôte et permettent le passage des effecteurs qui seront injectés par le SST3. Les salmonelles parviennent ainsi à injecter indirectement de multiples effecteurs dans le cytoplasme des cellules épithéliales du petit intestin (57). Le SST3-1 localisé sur le SPI-1 est essentiel à la virulence de *S. Typhi*. Les effecteurs introduits par le SST3-1 interagissent avec l'actine du cytosquelette et provoquent un réarrangement de la membrane qui englobera la bactérie afin de l'internaliser (62, 63). Le SST3-1 pourrait aussi être impliqué dans la phase systémique de l'infection (82, 117). Tous ces mécanismes d'entrée et de survie des bactéries *S. Typhi* dans les cellules épithéliales démontrent que ce passage à travers la barrière épithéliale est essentiel à l'initiation de l'infection. Les fimbriae, qui sont à l'origine de cette étape d'invasion, ont donc un rôle majeur dans la

pathogénèse de *S. Typhi*. Il est intéressant de souligner que presque tous les isolats cliniques de *S. Typhi* produisent le fimbriae de type 1 (*fim*) (133).

#### **3.3.1.4. Évasion du système immunitaire**

Ce qui caractérise *S. Typhi* est sa capacité à infecter les cellules épithéliales sans provoquer de réaction inflammatoire prononcée. La capsule régulée positivement lors de l'entrée dans les cellules épithéliales dissimule les LPS ainsi que la flagelline de *S. Typhi*, ce qui lui permet d'éviter d'être détectés par les TLR-4 et 5 (194). La cellule épithéliale infectée ne produira pas d'Il-8, ce qui ne déclenchera pas de réaction inflammatoire localisée à ce stade de l'infection. Le patient infecté par *S. Typhi* ne souffrira pas de diarrhée à ce stade. C'est en partie de qui permet à *S. Typhi* de provoquer une infection systémique.

#### **3.3.1.5. Survie et infection systémique**

Une fois dans la *lamina propria*, les bactéries seront internalisées par des cellules phagocytaires. Un deuxième SST3, localisé sur le SPI-2, est alors exprimé (SST3-2). C'est l'environnement rencontré par les bactéries dans les vacuoles contenant les salmonelles (« *Salmonella*-containing vacuole » SCV) qui provoquera l'expression du SST3-2. La faible concentration en magnésium et en phosphate ainsi que le pH acide des SCV provoque l'expression des gènes du SPI-2 et du SST3-2 (14, 33, 43). Ce dernier injectera des effecteurs visant à modifier la signalisation cellulaire des phagocytes et permettre la survie de *S. Typhi* dans les SVC (107, 192, 202). La survie dans les macrophages est essentielle à l'établissement de l'infection systémique (45). Elle permet aussi à la bactérie

d'atteindre les organes lymphoïdes secondaires, les ganglions lymphatiques, le foie et la rate, et de s'y multiplier (187). Une à deux semaines après l'ingestion de la bactérie, de grandes quantités de bactéries sont relâchées dans le sang et infectent le foie, la rate, la moelle osseuse, la vésicule biliaire et les plaques de Peyers (148). C'est à ce stade que les symptômes de la fièvre typhoïde apparaissent. Les patients atteints de fièvre typhoïde souffrent d'une forte fièvre, de léthargie ainsi que de maux de tête et de ventre (90). La colonisation de la vésicule biliaire produit le relargage de bactéries dans les selles, ce qui peut mener à des infections sévères. À ce stade, on note des perforations, des saignements intestinaux, des encéphalopathies et possiblement le décès (90).

### **3.3.2. Infections asymptomatiques**

*S. Typhi* infecte uniquement l'humain. Lorsqu'une personne est infectée par *S. Typhi*, traitée aux antibiotiques et guérie, il arrive qu'elle développe un état de porteur asymptomatique. Les porteurs asymptomatiques sont aujourd'hui le seul réservoir connu de *S. Typhi*. Cet état de patient asymptomatique est encore mal compris, mais se manifeste chez 1 à 5 % des cas, lorsque la bactérie *S. Typhi* persiste sous forme de biofilm dans la vésicule biliaire sans causer de symptôme au porteur (38, 115, 129). Il arrive aussi, dans 25 % des cas de porteurs asymptomatiques, que la personne infectée n'ait pas développé les symptômes caractéristiques de la phase d'infection aiguë (148). Chez le porteur asymptomatique, la bactérie est constamment relâchée dans l'urine et les selles en quantité assez important pour que celui-ci infecte une autre personne. Le porteur asymptomatique peut demeurer dans cet état pendant des dizaines d'années sans en avoir conscience (15, 172). Il est donc très difficile d'évaluer l'ampleur du réservoir humain de *S. Typhi*. Le

porteur asymptomatique est également plus à risque de développer un cancer de la vésicule biliaire (50, 109, 111). Il serait donc primordial de traiter les porteurs asymptomatiques afin d'éliminer le réservoir de *S. Typhi*, mais leur identification est pratiquement impossible.

Les biofilms produits par *S. Typhi* dans la vésicule biliaire se développent préférentiellement sur les calculs biliaires. Ainsi, la présence de ces calculs biliaires est un facteur prédisposant à l'état de porteur asymptomatique (38). Toutefois, suite à une ablation de la vésicule biliaire, certains porteurs excrètent encore la bactérie. Il y a donc d'autres organes possiblement impliqués chez un patient asymptomatique (74, 135). Dans la vésicule biliaire, la survie des bactéries dépend de la formation de biofilms. Ce biofilm contribue à protéger les bactéries contre tout stress environnant, antibiotiques, désinfectants et même le système immunitaire (26, 87). Les systèmes d'adhésion de surface sont impliqués dans la formation de biofilm. Les fimbriae sont un des principaux éléments utilisés lors de la formation de biofilms (19, 114). Le pilus de type IV joue aussi un rôle ainsi que le fimbriae agrégatif, curli (35). Certaines études démontrent aussi que les flagelles ont une fonction dans la formation de biofilms (37). Cependant, ces mécanismes ont été démontrés chez d'autres sérovars et doivent être confirmés chez *S. Typhi* avant qu'ils puissent devenir une cible thérapeutique.

## Problématique et objectifs

Le nombre de cas mondial de fièvre typhoïde ne cesse d'augmenter, et ce, malgré la disponibilité des antibiotiques et des vaccins. Cette augmentation perdure en raison de l'inépuisable développement de mécanismes de résistance par la bactérie. Les dernières années ont vu l'apparition de nombreuses souches multi-résistantes particulièrement en Asie du Sud-est (39). Dans ces conditions, il est primordial de s'attaquer au problème sous un angle différent soit en trouvant de nouvelles cibles, de nouveaux vaccins ou de nouvelles stratégies thérapeutiques contre *S. Typhi*. En ce sens, notre laboratoire travaille à démystifier les facteurs de virulence contribuant à l'établissement d'infections systémiques par *S. Typhi*. L'une des facettes de nos recherches contribue à caractériser les multiples systèmes d'adhésion utilisés par *S. Typhi* lors des différentes phases d'une infection systémique. Le répertoire de systèmes d'adhésion présents dans le génome de *S. Typhi* est spécifique à ce sérovar et pourrait être responsable du caractère particulier de la virulence de ce sérovar. Cependant, plusieurs opérons codant pour des systèmes d'adhésion sont réputés non-fonctionnels en raison de la présence de codon d'arrêt ou de changement de cadre de lecture. Toutefois, notre laboratoire a su démontrer que, dans le cas du système *stg*, un placier pseudogène n'empêche pas la synthèse du fimbriae *stg* ni même du placier *stgC* (59).

Ces résultats nous ont menés à l'hypothèse selon laquelle les systèmes d'adhésion de *S. Typhi* sont opérationnels et impliqués dans la virulence. Pour valider cette hypothèse, nous nous sommes fixé deux objectifs soit : observer les effets de la mutation de chacun

des 14 systèmes d'adhésion et évaluer le profil d'expression de chacun des systèmes afin d'ultimement définir le rôle des fimbriae chez *S. Typhi*.

Afin d'atteindre ces objectifs, les quatorze systèmes d'adhésion ont été supprimés du génome de la souche ISP1820 en utilisant une méthode de mutagénèse par échange allélique. Des mutants individuels ainsi qu'une souche totalement dépourvue de système d'adhésion ont été produits. Afin de révéler l'effet des mutations, les quinze mutants ont été soumis à des tests d'adhésion et d'invasion sur des cultures de cellules épithéliales ainsi qu'à des tests de phagocytose et de survie sur des cultures de macrophages humains. Les mutants ont aussi été soumis à des tests de mobilité. La souche afimbriaire a été soumise à un test d'adhésion et d'invasion en compétition avec la souche sauvage. *S. Typhi* a été cultivée dans différentes conditions de croissance *in vitro* ou en présence de cellules épithéliales et le profil d'expression de chaque opéron a été observé par RT-PCR. Les résultats sont présentés au chapitre 4 et ouvrent la voie à plusieurs perspectives de recherche.

## Matériel et Méthodes

### 1. Souches et plasmides utilisées

Les souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude sont listés dans le Tableau IV. Les souches bactériennes étaient cultivées de routine sur des géloses Luria-Bertani (LB) ou dans des bouillons LB sauf indications contraire. Les souches étaient toujours incubées à 37 °C. Selon l'expérience, les cultures liquides étaient incubées avec ou sans agitation. Si nécessaire, les milieux étaient supplémentés avec des antibiotiques en respectant les concentrations suivantes : ampicilline (Ap) 50 µg/ml, kanamycine (Kan) 50 µg/ml, chloramphénicol (Cm) 34 µg/ml, acide nalidixique (Nal) 50 µg/ml. Pour la souche *E. coli*  $\chi$ 7213, dépourvue du gène *asd*, l'acide DL- $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélique (DAP) était ajouté aux milieux de culture à une concentration de 50 µg/ml.

La souche ISP1820 utilisée lors de cette étude fut d'abord isolée au Chili et ne possède pas de résistance aux antibiotiques ce qui en fait un bon outil d'étude. Il s'agit d'une des souches les plus largement caractérisées malgré qu'elle ne soit pas encore séquencée. Pour cette raison, toutes les amorces ont été construites à partir de la séquence de la souche CT18. Les listes d'amorces utilisées dans cette étude sont présentées en annexe.

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

| Souche/plasmide  | Génotype   | Utilisation<br>Résistance | Référence                 |
|--|--|---------------------------|---------------------------|
| <b>Souches d'<i>Escherichia coli</i></b>                   |  |                           |                           |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$                                | <i>supE 44 hsdR 17 recA 1 endA 1 gyrA 96 thi -1 relA 1</i>   | Transformation            | Hanahan 1983 <sup>a</sup> |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir                  | <i>supE 44 hsdR 17 recA 1 endA 1 gyrA 96 thi -1 relA 1</i> $\lambda$ pir   | Conjugaison               | Invitrogen                |
| <i>E. coli</i> $\chi$ 7213                                 | Sm10 $\lambda$ pir <i>asd thi thr leu tonA lacY supE recA</i> RP4 2-Tc<br>::Mu[ $\lambda$ pir] $\Delta$ asdA4  | Conjugaison<br>(Hfr)      | Kaniga 1998 <sup>b</sup>  |
| <b>Souches de <i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi</b> |  |                           |                           |
| <i>S. Typhi</i> ISP1820                                    | Sauvage  |                           | R. Curtis III             |
| DEF 004  | ISP1820 $\Delta$ stg   |                           | Cette étude               |
| DEF 044  | ISP1820 $\Delta$ sta   | Kan                       | Cette étude               |
| DEF 084  | ISP1820 $\Delta$ saf   |                           | Cette étude               |
| DEF 154  | ISP1820 $\Delta$ fim   |                           | Cette étude               |
| DEF 441  | ISP1820 $\Delta$ tcf   |                           | Cette étude               |
| DEF 510  | ISP1820 $\Delta$ csg   |                           | Cette étude               |
| DEF 563  | ISP1820 $\Delta$ bcf   |                           | Cette étude               |
| DEF 564  | ISP1820 $\Delta$ stb   |                           | Cette étude               |
| DEF 602  | ISP1820 $\Delta$ stc   |                           | Cette étude               |
| DEF 600  | ISP1820 $\Delta$ std   |                           | Cette étude               |
| DEF 603  | ISP1820 $\Delta$ ste   |                           | Cette étude               |
| DEF 605  | ISP1820 $\Delta$ sef   |                           | Cette étude               |
| DEF 621  | ISP1820 $\Delta$ sth   |                           | Cette étude               |
| DEF 623  | ISP1820 $\Delta$ pil   |                           | Cette étude               |
| DEF 664  | ISP1820 $\Delta$ stg, $\Delta$ sta, $\Delta$ saf, $\Delta$ fim, $\Delta$ tcf, $\Delta$ csg, $\Delta$ bcf, $\Delta$ stb, $\Delta$ stc,<br>$\Delta$ std, $\Delta$ ste, $\Delta$ sef, $\Delta$ sth, $\Delta$ pil ( <b><math>\Delta</math>14</b> )   | Kan                       | Cette étude               |
| DEF 665  | ISP1820 $\Delta$ stg, $\Delta$ sta, $\Delta$ saf, $\Delta$ fim, $\Delta$ tcf, $\Delta$ csg, $\Delta$ bcf, $\Delta$ stb, $\Delta$ stc,<br>$\Delta$ std, $\Delta$ ste, $\Delta$ sef, $\Delta$ sth, $\Delta$ pil, $\Delta$ fli C ( <b><math>\Delta</math>14<math>\Delta</math>fliC</b> )  | Kan                       | Cette étude               |
| DEF 666  | ISP1820 $\Delta$ stg, $\Delta$ sta, $\Delta$ saf, $\Delta$ fim, $\Delta$ tcf, $\Delta$ csg, $\Delta$ bcf, $\Delta$ stb, $\Delta$ stc,<br>$\Delta$ std, $\Delta$ ste, $\Delta$ sef, $\Delta$ sth, $\Delta$ pil, $\Delta$ fli C, $\Delta$ tviB ( <b><math>\Delta</math>14<math>\Delta</math>fliC <math>\Delta</math>tviB</b> ) | Kan                       | Cette étude               |
| DEF 676  | ISP1820 $\Delta$ stg, $\Delta$ sta, $\Delta$ saf, $\Delta$ fim, $\Delta$ tcf, $\Delta$ csg, $\Delta$ bcf, $\Delta$ stb, $\Delta$ stc,<br>$\Delta$ std, $\Delta$ ste, $\Delta$ sef, $\Delta$ sth, $\Delta$ pil, $\Delta$ tvi B ( <b><math>\Delta</math>14<math>\Delta</math>tviB</b> )  | Kan                       | Cette étude               |
| DEF755   | ISP1820 $\Delta$ araBAD  |                           | Cette étude               |
| DEF757   | ISP1820 $\Delta$ stg, $\Delta$ sta, $\Delta$ saf, $\Delta$ fim, $\Delta$ tcf, $\Delta$ csg, $\Delta$ bcf, $\Delta$ stb, $\Delta$ stc,<br>$\Delta$ std, $\Delta$ ste, $\Delta$ sef, $\Delta$ sth, $\Delta$ pil, $\Delta$ araBAD ( <b><math>\Delta</math>14<math>\Delta</math>araBAD</b> )                                     |                           | Cette étude               |
| DEF571   | ISP1820 $\Delta$ fliCD   |                           | Sabbagh 2012 <sup>c</sup> |
| <b>Plasmides</b>   |  |                           |                           |
| pMEG375  | <i>sac</i> RB, <i>mob</i> RP4, <i>ori</i> R6K, vecteur suicide   | Cm                        | Megan Health              |
| pWSK29   | Vecteur de clonage à faible copie  | Ap                        | Wang 1991 <sup>d</sup>    |
| pBAD24   | Vecteur inductible à l'arabinose   | Ap                        | Guzman 1995 <sup>e</sup>  |

a : (81), b : (98), c : (159), d : (191), e : (75)

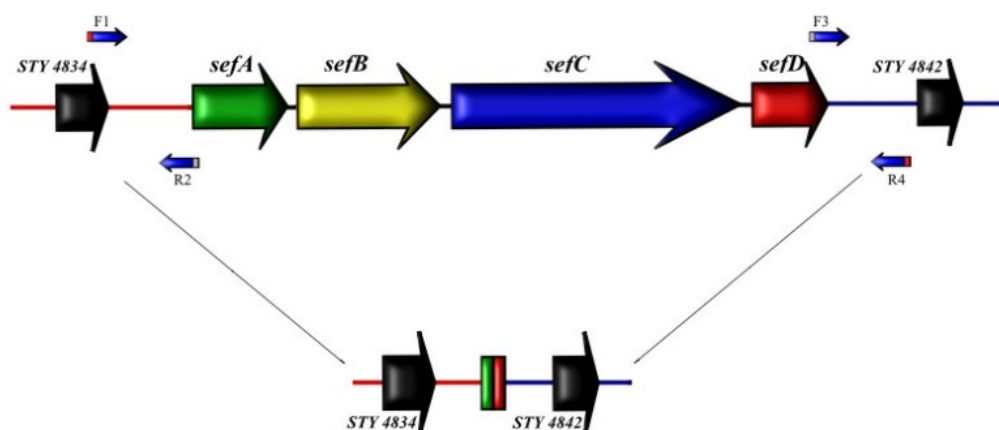


## 2. Mutagenèse par la méthode d'échange allélique

Dans le but d'étudier les fonctions des systèmes d'adhésion de *S. Typhi*, ils ont tous été délétés du chromosome de la bactérie ISP1820. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de mutagenèse par échange allélique. Cette méthode consiste à enlever l'opéron de façon non-polaire, c'est-à-dire que la délétion ne causera aucune modification à l'expression des gènes environnants.

### 2.1. Construction d'un opéron tronqué

Les portions 5' et 3' des opérons ont été amplifiées par PCR en utilisant les amorces F1-R2 ainsi que F3-R4 (Fig. 11). Une troisième PCR fait avec les amorces F1 et R4 sur l'ADN des amplicons nous permet, grâce à la zone de chevauchement, d'obtenir un fragment d'ADN correspondant au gène tronqué. Ce fragment d'ADN qui contient seulement les portions 5' et 3', peut être cloné dans un plasmide grâce au site de restriction qui ont été ajoutés par les amorces F1 et R4 (Fig. 11).



**Figure 11 : Représentation schématique de la construction d'un opéron tronqué.** Les petites flèches bleues représentent les amorces utilisées pour l'amplification. Sur ces petites flèches bleues, la portion rouge représente un site de restriction et la portion grise représente la zone de chevauchement.

## 2.2. Insertion dans un plasmide suicide

Le plasmide utilisé est pMEG375 (Tableau IV). Ce plasmide possède des gènes de mobilisation permettant la conjugaison, il possède une origine de répllication qui nécessite la protéine Pir pour se répliquer et le gène *sacB* qui rend la croissance toxique en présence de sucrose et un gène de résistance au chloramphénicol (Cm). Au départ, la répllication du plasmide est supporté par la souche *E.coli* DH5 $\alpha$   $\lambda$  *pir*.

## 2.3. Extraction plasmidique

L'extraction plasmidique est réalisée à l'aide d'une trousse d'extraction (QIAPrep Spin Miniprep Kit de QIAGEN). La souche supportant le plasmide est inoculée dans un bouillon de 5 ml de LB contenant du Cm et incubée à 37°C avec agitation pendant environ 18 h. Le bouillon est centrifugé à 13 000 rpm pendant 30 secondes afin de culoter toutes les bactéries, puis le protocole de QIAGEN est respecté en utilisant les tampons et colonnes associées.

## 2.4. Digestion et ligation

Le fragment d'ADN correspondant à l'allèle muté de l'opéron (section 2.1) ainsi que le plasmide pMEG375 sont digérés par des enzymes de restrictions (différentes selon l'opéron). La digestion est réalisée à 37 °C pendant 2 h avec des enzymes du New England Biolabs (NEB). Après purification, les deux fragments d'ADN (plasmide et insert digérés) sont incubés ensemble en présence de T4 DNA Ligase (Enzyme du phage T4, NEB) à 16 °C pour une durée d'environ 18 h. La ligase est une enzyme qui catalyse la formation de nouveaux liens phosphodiester entre l'extrémité 5' phosphate et 3' hydroxyle. Elle permet ainsi de lier deux fragments d'ADN ensemble, cohésif ou non.

## 2.5. Transformation d'ADN

Le plasmide ainsi refermé, est inséré dans la souche *E.coli*  $\chi$ 7213 (Tableau IV) à l'aide d'une transformation par choc thermique. Les bactéries préalablement traitées et ressuspendues dans du chlorure de calcium à base de manganèse (CCMB) sont laissées sur glace en présence du plasmide ligué, incubées à 42 °C pour 90 secondes et remis sur glace pour 2 minutes. Ensuite, elles sont incubées dans un bouillon LB à 37 °C avec agitation pour une période d'environ 1 h 30. Cette période d'incubation permet à la bactérie de se répliquer et d'exprimer les gènes de résistance du plasmide (Cm). Ceux-ci sont nécessaires puisque les cellules transformées sont ensuite étalées sur des géloses LB contenant du Cm et du DAP. La souche *E. coli*  $\chi$ 7213 possède une mutation dans le gène *asd*. La complémentation par le DAP est donc essentielle à sa croissance. Les transformants obtenus sont testés par PCR afin d'identifier les clones ayant reçu le pMEG375 avec l'opéron fimbriaire tronqué. La réaction PCR est réalisée en utilisant une amorce pMEG375-F qui reconnaît le plasmide et l'amorce R4 qui reconnaît le fragment tronqué de l'opéron fimbriaire.

## 2.6. Conjugaison bactérienne

La souche d'*E. coli*  $\chi$ 7213 utilisée possède le système RP4 dans son génome et permet une haute fréquence de recombinaison (Hfr). Ensemble, ces deux outils permettent une conjugaison efficace entre *E. coli* (pMEG375) et *S. Typhi*. La conjugaison est effectuée en milieu solide/liquide. Les souches donneuses (*E. coli*) et receveuses (*S. Typhi*) sont incubées en bouillon LB (avec DAP dans le cas d'*E.coli*) à 37 °C sans agitation pour environ 16 h. Les cultures sont concentrées par centrifugation puis les deux bouillons concentrés sont déposés en gouttes successives sur le centre d'une gélose LB-DAP de manière à

superposer les deux cultures. Ces géloses sont incubées à 37 °C pour environ 4-6 h. Les cellules bactériennes sont récoltées, diluées puis étalées sur géloses LB-Cm. L'absence de DAP élimine la souche donneuse et la présence de Cm permet d'obtenir des colonies de *S. Typhi* ayant reçues le plasmide pMEG375 avec l'opéron fimbriaire tronqué.

Après la conjugaison, les différents conjugants sont soumis à une contre sélection par le sucrose afin d'isoler les souches ayant fait les deux recombinaisons nécessaires à insérer l'opéron tronqué et éliminer l'opéron sauvage. Aussi cette contre-sélection permet de choisir les souches ayant perdues le plasmide. Ces souches seront maintenant mutantes pour l'opéron fimbriaire choisi et sensible au Cm. Cette méthode se nomme échange allélique puisqu'elle permet un échange entre l'opéron mutant et l'opéron sauvage.

### **3. Construction des souches complémentées**

Lorsqu'un mutant est construit, afin de confirmer que les phénotypes observés sont dus à la mutation, il est pertinent de construire une souche ou cette mutation est complémentée par une copie intacte du gène. Pour ce faire, le gène en question est inséré dans un vecteur à faible niveau de copies et celui-ci est transformé dans la souche mutante. Si, de cette façon, le phénotype est éliminé, il est possible de conclure que les effets observés étaient effectivement attribuables à l'absence du gène à l'étude. En pratique, le gène est amplifié par réaction de PCR en utilisant les amorces externes F1 et R4 ayant également servi à construire le fragment tronqué. Cependant, cette fois-ci, puisque seules les amorces F1 et R4 sont utilisées l'opéron complet sera amplifié. Le fragment obtenu est ensuite digéré avec les mêmes enzymes de restriction que celles ayant servi à construire le mutant (puisque le site de restriction est inséré à la suite de l'amorce en faisant la PCR).

Parallèlement, le vecteur pWSK29 est extrait de souche *E.coli* DH5 $\alpha$  suivant les mêmes étapes que lors de l'extraction plasmidique de la section 2.3. Ce plasmide est un vecteur à faible nombre de copies, qui ne s'intègre pas dans le chromosome bactérien. Ces caractéristiques permettent une expression sous le contrôle du promoteur natif de l'opéron. Aussi, le plasmide possède le gène de résistance à l'ampicilline (Ap) permettant de retracer les cellules complémentées. Le plasmide et l'opéron intact seront digérés et ligés suivant les mêmes étapes qu'à la section 2.4. Une fois refermé, le plasmide contenant l'opéron complet pourra être introduit dans la souche *E. coli* DH5 $\alpha$  par transformation d'ADN tel que décrit dans la section 2.4. Le vecteur sera répliqué par cette souche puis extrait (voir section 2.3) et introduit dans la souche mutante de *S. Typhi* par électroporation.

#### **4. Électroporation de *S. Typhi***

Les cellules mutantes de *S. Typhi* ont été inoculées dans un bouillon de 5ml de LB et incubées à 37 °C avec agitation pour une période d'environ 18 h. Un ml du bouillon bactérien a été centrifugé pendant 2 minutes à 8000 rpm. Le surnageant a été jeté et les bactéries ont été resuspendues dans 1 ml de glycérol 10 %. La centrifugation et le lavage des cellules au glycérol 10 % ont été répétés 3 autres fois afin d'éliminer toute trace de sels dans le milieu contenant les bactéries. Une fois la dernière centrifugation terminée, les bactéries ont été resuspendues dans 40  $\mu$ l de glycérol 10 %. Environ 100 ng (2  $\mu$ l) de plasmide pWSK29 avec l'opéron intact est mélangé dans les cellules bactériennes traitées puis le mélange est laissé sur glace 2 min. Ce volume a ensuite été déposé dans une cuvette à électroporation puis celle-ci est insérée dans l'électroporateur qui produit un courant de

2,5 V a travers le liquide dans la cuvette. Le contenu de la cuvette est mélangé à 900  $\mu$ l de bouillon LB puis incubé à 37 °C avec agitation pour environ 1 h 30. Ensuite, le bouillon est dilué et étalé sur des géloses LB-Ap afin d'éliminer les bactéries n'ayant pas inséré le plasmide. L'opéron présent sur le plasmide viendra ainsi compléter la mutation sur le chromosome.

## 5. Courbe de croissance

Afin de s'assurer que les mutations ayant supprimé tous les systèmes d'adhésion connus dans le génome de la souche *S.Typhi* ISP1820 n'affectent pas la croissance de celle-ci, une courbe de croissance fut réalisée.

La souche *S.Typhi* ainsi que la souche *S.Typhi* mutante afimbriaire ( $\Delta$ 14) (DEF664) sont striées sur gélose LB puis incubées pour une période d'environ 18 h à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées. Des bouillons de 5 ml de LB sont inoculés avec une colonie de *S. Typhi* ou avec une colonie de la souche mutante. Les bouillons sont incubés à 37 °C avec agitation pour une période d'environ 18 h. Par la suite, 30  $\mu$ l de chacun de ces bouillons est transféré dans 3 ml de bouillon LB dans des tubes 13X100 (dilution de 1:100). La densité optique (D.O.) des tubes de 3 ml est mesurée et considérée comme étant le temps 0 (T0). Les tubes sont ensuite remis à 37 °C avec agitation et la D.O. est mesurée chaque heure pendant 8 h d'incubation (T8) puis une dernière fois après 24 h d'incubation (T24).

La donnée D.O. est mesurée avec un spectrophotomètre calibré à 600 nm selon la densité optique du LB non inoculé (blanc). Les tubes 13X100 sont insérés directement dans le lecteur optique puis replacés dans l'incubateur à 37 °C. Cette méthode n'affecte pas

la croissance des souches puisqu'aucune quantité de bouillon n'est retirée du tube pour mesurer la D.O. Trois réplicats biologiques ont été effectués.

## **6. Tests d'adhésion et d'invasion dans les cellules épithéliales INT-407**

Les fimbriae sont connus pour leurs fonctions adhésives. Afin d'étudier l'importance de chaque fimbriae lors de l'infection chez l'hôte, des tests d'adhésion et d'invasion dans des cellules épithéliales humaines ont été réalisés avec tous les mutants.

Les cellules utilisées sont des INT407, cultivées dans un milieu Eagle's minimal essential medium (EMEM) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé à la chaleur et de 25mM d'acide N-2-hydroxyéthyl piperazine-N -2-ethanesulfonique (HEPES). Elles sont divisées de façon hebdomadaire dans une flasque de 75 cm<sup>2</sup> à raison de 5X10<sup>5</sup> cellules par flasque et maintenues à 37 °C sous une atmosphère de 5 % de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Tous les milieux et tampons utilisés sont préalablement chauffés à 37 °C. Lors des tests, les cellules étaient distribuées dans des plaques 24 puits à raison de 2X10<sup>5</sup> cellules par puits et incubées à 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> pour 24 heures. Le jour de l'infection, une heure avant l'infection, les cellules sont lavées avec du tampon phosphate salin (phosphate buffered saline, PBS) (Chlorure de sodium 8g/L, phosphate de potassium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.2g/L, phosphate d'ammonium 2.17g/L, et chlorure de potassium 0.2g/L ajusté à pH 7.4) afin d'éliminer les cellules mortes ou non adhérentes et également pour retirer un mucus qui se serait développé à la surface des cellules épithéliales et qui risquerait d'augmenter les résultats d'adhésion alors que celle-ci ne serait pas due à la présence de fimbriae. Ensuite, les cellules sont ré-incubées avec du EMEM complémenté jusqu'à l'ajout de bactéries.

Les souches de *S.Typhi* ont été incubées pour une période d'environ 16 h à 37 °C avec agitation dans un bouillon LB. Elles ont ensuite été diluées 100X dans un bouillon LB-NaCl 0.3M puis remis à 37 °C avec agitation jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase de croissance logarithmique soit, une D.O. d'environ 0,5 à une longueur d'onde de 600 nm. Elles sont ensuite mises en contact avec les cellules épithéliales à une multiplicité d'infection (MOI) de 20 pour 1. Le volume de culture bactérienne à inoculer dans chaque puits afin d'obtenir la bonne MOI est calculé à partir de la densité optique et de courbe de croissance en unité formatrice de colonie (UFC) effectuées préalablement.

Les plaques de cellules infectées sont centrifugées à 800 g pendant 5 minutes puis incubées à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Après 90 minutes d'incubation (T90), les cellules sont lavées trois fois avec du PBS afin d'éliminer les bactéries n'ayant pas adhérentes aux cellules épithéliales. Du milieu EMEM supplémenté à la gentamicine (100mg/ml) est ajouté aux puits de cellules servant au test d'invasion puis ils sont réincubés pour 90 minutes (T180). Dans les puits servant à tester l'adhésion, du détergent, PBS-acide déoxycholique 0.1% (PBS-DOC) est ajouté. Ce tampon fait éclater les cellules eucaryotes seulement, ce qui permet de récolter les bactéries ayant adhérentes aux cellules épithéliales. Le contenu des puits sera récolté, dilué puis étalé sur des géloses LB afin d'estimer le taux d'adhésion des différents mutants par rapport à la souche sauvage. Les cellules des puits du T180 seront aussi lavées trois fois au PBS, lysées au PBS-DOC 0.1%, récoltées, diluées puis étalées sur géloses LB. Ceci permettra d'estimer le taux d'invasion des différents mutants par rapport à la souche sauvage.

Les taux d'adhésion et d'invasion sont calculés en dénombrant les UFC sur les différentes géloses LB ayant été incubées environ 18 h à 37 °C. Au T90, ce taux correspond



au nombre d'UFC divisé par le nombre d'UFC initialement présentent dans le puits. Au T180, le taux d'invasion correspond au nombre d'UFC divisé par le nombre d'UFC dénombré au T90. Au chapitre 4, les résultats sont présentés en taux par rapport à la souche sauvage normalisée à 100%. (Ex : Taux WT = Taux adhérence WT/Taux adhérence WT et Taux  $\Delta$  = Taux adhérence $\Delta$ /Taux adhérence WT)

### **6.1. Indice de compétition**

Lorsque les bactéries se retrouvent chez l'hôte, leur population est souvent très hétérogène. Certaines bactéries auront des avantages évolutifs leur procurant une virulence plus accrue. En laboratoire, la population est homogène diminuant ainsi la compétition entre chaque cellule bactérienne et le phénotype résultant de la mutation ne sera peut-être pas suffisamment marqué pour être observable. Afin d'exposer ces différences d'aptitude, il convient de soumettre les souches mutantes à un essai de compétition contre la souche sauvage (ISP1820 Nal<sup>R</sup>) lors d'une infection de cellules. Pour ce faire, les cultures sont préparées selon la même méthode que lors d'un test d'adhésion et d'invasion, mais, avant inoculation, elles sont mélangées de manière à obtenir un ratio 1:1 (UFC/ml) de souche mutante et de souche sauvage. Le test de compétition lors de l'infection est réalisé avec les mêmes cellules épithéliales INT-407 utilisées pour les tests d'adhésion et d'invasion. Ces dernières sont préparées de la même manière, mais la multiplicité d'infection est de 50 pour 1 comparativement à 20 pour 1 lors d'une infection sans compétition. L'indice de compétition est un ratio entre le taux de survie de la souche mutante et taux de survie de la souche sauvage tel que décrit dans (169).

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

Les cellules utilisées sont des monocytes humains THP-1 (ATCC #TIB-202), cultivées dans un milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé à la chaleur. Elles sont divisées de façon hebdomadaire dans une flasque de 75 cm<sup>2</sup> à raison de 5X10<sup>5</sup> cellules par flasque et maintenues à 37 °C sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>. Tous les milieux et tampons utilisés sont préalablement chauffés à 37 °C. Lors des tests, les cellules sont différenciées en macrophage par exposition au phorbol 12-myristat 13-acetate (PMA), puis distribuées dans des plaques 24 puits à raison de 5X10<sup>5</sup> cellules par puits et incubées à 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> pour 48 heures.

Les souches de *S. Typhi* ont été incubées pour une période d'environ 16 h à 37 °C sans agitation dans un bouillon LB. Elles sont ensuite mises en contact avec les macrophages à une MOI de 10 pour 1. Le volume de culture bactérienne à inoculer est calculé selon la même technique que lors des infections de cellules épithéliales. Les plaques de cellules infectées sont centrifugées à 800 g pendant 5 minutes puis incubées à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Après 20 minutes d'incubation (T0), les cellules sont lavées trois fois avec du PBS afin d'éliminer les bactéries n'ayant pas adhérees aux cellules épithéliales. Du RPMI supplémenté contenant de la gentamicine (100mg/ml) est ajouté aux puits de cellules servant au test de survie 2 h et 24 h, puis ils sont réincubés pour 2 heures (T2). Dans les puits servant à tester la phagocytose (T0), du PBS-DOC est ajouté. Le contenu des puits est récolté, dilué puis étalé sur des géloses LB afin d'estimer le taux de phagocytose des différents mutants par rapport à la souche sauvage. Les cellules des puits du T2 sont aussi

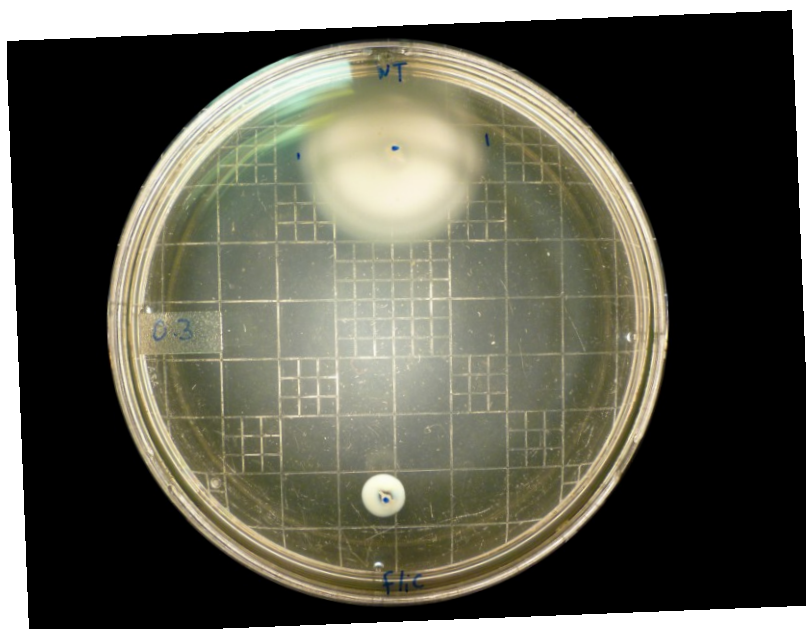
lavées trois fois au PBS, lysées au PBS-DOC 0.1 %, récoltées, diluées puis étalées sur géloses LB. Ceci permettra d'estimer le taux de survie après 2 heures des différents mutants par rapport à la souche sauvage. Les puits restants servent à mesurer le taux de survie dans les macrophages après 24 heures (T24). Dans ces puits, après les lavages du temps 2, on ajoute du RPMI supplémenté contenant de la gentamicine (12 mg/ml). Les cellules sont ensuite réincubées à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'au T24 ou elles seront lavées, traité au PBS-DOC, récoltées, diluées et étalées sur des géloses LB comme pour les autres temps.

Les taux de phagocytose (T0) et de survie (T24) sont calculés en dénombrant les UFC sur les différentes géloses LB ayant été incubées environ 18 h à 30 °C. Au T0, ce taux correspond au nombre d'UFC divisé par le nombre d'UFC initialement présentent dans le puits (UFC<sub>i</sub>). Au T24, le taux de survie correspond au nombre d'UFC divisé par le nombre d'UFC dénombré au T0. Au chapitre 4, les résultats sont présentés en taux par rapport à la souche sauvage normalisée à 100%. (Ex : Taux WT = Taux phago WT/Taux phago WT et Taux Δ = Taux phagoΔ/Taux phago WT)

## **8. Tests de mobilité**

Les cultures de souches mutantes et de souche sauvage étaient incubées environ 18 h à 37 °C dans 5 ml de bouillon LB avec agitation. Ensuite, elles étaient diluées 1:100 dans 5 ml de bouillon LB et réincubées à 37 °C avec agitation jusqu'à ce qu'elles atteignent une densité optique d'environ 0.5 (mesuré à 600 nm) correspondant à la phase logarithmique de croissance.

Pour mesurer la mobilité, des géloses de 25 ml de LB contenant 0,3 % d'agar (LB 0.3% d'agar) sont coulées et solidifiées sur une surface nivelée afin d'obtenir des géloses uniformes et à niveau. Elles sont ensuite séchées sous la hotte biologique pour 1 heure. Une fois les cultures en phase logarithmique, 6  $\mu$ l de culture, ce qui correspond à environ  $4,2 \times 10^6$  bactéries, est injecté à une profondeur d'environ 2-3 mm dans des géloses LB 0.3 % d'agar. Sur une même gélose, la souche sauvage et la souche mutante sont injectées. Les deux injections sont réparties de manière optimale afin d'être à égale distance des rebords de la gélose et les plus éloignées possible l'une de l'autre. Les géloses sont incubées à 30 °C non inversés pour 16 heures. Le diamètre de la croissance est mesuré et il permet de calculer un ratio de mobilité de la souche mutante par rapport à la souche sauvage. Aussi, il permet de comparer les différentes moyennes des distances de migration des mutants par rapport à la souche parentale.



**Figure 12. Test de Mobilité.** Les résultats des tests de mobilité sont la moyenne des diamètres mesurés sur une gélose 0,3% d'agar injectée par exemple avec ISP1820 sauvage (WT, contrôle positif) et ISP1820 $\Delta$ *fliC* (*fliC*, contrôle négatif) puis incubé 16 h à 30 °C en position non-inversée.

## 9. RT-PCR

La rétrotranscription-PCR (RT-PCR) est réalisée de la même manière qu'une PCR normale. La seule modification est l'utilisation d'ADNc provenant de bactéries ayant été cultivées dans des conditions de croissance spécifiques ou extraites d'une infection de cellules eucaryotes. Dans cette étude, toutes les souches ont été cultivées en milieux liquides. Pour les tests effectués en absence de cellules eucaryotes, les souches ont été inoculées dans un bouillon riche (LB) ou minimal (M63) supplémenté avec du NaCl ou du fer, puis incubées 16h avec ou sans agitation. Les bouillons M63 sont également supplémentés avec 1 mM de  $MgSO_4$ , 0.1% de casamino acides, 40  $\mu g/ml$  de tryptophane, 40  $\mu g/ml$  de cystéine et 0.6% (poids/vol) de glucose. Les bouillons M63 sont préparés en utilisant des ingrédients et récipients exempts de fer, cependant, aucun chélateur de fer n'a été utilisé. Pour ces raisons, ce milieu est considéré faible en fer. Le milieu riche en fer a été obtenu en ajoutant 100  $\mu M$  de  $FeCl_3$  dans ce milieu M63. Pour les tests effectués en présence de cellules eucaryotes, les souches ont été inoculées dans un bouillon LB-NaCl 0,3M puis incubées sans agitation pour 16h. Ensuite, les souches sont mises en contact avec les cellules eucaryotes dans un milieu EMEM. Les conditions spécifiques sont indiquées pour chaque résultat au chapitre 4

### 9.1. Extraction D'ARN

Au moment désiré, du Trizol (Invitrogen) est ajouté au culot bactérien de la phase de croissance choisie, et les lysats peuvent être conservés à  $-80\text{ }^{\circ}C$  jusqu'à l'extraction en suivant le protocole du fabricant. Au moment de l'extraction, les lysats sont dégelés à température ambiante puis 200  $\mu l$  de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont mélangés vigoureusement puis laissés au repos 2 minutes à température ambiante. Les tubes sont

ensuite centrifugés afin d'isoler la phase contenant l'ARN. L'ARN se retrouvera dans la phase aqueuse du mélange. La portion contenant l'ARN est ensuite transférée dans un autre tube pour être précipitée en y ajoutant de l'alcool isopropylique et incubé jusqu'au lendemain à -20 °C. L'ARN est précipité, lavé et resuspendu dans le l'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC). Cette eau est traitée afin qu'elle soit débarrassée de contaminants (ARNases) pouvant dégrader l'ARN.

### **9.2. Synthèse d'ADNc**

L'ARN est incubé 10 minutes à 70 °C en présence de 4 pmol d'amorce d'hexamères aléatoires. Les amorces pourront s'associer à toutes les séquences présentes dans le mélange, permettant ainsi la synthèse d'ADNc à l'aide de la reverse transcriptase.

### **9.3. RT-PCR**

La réaction de PCR réalisée par la suite est exécutée selon le protocole de la compagnie Feldan utilisant l'enzyme ADN polymérase de *Thermophilus aquaticus* (TAQ), le tampon et les dNTPs fournis par la compagnie Feldan. Une réaction de 40 cycles selon la température d'hybridation ( $T_m$ ) appropriée pour chaque amorce est ensuite réalisée. La visualisation se fait en migrant les produits PCR sur un gel d'agarose de 1,2 % contenant du bromure d'éthidium. Le gel est soumis à un courant de 100V pendant 40 minutes.

## 10. Biofilms

Il existe plusieurs méthodes afin de mesurer la production de biofilms produit en laboratoire. La plus classique est généralement réalisée en plaque de 96 puits. Cependant, cette méthode n'a pas permis la production de biofilms lorsque testée. La méthode utilisée afin de mesurer la production de biofilms est donc effectuée en tubes et est tirée de Crawford et al. 2008. Cependant, certaines modifications y ont été apportées. Tout d'abord, il convient d'utiliser des tubes eppendorf enrobés de silicone (Fisher) Ceux-ci sont ensuite traités afin que leur paroi interne soit recouverte de cholestérol. Le cholestérol (Sigma [5(6)-Cholesten-3 $\beta$ -o1] : C-7402) est dilué à une concentration de 10 mg/ml dans de l'éthyl éther anhydre (Fisher). L'éther pouvant dégrader la plupart des plastiques n'altère pas les tubes recouverts de silicone. Le mélange éther-cholestérol est déposé dans les tubes eppendorf siliconés à raison de 100  $\mu$ l par tube. L'éther étant très volatil s'évapore après environ 30 minutes. Les tubes sont laissés ouverts à température pièce dans une hotte chimique jusqu'à l'évaporation totale de l'éther (environ 45 minutes), laissant ainsi les tubes enduits d'une mince couche de cholestérol (environ 1 mg de cholestérol par tube). Les tubes peuvent ensuite être conservés jusqu'à utilisation. La veille de l'expérience, les cultures de *S. Typhi* (souche sauvage et souches mutantes) sont inoculées dans des bouillons de LB contenant 3 % de bile (SIGMA Bile Bovine (Ox gall powder) B-3883) (LB-Bile 3 %). Elles sont ensuite incubées pour environ 18 h à 37 °C avec agitation. Le jour de l'expérience, les cultures sont diluées 1 :50 dans un milieu LB-Bile 3% puis réincubées à 37 °C avec agitation jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase logarithmique de croissance, c'est-à-dire une D.O. de 0,600 à 600 nm. Cette étape nécessite environ 7 h puisque la croissance de *S. Typhi* est grandement retardée en bouillon LB-Bile 3%. Une fois

la phase exponentielle de croissance atteinte, les cultures sont déposées à raison de 100 µl par tube eppendorf enduit de cholestérol.

Ces tubes sont ensuite incubés avec agitation lente à température pièce pour 72 heures. Afin de mimer la « vidange » de la vésicule biliaire ainsi que de renouveler les nutriments apporter aux cultures, les tubes sont lavés 3 fois à toutes les 24 heures avec du LB-Bile 3 %, puis 100 µl de LB-Bile 3 % est redistribué dans chaque tube avant réincubation. Après une incubation de 72 heures (3 jours), les tubes sont encore une fois lavés 3 fois avec du LB-Bile 3 %. Ils sont ensuite laissés ouverts sous la flamme pour environ 5 minutes afin de sécher légèrement l'excès de LB-Bile et de fixer les biofilms. Ceux-ci sont colorés avec 200 µl de Crystal violet pendant 5 minutes. Par après, l'excédant de Crystal violet est lavé avec du PBS-1X jusqu'à ce que celui-ci soit clair (environ 4 à 5 lavages avec 500 µl de PBS-1X). Afin de relâcher le Crystal violet contenu dans les bactéries des biofilms, 500 µl d'acide acétique glaciale est ajouté dans le tube. Ce volume est ensuite transféré dans une cuvette à spectrophotomètre puis lu à 570 nm.

Puisque le LB-Bile 3 % est un milieu de culture très dense, beaucoup de sels s'accumulent sur la paroi du tube eppendorf recouvert de cholestérol et ceux-ci peuvent se colorer au Crystal violet. Afin que cette accumulation ne fausse pas les données mesurées par spectrophotométrie, un tube enduit de cholestérol et incubé en présence de LB-Bile 3 %, mais sans culture bactérienne, est incubé et lavé tout comme les tubes contenant des bactéries. Ce tube sert de contrôle ainsi que de « blanc » pour la lecture au spectrophotomètre. Ainsi, toutes les données présentées ont été prises par rapport à un tube recouvert de cholestérol incubé en présence de LB-Bile 3 %, mais en absence de bactéries.



## 11. Western blot

Les souches utilisées pour mesurer la surexpression de l'opéron *stg* sont des souches de *S. Typhi* ISP1820 qui contiennent le vecteur inductible à l'arabinose pBAD24. Puisque la bactérie *S. Typhi* peut internaliser et métaboliser l'arabinose nous avons supprimé les gènes *araBAD*, nécessaires à la métabolisation, afin que toutes les molécules d'arabinose internalisées par la cellule soient disponibles pour l'induction du vecteur. Aussi, l'opéron *stgTAT* est inséré dans le vecteur pBAD24 et placé sous le contrôle du promoteur inductible. L'opéron *stgTAT* est réparé, c'est-à-dire qu'un codon TAT remplace le codon stop TAA présent dans le placier *stgC*. Une fois les cultures induites, les protéines de surface sont extraites et la présence de StgD à la surface des bactéries peut être révélée par Western blot.

Au total, huit souches ont été construites et testées par Western blot. Les caractéristiques de ces huit souches sont présentées dans le Tableau V.

**Tableau V : Caractéristiques des souches de *S. Typhi* utilisées lors des tests de surexpression des fimbriae**

| Souche  | Mutations                  | Plasmide             |
|---------|----------------------------|----------------------|
| ISP1820 | Aucune                     | pBAD24               |
| ISP1820 | Aucune                     | pBAD24 <i>stgTAT</i> |
| ISP1820 | $\Delta stg$               | pBAD24               |
| ISP1820 | $\Delta stg$               | pBAD24 <i>stgTAT</i> |
| ISP1820 | $\Delta araBAD$            | pBAD24               |
| ISP1820 | $\Delta araBAD$            | pBAD24 <i>stgTAT</i> |
| ISP1820 | $\Delta 14, \Delta araBAD$ | pBAD24               |
| ISP1820 | $\Delta 14, \Delta araBAD$ | pBAD24 <i>stgTAT</i> |

### **11.1. Surexpression de l'opéron *stg***

Afin d'induire les vecteurs pBAD24 à l'arabinose, les souches sont incubées dans des tubes à cultures de 5 ml de LB sans arabinose pour une durée d'environ 18 h à 37 °C avec agitation. Ensuite, la densité optique est ajustée à environ 0.600 nm dans un volume total de 5 ml de LB. Dans ce volume, l'arabinose est ajoutée à une concentration de 0.1% soit 25 µl d'une solution à 20 %. Les tubes sont incubés 1 h à 37 °C sans agitation pour éliminer les risques d'endommager les structures de surfaces.

### **11.2. Extraction des protéines du surnageant**

Suite à l'induction à l'arabinose, les cultures sont centrifugées à une vitesse de 5000 rpm puis resuspendues dans un volume de 3 ml de LB. Ces nouveaux tubes sont incubés à 65 °C pour 15 minutes. Les cultures sont ensuite centrifugées à une vitesse de 5000 rpm pour ainsi prélever 1,8 ml de surnageant. A ce volume, 200 µl d'acide trichloroacétique (TCA), donc une concentration de 10 %, est ajouté puis les tubes sont incubés à 4 °C pour environ 18h afin de précipiter les protéines en évitant leur dégradation.

Afin d'éliminer toute trace de TCA, les solutions précipitées sont centrifugées à 4 °C pour 15 minutes à 14 000 rpm puis laver dans une solution d'acétone à -20 °C. Cette étape est répétée 2 à 3 fois. Après le dernier lavage, les protéines du culot sont resuspendues et dénaturées dans 200 µl d'une solution de SDS *gel loading buffer* 2X puis incubé 5 minutes à 100 °C. Les protéines préparées ainsi peuvent être conservées à -20 °C jusqu'à utilisation.

### **11.3. Migration dans un gel de polyacrylamide**

Les différents extraits protéiques de surnageant sont ensuite migrés dans un gel de polyacrylamide de dimension 6 X 9 cm. Le gel contient deux sections. La première est moins concentrée en acrylamide, 5 %, et permet un bon alignement des protéines facilitant ainsi la migration. La deuxième, d'une concentration de 12 % d'acrylamide permet une migration assez rapide (1 h à 200 V.) des protéines dans tout le gel.

### **11.4. Transfert sur membrane de PVDF**

Une fois les protéines migrées dans le gel de polyacrylamide, celles-ci sont transférées sur une membrane de PVDF. Cette membrane est d'abord imbibée de méthanol puis hydratée 15 minutes dans la solution de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% v/v MeOH) Le gel de polyacrylamide et la membrane de PVDF sont placés entre deux feuilles de papier Watman et insérés dans un montage servant au transfert des protéines. Ce montage est immergé dans la solution de transfert dans laquelle un courant de 100 V permet aux protéines de se détacher du gel et de coller à la membrane.

### **11.5. Adhésion des anticorps aux sites spécifiques**

Une fois les protéines sur la membrane de PVDF, un blocage des sites protéiques non spécifiques est réalisé avec une solution de TBS-Tween 0.1 % contenant 5 % de lait. La membrane immergée dans cette solution est incubé environ 18 h sur une plaque rotative. Ensuite, l'anticorps primaire est ajouté à une concentration de 1/5000. Celui-ci reconnaît les protéines StgD de *S. Typhi*. La membrane est incubée 1 h sur une plaque rotative à

température pièce en présence de l'anticorps primaire. Ces anticorps proviennent d'un sérum de lapin et sont adsorbés à plusieurs protéines non spécifiques de *S. Typhi*. Suite à cette incubation l'anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à un réactif de *Horseradish Peroxidase* HRP (Ac secondaire *HRP-conjugated anti-rabbit* (Jackson #116-035-144) 1/20000), est ajouté sur la membrane et celle-ci est incubée 1 h à température pièce sur la plaque rotative. Entre le blocage (lait) et les deux différents anticorps, la membrane est toujours rincée abondamment 3 fois 5 minutes dans une solution de TBS-tween 0,1 %, puis 2 X 15 minutes à la toute fin.

#### **11.6. Révélation**

Pour visualiser la localisation de l'anticorps secondaire, les solutions de révélation ainsi que la méthode de la compagnie GE Healthcare *Amersham ECL Prime Western blotting Detection Reagent* ont été utilisés. Ces solutions produisent de la chimioluminescence aux sites où sont présents les anticorps couplés à l'HRP.

## Résultats

### 1. Mutagenèse de tous les systèmes d'adhésion de la bactérie *S. Typhi* ISP1820

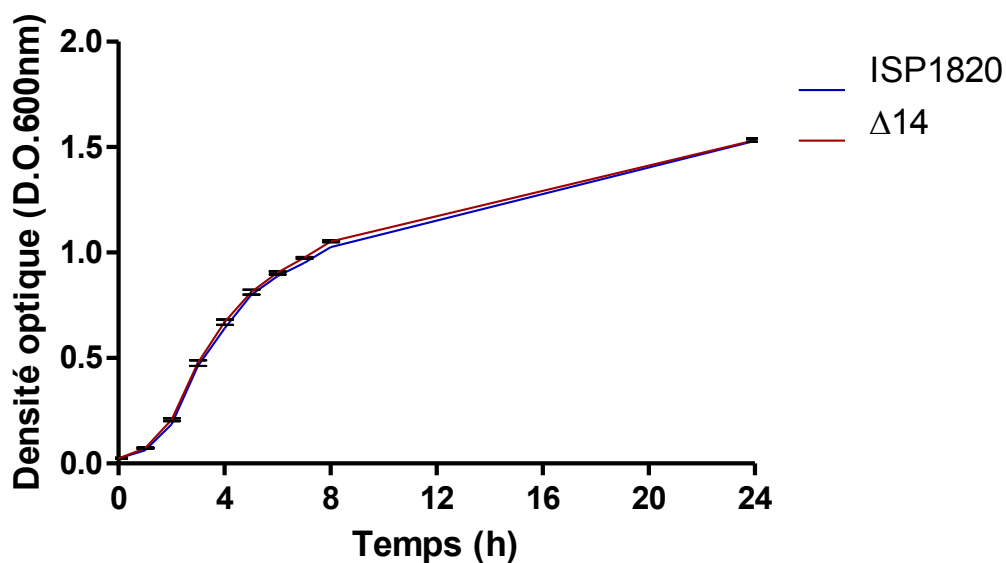
La caractérisation d'un gène débute généralement avec l'observation des modifications phénotypiques résultant d'une mutation de ce gène. Donc, pour déterminer le rôle des systèmes d'adhésion de *S. Typhi*, nous avons choisi de supprimer chacun des opérons fimbriaires de *S. typhi*. Les 14 systèmes d'adhésion connus de *S. Typhi* ont été supprimés du chromosome, 13 par une méthode de mutagenèse par échange allélique et la mutation de l'opéron *sta* a été réalisée par la méthode Datsenko (42). Chaque mutation a été validée par PCR afin de visualiser la présence de l'opéron tronqué et de s'assurer que l'opéron sauvage était absent du chromosome. Aussi, une vérification par amplification par PCR du gène *tviB* (un gène unique à *S. Typhi*) a été réalisée afin de s'assurer qu'il s'agit bien d'une souche de *S. Typhi* ne possédant plus l'opéron fimbriaire en question,

**Tableau VI : Mutants construits pour l'étude des systèmes d'adhésion de *S. Typhi* ISP1820**

| Nom du mutant | Génotype   | Résistance | Nombre de bases manquantes (kb) |
|---------------|--|------------|---------------------------------|
| DEF 004       | ISP1820 $\Delta$ <i>stg</i>  |            | 5.06                            |
| DEF 044       | ISP1820 $\Delta$ <i>sta</i>  | Kan        | 7.51                            |
| DEF 084       | ISP1820 $\Delta$ <i>saf</i>  |            | 5.49                            |
| DEF 154       | ISP1820 $\Delta$ <i>fim</i>  |            | 9.2                             |
| DEF 441       | ISP1820 $\Delta$ <i>tcf</i>  |            | 5.24                            |
| DEF 510       | ISP1820 $\Delta$ <i>csg</i>  |            | 5.36                            |
| DEF 563       | ISP1820 $\Delta$ <i>bcf</i>  |            | 8.19                            |
| DEF 564       | ISP1820 $\Delta$ <i>stb</i>  |            | 6.15                            |
| DEF 602       | ISP1820 $\Delta$ <i>stc</i>  |            | 5.03                            |
| DEF 600       | ISP1820 $\Delta$ <i>std</i>  |            | 4.69                            |
| DEF 603       | ISP1820 $\Delta$ <i>ste</i>  |            | 5.81                            |
| DEF 605       | ISP1820 $\Delta$ <i>sef</i>  |            | 4.59                            |
| DEF 621       | ISP1820 $\Delta$ <i>sth</i>  |            | 5.87                            |
| DEF 623       | ISP1820 $\Delta$ <i>pil</i>  |            | 13.31                           |
| DEF 664       | ISP1820 $\Delta$ <i>stg, sta, saf, fim, tcf, csg, bcf, stb, stc, std, ste, sef, sth, pil</i><br><b>(<math>\Delta</math>14)</b>   | Kan        | 91.5                            |
| DEF 665       | ISP1820 $\Delta$ <i>stg, sta, saf, fim, tcf, csg, bcf, stb, stc, std, ste, sef, sth, pil, fli C</i><br><b>(<math>\Delta</math>14<math>\Delta</math>fliC)</b>                               | Kan        | 93.02                           |
| DEF 666       | ISP1820 $\Delta$ <i>stg, sta, saf, fim, tcf, csg, bcf, stb, stc, std, ste, sef, sth, pil, fli C, tviB</i><br><b>(<math>\Delta</math>14<math>\Delta</math>fliC <math>\Delta</math>tviB)</b> | Kan        | 94.3                            |
| DEF 676       | ISP1820 $\Delta$ <i>stg, sta, saf, fim, tcf, csg, bcf, stb, stc, std, ste, sef, sth, pil, tvi B</i><br><b>(<math>\Delta</math>14<math>\Delta</math>tviB)</b>                               | Kan        | 92.78                           |
| DEF 743       | ISP1820 $\Delta$ <i>araBAD</i>   |            | 4.06                            |

## 2. Courbe de croissance

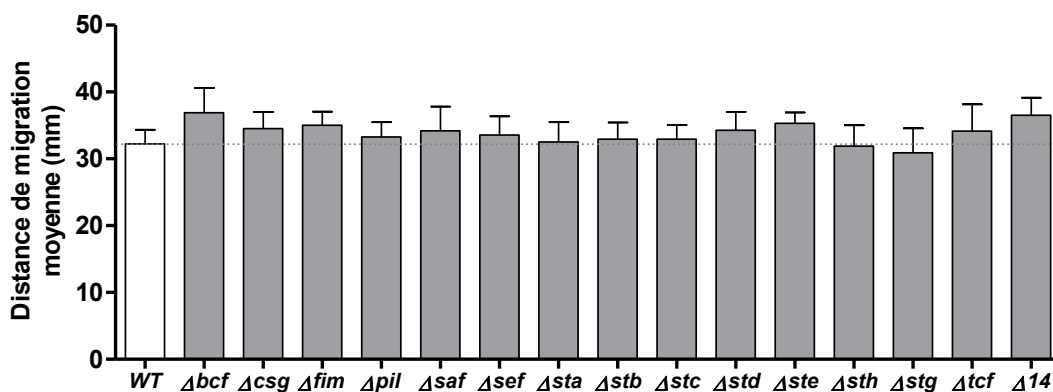
La souche ISP1820 afimbriaire ( $\Delta 14$ ) (DEF664) est dépourvue de tous ses systèmes d'adhésion connus. Ces multiples mutations représentent une délétion d'environ 91 kb. Vu l'importance considérable de ces délétions, une courbe de croissance a été réalisée afin de vérifier que ces mutations n'affectent pas la croissance de la souche ( $\Delta 14$ ) en milieu LB. Les résultats présentés permettent de conclure que toutes les mutations imposées à la souche afimbriaire ( $\Delta 14$ ) n'affectent pas sa croissance dans un milieu riche comme le LB (Fig. 12).



**Figure 13: Courbe de croissance en milieu LB.** Densités optiques des cultures de *S. Typhi* (sauvage ou mutante) prises à chaque heure de 0 à 8 h puis une dernière fois à 24 h. Chaque courbe représente une moyenne de trois réplicats techniques.

### 3. Mobilité

Les fimbriae servent à l'attachement et l'immobilisation de la bactérie à une surface telle qu'une paroi cellulaire. A ce titre, ils sont régulés de façon inverse aux flagelles chez *S. Typhimurium* (160). Pour cette raison, la mobilité des souches mutantes par rapport à la souche sauvage a été mesurée. Toutefois, la mutation des systèmes d'adhésion de la souche ISP1820 ne semble pas causer modifier la mobilité dans la condition que nous avons testée (Fig. 13). La moyenne des distances de migration est semblable à celle de la souche sauvage pour toutes les souches mutantes.



**Figure 14: Mobilité des différentes souches mutantes.** Cette figure présente la moyenne des distances de migrations mesurées sur gélose 0.3% après 16h d'incubation pour chaque souche mutante ainsi que pour la souche sauvage. Les essais ont été réalisés en triplicata et sont significatif lorsque  $P < 0.05$  (\*) suite à un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

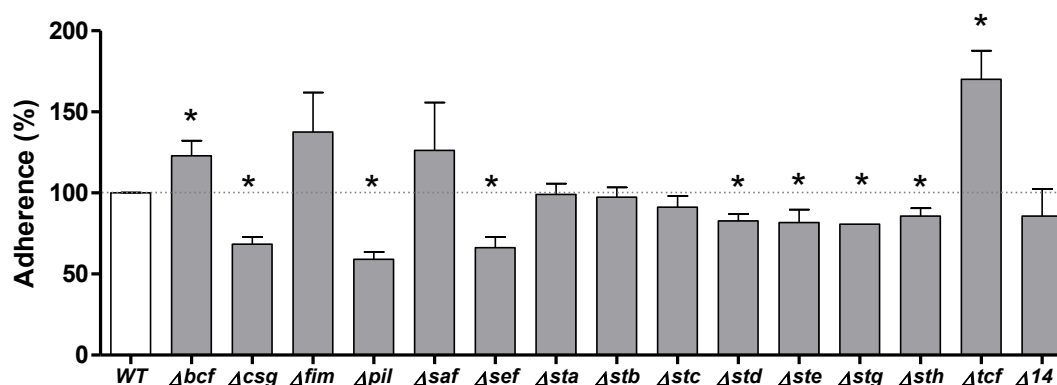


#### 4. Adhésion et Invasion de cellules épithéliales humaines INT-407

Le passage de la barrière des cellules épithéliales est une des premières étapes cruciales à l'initiation de l'infection par *S. Typhi*. La méthode d'infection de cellules épithéliales *in vitro* permet d'évaluer l'adhérence et l'invasion bactérienne et ainsi déterminer l'importance de chaque fimbriae lors de cette étape de la pathogénèse.

##### 4.1. Adhérence aux cellules épithéliales

En analysant dans un premier temps l'adhésion, qui correspond au nombre de bactéries associées avec les cellules suite à 90 minutes d'interaction, cela permet de comparer la capacité d'adhésion de chaque mutant par rapport à la souche sauvage (WT) (Fig. 14).

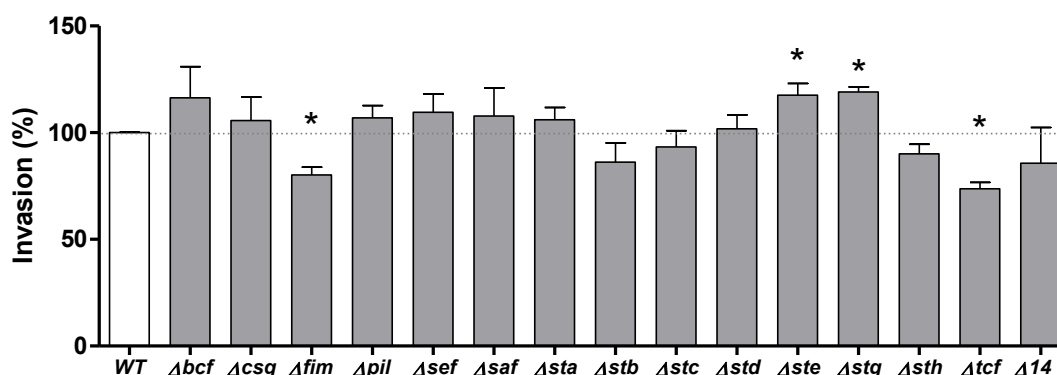


**Figure 15: Taux d'adhérence dans les cellules épithéliales INT-407.** Les données présentées sont le taux  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatats. Le taux est déterminé en comparant le nombre de bactéries ayant adhéré à 90 minutes avec les nombre de bactéries déposées dans les puits initialement. Les essais sont significatif lorsque  $P < 0.05$  (\*) suite à un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

Les résultats observés suite aux analyses des données d'adhérence (Fig. 14) démontrent que certaines mutations ont eu des effets quand aux capacités d'adhésion. Les mutants pour les fimbriae *csg*, *sef*, *std*, *ste*, *stg* et *sth* ainsi que le pili de type IV (*pil*) présentent une perte significative des capacités d'adhésion face à la souche sauvage. Toutefois, les mutants pour les fimbriae *bcf*, *fim*, *saf* et *tcf* présentent une augmentation des capacités d'adhésion face à la souche sauvage.

#### 4.2. Invasion de cellules épithéliales

Dans un deuxième temps, nous avons aussi comparé chaque mutant par rapport aux capacités d'invasion de la souche sauvage (WT), ce qui correspond au nombre de bactéries ayant réussi à entrer dans les cellules non-phagocytaires.



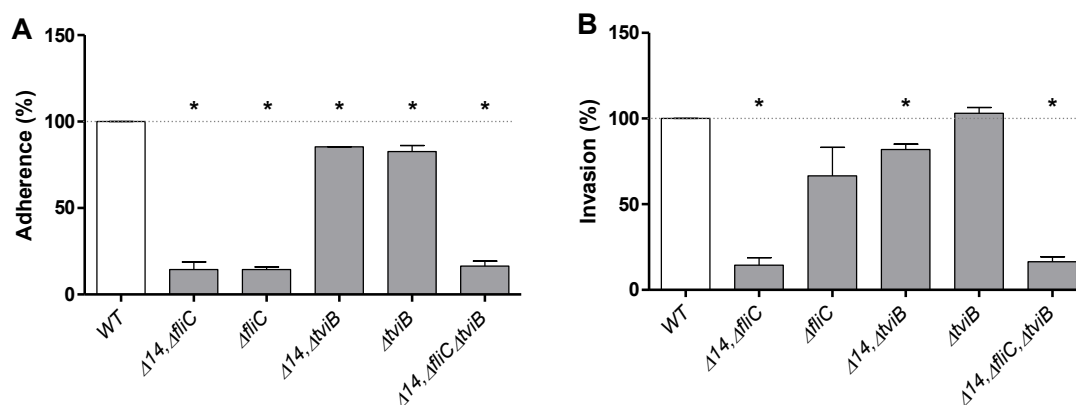
**Figure 16: Taux d'invasion dans les cellules épithéliales INT-407** Les données présentées sont le taux  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatats. Le taux est déterminé en comparant le nombre de bactéries intracellulaires à 180 minutes avec les nombre de bactéries à 90 minutes. Les essais sont significatif lorsque  $P < 0.05$  (\*) suite à un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

Les résultats obtenus suite aux analyses des données d'invasion démontrent que les souches mutantes pour les fimbriae *fim* et *tcf* sont désavantagées lors de l'invasion (Fig.

15). Tandis que les souches mutantes pour les fimbriae *ste* et *stg* présentent une meilleure capacité d'invasion que la souche sauvage. Certains fimbriae tels que *ste* et *tcf* semblent être impliqués aux niveaux de l'adhésion et de l'invasion soit d'une manière positive ou négative.

#### **4.3. Infection de cellules épithéliales par des souches afimbriaires**

La souche afimbriaire contenant la délétion de tous les systèmes d'adhésion ( $\Delta 14$ ) et celles combinant aussi des mutations dans d'autres molécules de surface (flagelle et capsule) ont été testées lors d'infection de cellules épithéliales (Fig. 16). Puisque le défaut d'invasion causé par la mutation de la sous-unité principale du flagelle (*fliC*) est déjà connue chez *S. Typhi* (119, 197), la souche possédant cette mutation ( $\Delta fliC$ ) est utilisée comme contrôle. Lors de l'interaction avec les cellules épithéliales, la souche avec la mutation de *fliC* a effectivement démontré un très faible taux d'adhésion. La faible capacité d'adhérence des mutants  $\Delta 14$ ,  $\Delta fliC$  et  $\Delta 14$ ,  $\Delta fliC$ ,  $\Delta tviB$  semble être attribuable à *fliC*. La mutation du gène *tviB*, impliqué dans la synthèse de la capsule, cause elle aussi une diminution des capacités d'adhérence, mais beaucoup moins prononcée que celle observée pour *S. Typhi*  $\Delta fliC$ . Au niveau de l'invasion, la souche  $\Delta fliC$  présente une capacité affaiblie, mais cette perte des capacités d'invasion est plus grande pour les mutants  $\Delta 14$ ,  $\Delta fliC$  et  $\Delta 14$ ,  $\Delta fliC$ ,  $\Delta tviB$ . La souche  $\Delta tviB$ , ne présente pas de perturbation des capacités d'invasion, et la souche  $\Delta 14$ ,  $\Delta tviB$  présente un phénotype semblable à celui de la souche  $\Delta 14$  (Fig. 15). Donc la mutation de *tviB* ne provoque pas de phénotype majeur au niveau de l'invasion.



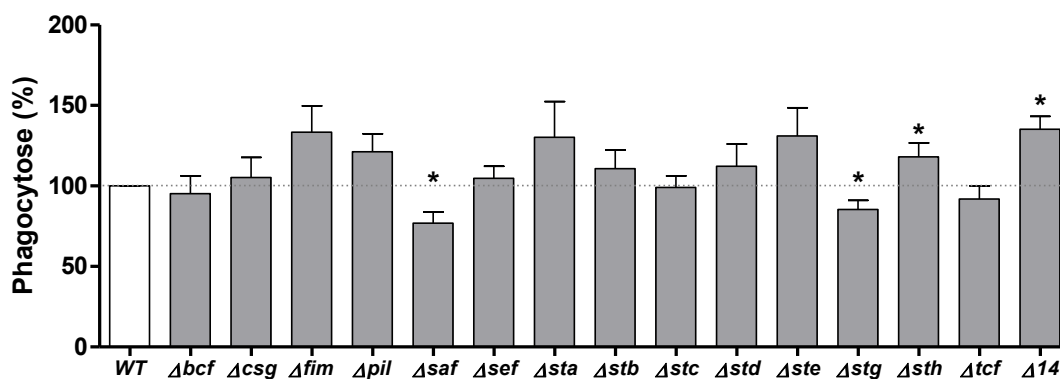
**Figure 17 : Taux d'adhérence et d'invasion dans les cellules épithéliales INT-407.** Les données présentées sont le taux  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicats. (A) Le taux d'adhérence est déterminé en comparant le nombre de bactéries ayant adhéré à 90 minutes avec le nombre de bactéries déposées dans les puits initialement. (B) le taux d'invasion est déterminé en comparant le nombre de bactéries intracellulaires à 180 minutes avec le nombre de bactéries à 90 minutes. Les essais sont significatifs lorsque  $P < 0.05$  (\*) suite à un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

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

Certains fimbriae de *S. Typhi* sont exprimés dans les macrophages lors de l'infection de macrophages (55). Par ailleurs, la survie dans les macrophages est une étape clé de la virulence de *S. Typhi* (45, 56). Il est donc intéressant de vérifier si les fimbriae ont un rôle à jouer afin d'assurer cette survie. En procédant à des infections de macrophages humains, il est possible d'évaluer le rôle de chaque fimbriae de *S. Typhi*. D'une part, le niveau de phagocytose de chaque mutant est évalué et comparé au niveau de phagocytose de la souche sauvage. D'autre part, la capacité de survie de chaque mutant après 24 h d'infection est aussi mesurée et comparée à la capacité de survie de la souche sauvage.

### 5.1. Phagocytose par les macrophages humains

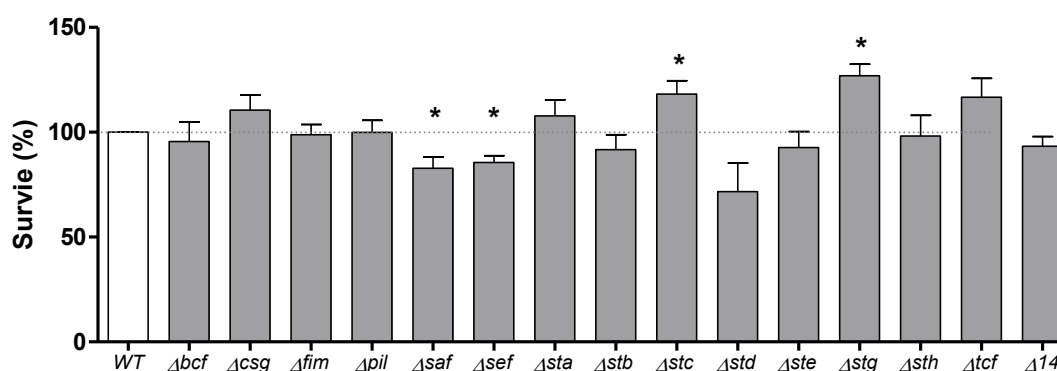
Le taux de phagocytose de chacun des mutants des systèmes d'adhésion a été déterminé (Fig. 17). Les résultats obtenus suite aux tests de phagocytose par les macrophages présentent une implication des fimbriae *saf*, *stg* et *sth*. Les souches mutantes pour les fimbriae *saf* et *stg* semblent moins phagocytées que la souche sauvage tandis que la souche mutante pour *sth* semble plus facilement phagocytée par les macrophages humains. C'est également le cas de la souche afimbriaire ( $\Delta 14$ ) qui présente un pourcentage de phagocytose supérieur à celui de la souche sauvage. Même si les autres résultats ne sont pas significatifs, plusieurs mutants (*fim*, *pil*, *sta*, *stb*, *std* et *ste*) présentent une augmentation du niveau de phagocytose par rapport à la souche sauvage.



**Figure 18: Taux de phagocytose dans les macrophages THP-1.** Les données présentées sont le taux  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatats. Le taux est déterminé en comparant le nombre de bactéries intracellulaires à 20 minutes avec les nombre de bactéries déposées dans les puits initialement. Les essais sont significatif lorsque  $P < 0.05$  (\*) suite à un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

## 5.2. Survie dans les macrophages humains

Le taux de survie de chacun des mutants des systèmes d'adhésion a été déterminé (Fig. 18). Le dénombrement des bactéries effectué 24h suite à l'infection initiale de macrophages donne lieu à des résultats différents par rapport aux résultats de phagocytose (Fig. 17). En effet, la délétion des systèmes d'adhésion ne modifie pas les capacités de survie dans les macrophages pour la plupart des souches. Seules les souches mutantes pour les fimbriae *saf* et *sef* et *std* présente une capacité de survie diminuée. A l'inverse, la mutation des fimbriae *stc* et *stg* procure un avantage lors de la survie dans les macrophages.

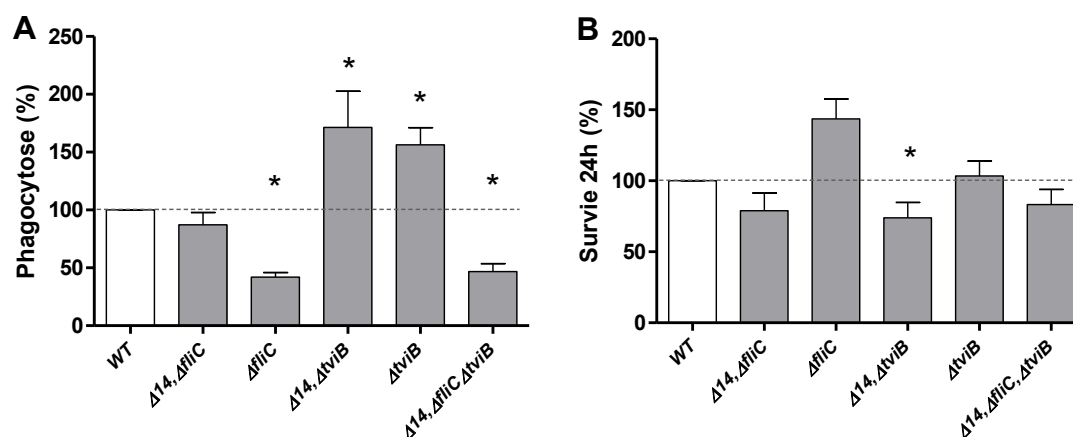


**Figure 19: Taux de survie dans les macrophages THP-1.** Les données présentées sont le taux  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatats. Le taux est déterminé en comparant le nombre de bactéries intracellulaires à 24 heures avec les nombre de bactéries intracellulaire après 20 minutes. Les essais sont significatif lorsque  $P < 0.05$  (\*) suite à un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

### 5.3. Infection de macrophages par les souches afimbriaires

La souche afimbriaire contenant la délétion de tous les systèmes d'adhésion ( $\Delta 14$ ), et celles combinant aussi des mutations dans d'autres molécules de surface (flagelle et capsule) ont été testées lors d'infection de macrophage humain (Fig. 19). L'importance des flagelles lors d'infection de macrophages avec *S. Typhimurium* a déjà été démontrée (11, 27, 102, 117, 205). Toutefois, peu d'informations sont disponibles concernant *S. Typhi*. Les résultats que nous avons obtenus démontrent que la mutation du gène *fliC* cause un défaut de phagocytose, individuellement ou en combinaison ( $\Delta 14\Delta fliC$ ,  $\Delta fliC$  et  $\Delta 14\Delta fliC\Delta tviB$ ) (Fig. 19). Chez la souche  $\Delta 14\Delta fliC$  l'effet est cependant plus atténué. La mutation du gène *tviB* augmente la phagocytose individuellement ou en combinaison avec la délétion de tous les systèmes ( $\Delta 14$ ), cependant, il est intéressant de noter que l'effet de la mutation de *fliC* est dominant par rapport aux effets causés par les mutations des systèmes d'adhésion et de la capsule chez les mutant  $\Delta 14\Delta fliC\Delta tviB$ . À l'intérieur des macrophages, les mutants ne présentent pas de différence significative au niveau de la survie à l'exception du mutant  $\Delta 14\Delta tviB$ , dépourvue de systèmes d'adhésion et de capsule, qui survie moins. La souche  $\Delta fliC$  survie mieux, mais pas significativement.





**Figure 20 : Taux de phagocytose et taux de survie dans les macrophages THP-1.** Les données présentées sont le taux  $\pm$  l'erreur type (SEM) d'au moins 3 expériences en duplicatats. (A) Le taux de phagocytose est déterminé en comparant le nombre de bactéries intracellulaire à 20 minutes avec les nombre de bactéries déposées dans les puits initialement. (B) le taux de survie est déterminé en comparant le nombre de bactéries intracellulaires à 24 heures avec les nombre de bactéries intracellulaire à 20 minutes. Les essais sont significatif lorsque  $P < 0.05$  (\*) suite à un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

## 6. Indice de compétition lors d'infection de cellules épithéliales INT-407

Lors d'une infection observée chez un patient, le profil d'expression génétique d'une souche peut varier grandement d'une bactérie à l'autre et celles-ci peuvent aussi se compléter. Ainsi, chaque cellule bactérienne sera soumise à une pression de sélection et seules les plus aptes pourront survivre et causer une infection. C'est en partie ce qui explique qu'une mutation peut n'avoir aucun effet lorsque testé *in vitro*, mais présenter un défaut lors d'une infection *in vivo*, en présence et en compétition avec les autres bactéries. C'est précisément dans le but de recréer cette concurrence que le protocole d'essai de compétition en culture cellulaire a été mis au point (169). Puisque la majorité des effets causés par la mutation des systèmes d'adhésion ont été observés lors d'infection de cellules épithéliales, l'essai de compétition a été réalisé dans ces conditions. En observant les résultats obtenus lors d'infection de cellules épithéliales sans compétition (Fig. 14 et 15), il serait attendu que la souche afimbriaire présente un léger défaut d'adhésion et d'invasion. Pourtant, la souche afimbriaire ( $\Delta 14$ ) présente ici un avantage marqué face à la souche sauvage en co-infection (Tableau VI). La souche dépourvue de système d'adhésion présente des capacités d'adhérence et d'invasion plus de 2x plus élevée que la souche parentale.

**Tableau VII : Effet des mutations de tous les systèmes d'adhésion ( $\Delta 14$ ) lors d'une infection de cellules épithéliales en essai de compétition, Calculé selon (169).**

| Souche              | C.I. <sup>a</sup> Adhésion (P) | C.I. <sup>b</sup> Invasion (P) |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ISP1820 $\Delta 14$ | 2.35 (<0.001)                  | 2.37 (0.0013)                  |

<sup>a</sup> Indice de compétition par rapport à la souche sauvage ISP1820 NaI<sup>R</sup> lors de l'adhésion (T90/T0)

<sup>b</sup> Indice de compétition par rapport à la souche sauvage ISP1820 NaI<sup>R</sup> lors de l'invasion (T180/T90)

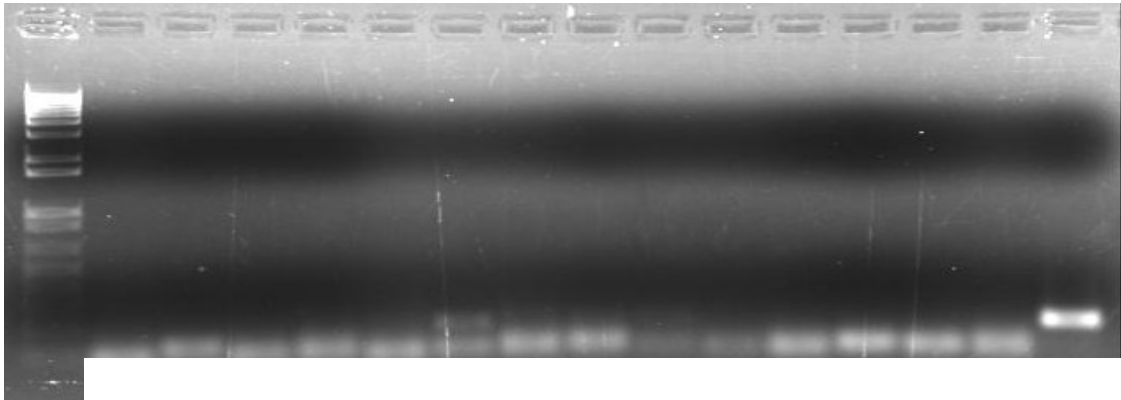
## 7. RT-PCR

### 7.1. RT-PCR révélant le profil d'expression des fimbriae de *S. Typhi* lorsque cultivée selon différentes conditions de culture in-vitro.

Les fimbriae ne sont généralement pas exprimés *in vitro*. Puisque les fimbriae de *S. Typhi* ne sont pas très bien caractérisés, nous avons décidé de regarder l'expression des fimbriae dans différentes conditions de croissance. L'extraction d'ARN de bactéries soumises à des conditions de croissance distinctes a été réalisée. Cet ARN représente tous les gènes exprimés dans des conditions précises ou lors d'une phase de croissance déterminée. Cet ARN, une fois rétro-transcrit en ADNc peut être utilisé lors de réaction de PCR afin d'amplifier les gènes des fimbriae de *S. Typhi*. Lorsqu'un fragment est visible, c'est que ce gène a été exprimé *in vitro* dans les conditions choisies pour l'extraction d'ARN. Quatre conditions expérimentales de croissances ainsi qu'une infection de cellules épithéliales ont été choisies puis des réactions de PCR ont été effectuées sur l'ADNc. Les amorces utilisées permettent d'amplifier un fragment d'environ 200 pb situé juste après le premier ATG suivant le promoteur de l'opéron. Les figures 20 à 26 présentent les produits de RT-PCR migrés sur gel d'agarose. Sur chaque photo, la présence de dimères d'amorces est visible dans le bas du gel, mais les fragments amplifiés sont tout de même visibles. La colonne de droite présente l'amplification d'un fragment de l'ARN16S servant de contrôle positif aux réactions de PCR.

### 7.1.1. Milieu LB

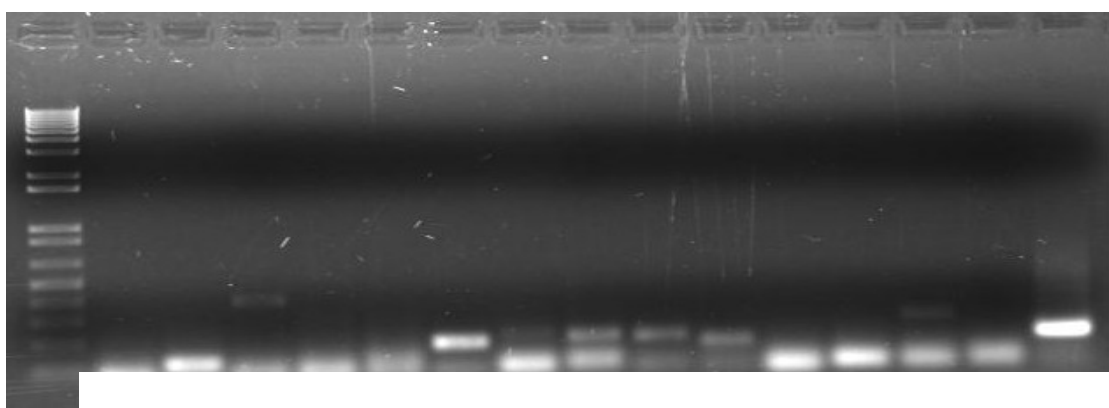
Tout d'abord, la souche *S. Typhi* a été cultivée en milieu riche LB avec agitation pour une période d'environ 16 h avant l'extraction d'ARN. La RT-PCR permet d'apprendre que les fimbriae *fim* et *sta* sont exprimés dans ces conditions (Fig. 20).



**Figure 21: Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN d'une culture de *S. Typhi* en LB O/N avec agitation.**

### 7.1.2. Milieu LB NaCl

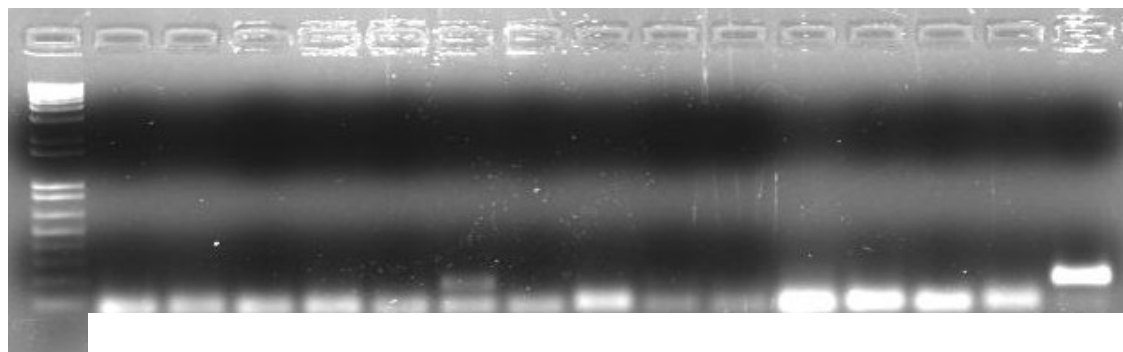
Ensuite, la souche *S. Typhi* a été cultivée en milieu riche LB, avec ajout de NaCl 0.3M, incubée sans agitation pour une période d'environ 16h. Le pili de type IV, *pil*, ainsi que les fimbriae *fim*, *sta*, *stb*, *stc*, *std*, *ste* et *tcf* sont exprimés lorsque la souche *S. Typhi* est cultivée dans de telles conditions (Fig. 21).



**Figure 22:** Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN d'une culture de *S. Typhi* en LB-NaCl 0.3M O/N sans agitation.

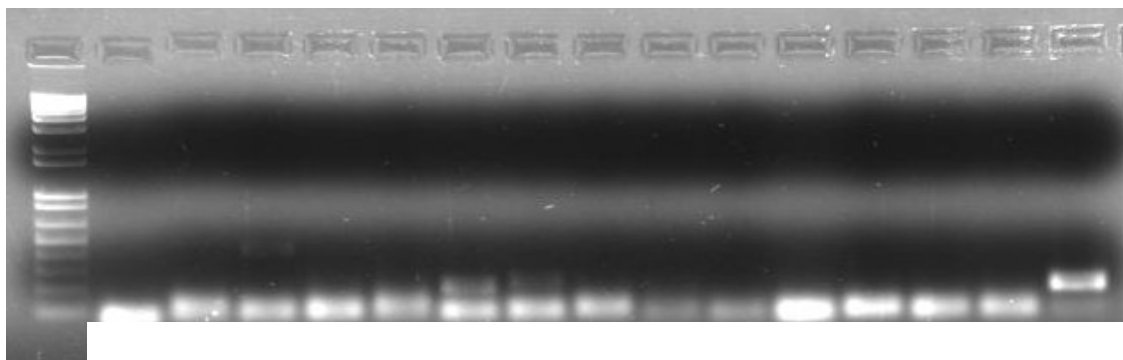
### 7.1.3. Milieu M63 faible ou riche en fer

L'expression des fimbriae lors de culture en bouillon minimal M63 a ensuite été évaluée. Un facteur de variations supplémentaire a été ajouté à cette condition soit la présence ou l'absence de fer. Tout d'abord parce qu'un milieu faible en fer est une condition rencontrée chez l'hôte lors de l'infection, ensuite parce que certaines évidences chez *E. coli* démontrent que la présence ou l'absence de fer interfèrent avec la régulation des fimbriae (183). La croissance dans un bouillon M63 faible en fer, provoque l'expression du fimbriae *sta* seulement (Fig. 22).



**Figure 23: Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN d'une culture de *S. Typhi* en M63 faible en fer O/N sans agitation.**

La croissance de *S. Typhi* dans un milieu riche en fer provoque aussi l'expression, de l'opéron *sta* (Fig. 23). Il est donc possible que le fer n'ait pas d'implication concernant l'expression du fimbriae *sta*. L'ajout du fer au milieu M63, provoque également la transcription de *fim*, *pil* et *stb*.

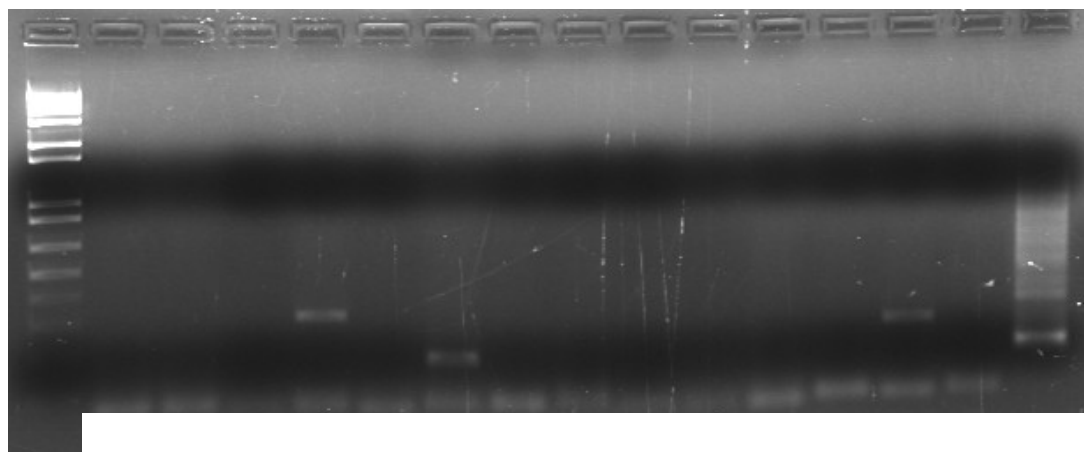


**Figure 24: Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN d'une culture de *S. Typhi* en M63 riche en fer O/N sans agitation.**

## 7.2. RT-PCR révélant le profil d'expression des fimbriae de *S. Typhi* lors d'une infection de culture de cellules épithéliales.

### 7.2.1. Expression des fimbriae dans le surnageant

Une PCR fait sur l'ADNc provenant d'une culture de *S. Typhi* lors des différentes étapes d'une infection de cellules épithéliales, surnageant, adhésion et invasion, présente aussi des résultats intéressants. Le surnageant, qui correspond au milieu de culture dans lequel baignent les cellules épithéliales 90 minutes après l'ajout des bactéries. Il est possible de constater que dans cette condition, les fimbriae *saf*, *sta* et *tcf* sont exprimé (Fig. 24).

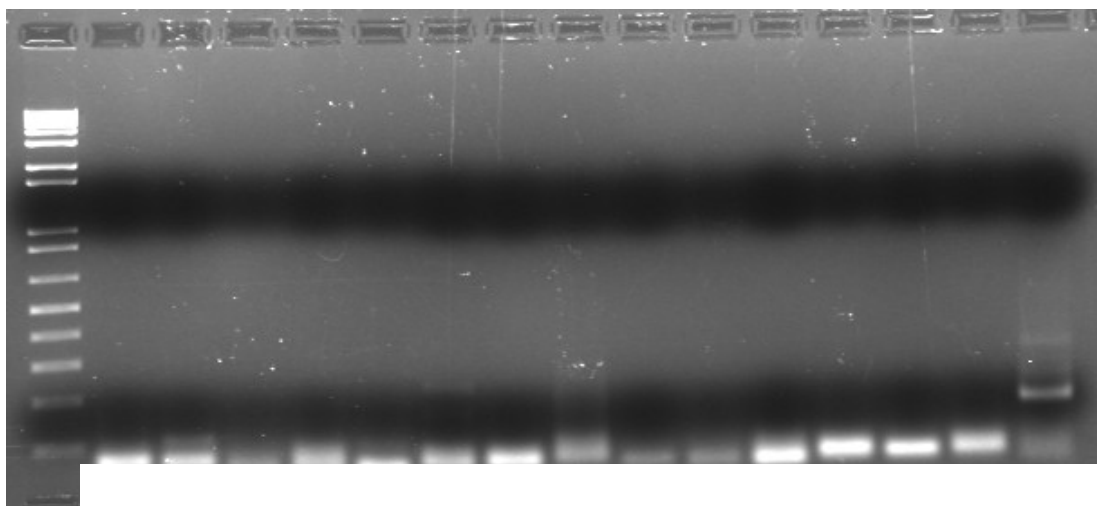


**Figure 25 : Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN du surnageant lors d'infection de cellules épithéliales par *S. Typhi*.**



### 7.2.2. Expression des fimbriae durant l'adhésion

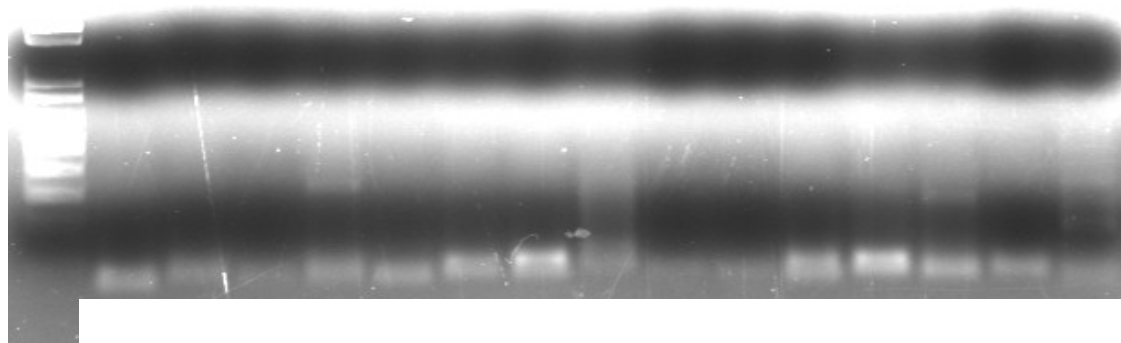
Après 90 minutes d'interaction, suite au retrait du surnageant et plusieurs lavages des cellules, l'ARN extrait correspond à l'étape d'adhésion. On observe un changement concernant l'expression fimbriaire entre les bactéries du milieu (Fig. 24) et ceux ayant adhéré (Fig. 25). Les fimbriae *sta* est encore une fois exprimé, mais les fimbriae *saf* et *tcf* ne le sont plus, ils sont plutôt remplacés par le fimbriae *fim*.



**Figure 26 :** Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN de *S. Typhi* lors de l'adhésion aux cellules épithéliales.

### 7.2.3. Expression de fimbriae durant l'invasion

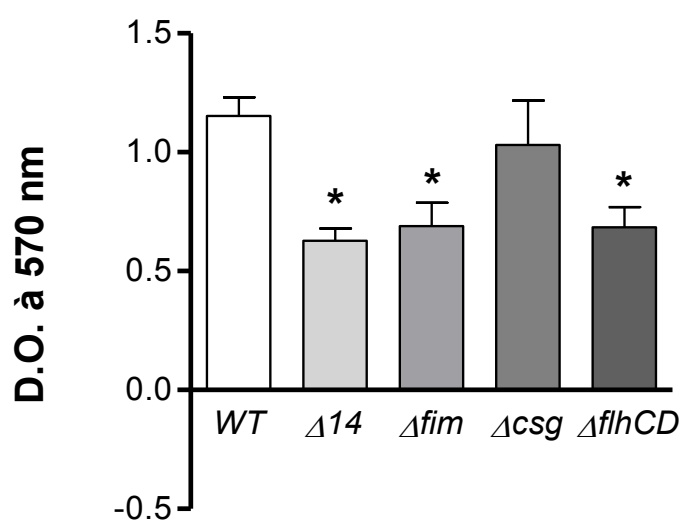
Après 180 minutes d'interaction et suite à plusieurs lavages des cellules épithéliales, l'ARN extrait correspond à l'étape d'invasion. Dans ces conditions, le fimbriae *fim* continue d'être exprimé. Il est intéressant de constater que le fimbriae *sta* (exprimé lors de l'adhésion Fig.25) ne l'est plus lors de l'invasion (Fig.26), mais que les fimbriae *saf* et *tcf* le sont à nouveau tout comme dans la phase surnageant (Fig. 24)



**Figure 27 : Gel de migration des produits de RT-PCR pour une extraction d'ARN de *S. Typhi* lors de l'invasion des cellules épithéliales.**

## 8. Biofilms

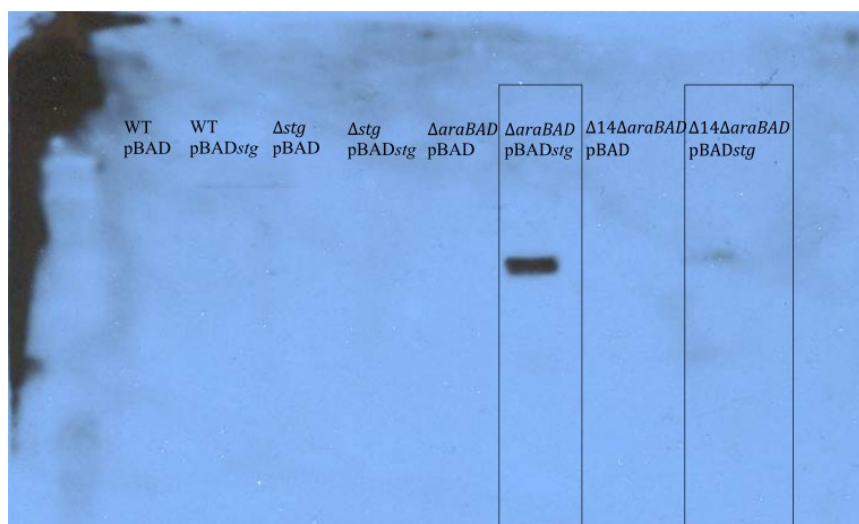
Des études ont révélé que les porteurs asymptomatiques de *S. Typhi* sont aussi souvent porteurs de calculs biliaires et que ceux-ci pourraient être un facteur prédisposant à l'état de porteur asymptomatique (38). Ces pierres sont enrobées de cholestérol et propices à la formation de biofilms dans la vésicule biliaire. Suivant ces observations, plusieurs recherches ont été effectuées et il s'avère que la bile ainsi qu'une surface recouverte de cholestérol sont propices à la formation et favorise le développement de biofilms (36). Afin d'investiguer le rôle des fimbriae de *S. Typhi* dans la formation de biofilms nous avons réalisé des essais de biofilm en tubes (TBA). Puisque les flagelles de *S. Typhi* sont impliqués dans la formation de biofilm (38), nous avons utilisé une souche mutante (*flhCD*) comme contrôle négatif. Les premiers résultats suggèrent que les fimbriae de *S. Typhi* sont impliqués dans la formation de biofilm. Le mutant afimbriaire ( $\Delta 14$ ) présente une plus faible capacité à former des biofilms que la souche sauvage (WT). Le mutant *fim* présente ce même défaut. Cependant, le mutant *csg* présente un défaut moins marqué que chez le mutant *fim*.



**Figure 28 : Essai de biofilm en tube.** Densité optique mesurée suite à la coloration au crystal violet lors d'un essai de biofilm en tubes d'une durée de 3 jours. Les essais ont été réalisés en triplicata technique et sont significatif lorsque  $P < 0.05$  (\*) suite à un T-test de Student par rapport à la souche sauvage (WT).

## 9. Surexpression du fimbriae *stg* à l'aide d'un vecteur inductible

Puisque peu de fimbriae sont exprimés *in vitro* et dans le but d'étudier d'avantage le rôle de chaque fimbriae notre laboratoire désire surexprimer chaque opéron fimbriaire à l'aide d'un vecteur inductible à l'arabinose (pBAD24, voir tableau IV). Chez *S. Typhi*, l'opéron arabinose, *araBAD*, est constitué des gènes responsables de son métabolisme sous le contrôle du régulateur transcriptionnel *araC*. L'entrée de l'arabinose dans la bactérie est contrôlée notamment par les gènes *araE*, *araH* et *araJ* qui ne sont pas localisés dans l'opéron. Afin d'optimiser l'expression du plasmide, nous avons construit les souches *S. Typhi*  $\Delta$ *araBAD* et *S. Typhi*  $\Delta$ 14,  $\Delta$ *araBAD* qui sont compétentes afin d'internaliser l'arabinose, mais incapable de le métaboliser, laissant celui-ci entièrement disponible pour l'induction plasmidique. Afin de comparer l'expression du fimbriae *stg*, un Western blot a été réalisé sur différentes souches contenant le plasmide pBAD24 ainsi que les mutations détaillées ci-haut (Fig. 28). Un résultat préliminaire nous permet d'observer l'expression dans le surnageant du fimbriae *stg* seulement lorsque la souche *S. Typhi*  $\Delta$ *araBAD* (pBADstgTAT) et *S. Typhi*  $\Delta$ 14  $\Delta$ *araBAD* (pBADstgTAT) sont induites à l'arabinose (Fig. 28). La mutation des gènes *araBAD* permet donc une meilleure expression du plasmide et du fimbriae *stg*. Ces conditions pourront donc être répétées afin de surexprimer tous les fimbriae de *S. Typhi*.



**Figure 29 : Induction de l'expression fimbriaire *stg*.** Western blot des protéines du surnageant traitées avec l'anticorps polyclonal anti-*stgD* après induction à l'arabinose 0.1% des souches de *S. Typhi* pBAD24 présentant les mutations indiquées pour chaque souche. WT représente la souche sauvage.

## Discussion

*S. Typhi*, l'agent étiologique de la fièvre typhoïde, est un sérovar à hôte unique qui peut seulement infecter l'homme. Ainsi, le seul réservoir connu de cette bactérie est l'homme infecté ou le porteur asymptomatique. Malgré les nouvelles générations d'antibiotiques, le nombre de cas de fièvre typhoïde continue d'augmenter à l'échelle mondiale (39). La situation reste inquiétante et les connaissances actuelles à propos de ce pathogène méritent d'être approfondies. Les similarités entre *S. Typhi* et *S. Typhimurium* permettent de cibler certains mécanismes de virulence qui sont communs aux deux sérovares. Cependant, les particularités uniques à *S. Typhi* ne peuvent être décelées qu'en étudiant ce sérovar. Les modèles d'études disponibles jusqu'à maintenant sont peu adéquats. L'infection de souris par *S. Typhimurium* permet d'observer une maladie systémique qui mime certains traits propres à *S. Typhi*, mais ne permet pas d'étudier le rôle des gènes uniques à *S. Typhi*. Puisque la spécificité d'hôte de *S. Typhi* réside possiblement dans ces gènes de virulence uniques, il est primordial de s'y intéresser.

L'objectif de la présente étude était de mieux connaître certains facteurs de virulence qui sont uniques à *S. Typhi*. Le répertoire de fimbriae de *S. Typhi* est unique à celui-ci et demeure très mal connu. Ainsi, la caractérisation et la délétion des systèmes d'adhésion de *S. Typhi* nous a permis d'exposer certaines particularités des fimbriae de *S. Typhi* qui demeuraient jusqu'à maintenant inconnues.

Les objectifs du projet ont permis de recueillir beaucoup d'informations relatives aux fimbriae de *S. Typhi*. D'abord, la création de mutants des systèmes d'adhésion nous a

permis d'observer certains effets lors l'interaction avec des cellules humaines, et lors de la production de biofilm. Ensuite, la caractérisation de l'expression de chacun des fimbriae a été observée par RT-PCR et expose un profil d'expression individuel très intéressant. Aussi, la construction d'une souche afimbriaire permet d'étudier la contribution de tous les systèmes d'adhésion de *S. Typhi* simultanément et s'avère un outil avantageux.

### **1. Courbe de croissance**

Après avoir réalisé une courbe de croissance en milieu LB, nous constatons que la souche afimbriaire ( $\Delta 14$ ) ne présente aucun défaut de croissance (Fig. 12). Les opérons fimbriaire ne sont pas des gènes requis ni essentiels pour la croissance de *S. Typhi* en condition classique de laboratoire (bouillon LB). Ainsi les phénotypes observés, relatifs à cette souche, ne sont pas provoqués par un tel défaut et pourraient être attribuables aux délétions des systèmes d'adhésion.

### **2. Mobilité**

La régulation complexe des fimbriae (Chapitre 1 section 2.2.) implique certains facteurs qui sont également impliqués dans la régulation de la mobilité chez *S. Typhimurium* et *E. coli* (142, 160). Aussi, le rôle des fimbriae est avant tout d'immobiliser les bactéries en adhérant à une surface. La mobilité et l'adhésion sont donc deux fonctions opposées (160). Cependant, la délétion des systèmes d'adhésion de la bactérie *S. Typhi* ne provoque pas de phénotype d'augmentation au niveau de la mobilité. Toutes les souches (mutantes individuelles ou multiples) présentaient une mobilité équivalente à celle de la souche sauvage (Fig. 13). Les mécanismes de régulation des flagelles proposés par



différents auteurs pour *S. Typhimurium* et *E. coli* (142, 160) impliquent les régulateurs fimbriaires *fimZ* et *csgD*, mais lors des tests visant à mesurer la mobilité, l'absence des régulateurs *fimZ* et *csgD* ne cause pas de phénotype chez *S. Typhi* dans les conditions testées. Toutefois, dans le cas du régulateur *fimZ*, son implication est observé seulement lorsque celui-ci est exprimé constitutivement (160) et dans le cas du régulateur *csgD*, son implication est observée lors du changement entre une phase planctonique et la production de biofilm (142). Puisque les tests effectués dans cette étude n'impliquent pas l'expression constitutive de *fimZ* et qu'ils n'ont pas été effectués en conditions favorables à la formation de biofilm, il est possible que le rôle de ces régulateurs ne soit pas détecté. Les connaissances actuelles sur la régulation croisée entre les flagelles et les fimbriae de *S. Typhi* nécessitent d'être approfondies.

### **3. Adhésion et invasion de cellules épithéliales**

Les infections de culture de cellules épithéliales humaine INT-407 fournissent des résultats intéressants et novateurs. Très peu d'informations sont disponibles quant aux rôles des différents fimbriae de *S. Typhi*. Les conditions de croissance qui permettent d'induire la production des fimbriae de *S. Typhi* ne sont pas encore connues. La méthode utilisée inclut un temps d'incubation durant lequel les bactéries sont en présence des cellules humaines et des molécules que ces dernières pourraient sécréter dans le milieu ce qui pourrait induire l'expression de certains gènes qui ne sont normalement pas exprimés en milieu riche de laboratoire.

La majorité des études publiées jusqu'à maintenant font état des différentes caractéristiques des fimbriae *fim* chez *E. coli* ou *S. Typhimurium* et semblent indiquer que

ce fimbriae est impliqué dans l'adhésion aux cellules épithéliales. Une étude de souches de *S. Typhi* mutantes pour les fimbriae *pil*, *sta* et *tcf* a été publiée en 2008 (17). Toutefois, cette étude démontre qu'aucun phénotype d'adhésion ou d'invasion n'est causé par la mutation de *pil*, *sta* ou *tcf* en interaction avec des cellules épithéliales INT-407 (17). Nos résultats démontrent toutefois une implication de *pil* et *tcf*. Selon nos résultats, une mutation de *pil* et *tcf* provoquent respectivement une diminution et une augmentation du niveau d'adhérence (Fig. 14). Aussi, selon nos résultats une mutation de *tcf* provoque une diminution du niveau d'invasion (Fig. 15). Les conditions expérimentales des deux études étaient différentes et pourraient expliquer les différents résultats obtenus. Dans les travaux de Bishop et al. 2008, les cellules épithéliales étaient incubées 48 heures dans les plaques à 24 puits avant l'ajout des bactéries. Les divers essais ont été réalisés à 4 °C ou avec des cellules fixées à la cytochalasine D, avec différentes M.O.I. et divers phases de croissance bactériennes. Selon Bishop et al., 2008, les conditions de culture, la phase de croissance, la méthode de culture des cellules eucaryotes ainsi que la souche de *S. Typhi* peuvent causer beaucoup de variation et ainsi donner des résultats contradictoires

D'autres études présentent cependant des résultats différents. Selon une première étude, *pilS* serait impliqué dans l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales INT-407 (204). Tandis que dans une deuxième étude le pili de type IV est impliqué seulement dans l'invasion de cellules épithéliales BHK et d'une manière indépendante du récepteur CFTR (22). Les conditions expérimentales des ces travaux sont légèrement différentes de celles utilisées dans le cadres de notre étude puisque les cellules épithéliales ont été incubées 48h dans les plaques à 24 puits avant l'ajout des bactéries qui étaient en phase stationnaire

lors du test de Zhang et al. 2000. Les cellules épithéliales utilisées par Bravo et al. 2011, n'étaient pas des INT-407 et les essais d'adhésion ont été réalisés à 4 °C. Selon Kusters et al. 1993, la M.O.I. utilisée lors d'une infection est une cause directe du nombre de bactérie qui adhèrent et pénètrent dans les cellules épithéliales (110).

L'analyse des résultats obtenus par notre laboratoire indique que les fimbriae *bcf*, *csg*, *fim*, *pil*, *saf*, *sef*, *std*, *ste*, *stg*, *sth* et *tcf* ont tous une implication dans l'adhésion (Fig. 14). La mutation de certains (*bcf*, *fim*, *saf* et *tcf*) provoque une augmentation du pourcentage d'adhésion tandis que d'autres (*csg*, *pil*, *sef*, *std*, *ste*, *stg* et *sth*) provoque une perte des capacités d'adhésion (Fig. 14). Il est intéressant de noter que cinq des six fimbriae uniques au sérovar Typhi sont impliqués dans l'adhérence soit *pil*, *sef*, *ste*, *stg* et *tcf*.

Pour ce qui est de l'invasion, les fimbriae *bcf*, *csg*, *fim*, *stb*, *ste*, *stg* et *tcf* y sont impliqués (Fig. 15). Encore une fois, certains fimbriae, lorsque mutés, provoquent une augmentation (*bcf*, *csg*, *ste* et *stg*) ou une diminution (*fim*, *stb* et *tcf*) du pourcentage d'invasion (Fig. 14). Les fimbriae *ste*, *stg* et *tcf*, qui sont uniques au sérovar Typhi, sont impliqués également dans l'invasion. Les résultats d'invasion sont présentés en taux par rapport aux résultats d'adhérence afin d'éliminer les effets d'adhérence qui pourraient ainsi masquer les effets de l'invasion. Cette méthode d'analyse ne fournis pas de corrélation entre les résultats d'adhérence et d'invasion

Curieusement, les résultats obtenus démontrent que certains fimbriae aurait un rôle anti-adhérence ou anti-invasion. Cependant, puisque *S. Typhi* possède un répertoire varié et unique de fimbriae, il est possible que ceux-ci ne travaillent pas tous collectivement. Il se

pourrait que certains travaillent conjointement alors que d'autres soient utilisés pour masquer les effets ou ralentir le processus d'adhésion ou d'invasion. Aussi, la régulation d'un fimbriae pourrait affecter la régulation d'un autre. Par exemple, puisque le fimbriae *fim* est le seul à avoir été observé *in vitro* (48, 93), il est possible que son expression soit privilégiée au détriment des autres fimbriae. En ce sens, une mutation du fimbriae *fim* permettrait l'expression de fimbriae qui sont normalement inhibés. Certains fimbriae ne semblent pas impliqués dans l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales (*sta* et *stc*) (Fig. 14 et 15). Puisque les récepteurs pour les fimbriae de *S. Typhi* n'ont pas été identifiés, il est probable que certains fimbriae soient spécifiques à certains types cellulaires retrouvés notamment lors de la phase systémique de l'infection.

#### **4. Phagocytose et survie dans les macrophages**

Le rôle des fimbriae de *S. Typhi* dans le processus de phagocytose est également mal connu. Ici, les résultats démontrent que les fimbriae *fim*, *pil*, *saf*, *sef*, *sta*, *stb*, *stc*, *std*, *ste*, *stg*, *sth* et *tcf* sont impliqués, soit dans le processus de phagocytose ou soit dans le processus de survie dans les macrophages. L'analyse des résultats porte à croire que certains fimbriae de *S. Typhi* auraient un rôle anti-phagocytaire puisque la majorité des mutations provoquent une augmentation de la phagocytose (*fim*, *pil*, *sta*, *stb*, *std*, *ste*, et *sth*) (Fig. 17). D'un autre côté, certaines mutations ont provoqué une diminution de la phagocytose, ce qui porte à croire que les fimbriae *saf*, *stg* et *tcf* aurait un rôle servant à provoquer ou a aider la phagocytose (Fig 17).

Une fois dans les macrophages, la bactérie *S. Typhi* adapte son environnement afin d'y survivre et cette capacité est unique et essentielle à *S. Typhi* (45). Certaines mutations ont provoqué des effets au niveau de la survie dans les macrophages. Ces effets pourraient signifier que les fimbriae de *S. Typhi* sont impliqués dans la phase intracellulaire de l'infection. Les fimbriae *saf*, *sef* et *std* semblent contribuer à la survie de *S. Typhi* puisqu'une mutation d'un des ces fimbriae provoque une diminution du taux de survie (Fig. 18). D'autre part, les fimbriae *stc* et *stg* une fois mutés provoquent une augmentation du taux de survie (Fig. 18).

Il est important de noter que très peu d'études portant sur les fimbriae de *S. Typhi* ont été réalisées et que les connaissances sur la régulation des fimbriae lors de l'infection de culture de cellules épithéliales ou de macrophages sont insuffisantes. Ainsi, il est probable que la mutation de ces fimbriae provoque des modifications au niveau de la régulation fimbriaire, mais aussi dans d'autres voies de régulation. Donc les mutations peuvent être bénéfiques ou néfastes lors d'infection de cellules, mais sans que l'effet soit relié à la présence ou à l'absence du fimbriae à la surface cellulaire. Selon d'autres études réalisées par notre laboratoire, les fimbriae *bcf*, *csg* et *stb*, lorsque mutés, provoquent une diminution du taux de phagocytose et de survie dans les macrophages lors d'essai de compétition (159). Lors d'un essai de compétition, les mutations peuvent provoquer des phénotypes n'ayant pas été démontrés avant puisque les mutants sont soumis à une pression de sélection beaucoup plus forte que lors d'une infection régulière. Il serait donc intéressant de faire des essais de compétition pour chaque mutant. Aussi, les résultats présentés dans cette étude indiquent que le fimbriae *csg* ne semble pas impliqué lors

d'interactions avec les macrophages. Toutefois, le transcriptome de *S. Typhi* lors d'infections de macrophages révèle que *csg* est exprimé dans ces conditions (55). Puisque *csg* participe à de nombreuses voies de régulation, il serait intéressant d'approfondir les recherches et de découvrir quel rôle joue *csg* dans les macrophages. Aussi, la détection d'anticorps anti-*bcf*, anti-*csg* et anti-*stb* dans le sang de patients atteints de typhoïde suggère fortement que ces fimbriae sont exprimés dans la phase systémique de l'infection (29, 84, 92). Il est probable que les récepteurs pour ces fimbriae se trouvent sur des cellules d'organes profonds rencontrés lors de l'infection systémique et non sur les cellules épithéliales. Ceci expliquerait pourquoi nous n'avons pas vu d'effets provoqués par la mutation de certaines fimbriae.

## 5. Infections de cellules humaines avec les souches afimbriaires

Les infections réalisées avec les mutants afimbriaires dépourvus de systèmes d'adhésion mais aussi de flagelles et de capsules fournissent des résultats intéressants. Les flagelles sont impliqués dans la virulence et contribuent à l'infection de cellules épithéliales chez *S. Typhi* (119, 197). Les résultats obtenus par notre laboratoire sont donc conséquents avec les travaux publiés préalablement (Fig. 16). Aussi selon certaines études, la capsule devrait diminuer l'adhésion en cachant certains systèmes d'adhésion et une mutation devrait augmenter l'invasion (17). Nos résultats illustrent qu'une mutation de *tviB* modifie peu l'adhérence et l'invasion. Toutefois, la mutation de tous les systèmes d'adhésion jumelée à la mutation de la capsule ( $\Delta 14\Delta tviB$ ) produit une diminution de l'invasion (Fig. 16 B). Ces résultats tendent encore une fois à prouver que les systèmes d'adhésion de *S. typhi* sont impliqués dans l'invasion de cellules épithéliales.

L'implication des flagelles dans les macrophages n'est pas documentée. Selon notre laboratoire, les flagelles seraient importantes lors de la phagocytose, mais non impliqués lors de la survie dans les macrophages. Puisque l'entrée à l'intérieur des macrophages est essentielle à l'établissement de l'infection systémique, il est possible que les flagelles dirigent les bactéries vers les macrophages afin d'assurer leur phagocytose. Selon nos résultats, les flagelles sont importants pour la phagocytose, mais lorsque tous les systèmes d'adhésion sont absents, une mutation des flagelles ne cause plus de phénotype aussi prononcé ( $\Delta 14\Delta fliC$  Fig. 19). Ce résultat est cohérent avec le rôle anti-phagocytaire proposé pour plusieurs fimbriae (Fig. 17). D'autre part, selon certaines études, la capsule de *S. Typhi* est essentielle à la survie dans les phagocytes (86). Toutefois les mutants pour la capsule sont plus phagocytés, mais ne sont pas éliminés par les macrophages (Fig. 19). Finalement chez le mutant  $\Delta 14\Delta fliC\Delta tviB$ , l'absence des flagelles permettant de diriger la souche vers les macrophages semble être d'avantage un facteur nuisible que l'absence de capsule et de systèmes d'adhésion pour la phagocytose de la bactérie. Encore une fois, la régulation croisée entre les différents systèmes d'adhésion, l'expression des flagelles et de la capsule pourraient être à l'origine des phénotypes observés et méritent une investigation plus approfondie.

## **6. Les effets d'une souche dépourvue de systèmes d'adhésion**

La création d'un mutant totalement dépourvu de système d'adhésion ne démontre pas de phénotypes très accentués. Cette souche ne présente que très peu d'effets sur l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales. Il est possible que l'absence de système fimbriaire provoque l'expression ou le désencombrement stérique autour d'adhésines non

fimbriaires qui peuvent pallier pour l'absence des fimbriae. *S. Typhi* possède certaines adhésines non-fimbriaires dont STY0405, STY0351 (appelé T2544 (68)), PagC et des systèmes de sécrétion de type 1-5 et 6. Le SST1, retrouvé sur le SPI-4 est exprimé et important durant la phase intestinale de l'infection (66). Aussi parmi les SST5, l'adhésine SdhA, même si pseudogène chez *S. Typhi*, semble être impliquée dans la virulence (84, 147). La présence d'autant de systèmes d'adhésion chez *S. Typhi* démontre que cette étape est cruciale au développement de l'infection et qu'il est primordial de s'y intéresser. D'autre part, la souche dépourvue de système d'adhésion ( $\Delta 14$ ) est plus phagocytée que la souche sauvage. Ce résultat est cohérent avec les résultats démontrant que plusieurs mutants individuels étaient plus facilement phagocytés que la souche sauvage renforçant ainsi le rôle anti-phagocytaire possible de certains fimbriae. Puis finalement, la souche afimbriaire ( $\Delta 14$ ) survit aussi bien que la souche sauvage dans les macrophages. La souche afimbriaire ( $\Delta 14$ ) ne semble pas présenter de phénotype notable lors d'infections individuelles de cellules humaines. Néanmoins, l'essai de compétition entre la souche afimbriaire ( $\Delta 14$ ) et la souche sauvage (ISP1820Nal<sup>R</sup>) lors d'une co-infection de cellules épithéliales offre des résultats très surprenants. Effectivement, si les propriétés d'adhésion et d'invasion ne sont pas altérées pour la souche afimbriaire lors d'infections individuelles, cette dernière surpasse de 2 fois la souche sauvage en termes d'aptitude d'adhésion et d'invasion (Tab. VI). Il serait donc intéressant de procéder à des essais de compétition entre les différents mutants individuels et la souche sauvage.

La souche afimbriaire ne permet pas de révéler l'implication de chaque fimbriae lors de l'infection de cellules humaines et n'a pas été conçue dans ce but. Toutefois, cette



souche s'avère un outil puissant pour l'étude des fimbriae puisqu'elle pourra permettre l'expression contrôlée et l'observation d'un seul fimbriae à la fois.

## 7. Expression de fimbriae

La RT-PCR nous permet de découvrir que dans un bouillon LB incubé 16h avec agitation, les fimbriae *fim* et *sta* sont exprimés (Fig. 20). Toutefois, l'ajout de NaCl et l'absence d'agitation permet l'expression des fimbriae *fim*, *pil*, *sta*, *stb*, *stc*, *std*, *ste* et *tcf* (Fig. 21). Dans un milieu minimal (M63) sans fer, seul le fimbriae *sta* est exprimé (Fig. 22). Cependant, l'ajout de fer induit l'expression de trois autres fimbriae en plus de *sta* soit *fim*, *pil* et *stb* (Fig. 23). Lors d'une infection de cellules épithéliales le profil d'expression des divers fimbriae est différent. D'abord, dans le surnageant des cellules, *S. Typhi* exprime les fimbriae *saf*, *sta* et *tcf* (Fig. 24). Les bactéries ayant déjà adhérees aux cellules épithéliales après 90 minutes d'incubation expriment les fimbriae *fim* et *sta* (Fig. 25) puis ceux retrouvées dans les cellules après 180 minutes d'incubations expriment les fimbriae *fim*, *saf*, *stb* et *tcf* (Fig. 26). Certains de ces fimbriae tel que *pil*, *sta*, *ste* et *tcf* sont uniques à *S. Typhi*. Il est donc intéressant de voir qu'ils sont transcrits et possiblement impliqués lors d'infection de cellules épithéliales. Parmi les fimbriae exprimés lors des RT-PCR, *sef* et *ste* contiennent des pseudogènes. Une RT-PCR ne permet pas d'affirmer que ces fimbriae sont produit et fonctionnels à la surface de *S. Typhi*. Toutefois, les résultats de RT-PCR sont très intéressants puisqu'ils démontrent clairement que les différents fimbriae de *S. Typhi* sont exprimés indépendamment et en réponse aux différentes conditions de croissance. Aussi, une forte concentration en NaCl (0,3M), préalablement connu comme condition propice à l'induction du SPI-1 (2) semble aussi être inductrice de plusieurs fimbriae.

## 8. Essai de Biofilm

Les biofilms sont importants pour la virulence et la persistance de *S. Typhi* chez les porteurs asymptomatiques. Plusieurs facteurs de surface sont impliqués dans la formation de biofilms chez d'autres espèces tel que *fimH* chez *S. Typhimurium* et *csgD* chez *E. coli* et *S. Enteritidis* (19, 70, 142) Cependant, certaines études révèlent que les fimbriae *fim* ne seraient pas nécessaires à la formation de biofilms chez *S. Typhimurium* (37). Les flagelles sont aussi impliqués dans la formation de biofilms chez *S. Typhimurium* (37). Afin d'évaluer le rôle des fimbriae de *S. Typhi* dans la formation de biofilms notre laboratoire a procédé à un essai de biofilms en tubes (TBA) et les premiers résultats obtenus indiquent que les fimbriae *fim*, et les flagelles de *S. Typhi* sont importants pour la formation de biofilm (Fig. 27) Le fimbriae *csg* ne semble pas essentiel, mais tout de même impliqué (Fig. 27). Aussi, puisque la souche afimbriaire ( $\Delta 14$ ) présente une faible capacité à former des biofilms il serait intéressant d'investiguer la participation de chaque fimbriae de *S. typhi* à la formation de biofilm.

## 9. Surexpression d'opérons fimbriaires

Les essais de surexpression ont d'abord été réalisés dans le but d'optimiser une technique afin d'éventuellement surexprimer tous les fimbriae de *S. Typhi* dans la souche afimbriaire et ainsi pouvoir les caractériser plus spécifiquement. Cet outil nous permettrait d'observer l'expression à la surface en microscopie électronique et d'amplifier les phénotypes reliés aux fonctions et à l'expression de chaque fimbriae. Suite aux premiers résultats obtenus avec la souche  $\Delta 14 \Delta araBAD$  pBADstgTAT, il est clair que la mutation de l'opéron arabinose est favorable à l'induction du vecteur pBAD24 et à l'expression des

fimbriae à la surface (Fig. 28). Ce protocole pourra être répété afin de surexprimer chaque fimbriae dans la souche afimbriaire.

Tous ces résultats démontrent que les fimbriae de *S. Typhi* sont probablement fonctionnels et impliqués dans la virulence. En effet, la mutation de chaque fimbriae à provoquer un phénotype lors d'au moins un des tests présenté dans cette étude.

## Conclusion

Les objectifs de notre étude ont été atteints et ils ouvrent la porte à plusieurs autres questionnements et de nombreux projets. Cette étude a permis d'en apprendre davantage sur les différents systèmes d'adhésion de *S. Typhi*. Ceux-ci, qui étaient auparavant considérés comme inactifs et non impliqués dans la virulence, font maintenant partie des divers facteurs de virulence qui contribuent à faire de *S. typhi* un pathogène d'intérêt médical mondial. Il est primordial de s'intéresser à ces fimbriae puisque ces travaux ont permis d'affirmer qu'ils sont non seulement fonctionnels, mais impliqués dans la virulence de *S. Typhi*.

Nos travaux ont d'abord démontré que la mutation des systèmes d'adhésion entraîne des phénotypes de diminution (*csg*, *sef*, *std*, *ste*, *stg* et *sth*) et d'augmentation (*bcf*, *fim*, *saf* et *tcf*) de l'adhérence aux cellules épithéliales lors d'essai *in vitro*. Ces mêmes mutations ont aussi diminué (*fim*, *stb*, et *tcf*) ou augmenté (*bcf*, *csg*, *ste*, et *stg*) l'invasion dans les cellules épithéliales INT-407. Les différentes mutations ont aussi provoqué dans quelque cas (*saf*, *stg* et *tcf*) une diminution de la phagocytose par les macrophages THP-1, mais une augmentation de la phagocytose a été observée pour la plupart (*fim*, *pil*, *sta*, *stb*, *std*, *ste* et *sth*). De plus certains fimbriae de *S. Typhi* semblent impliqués dans la survie à l'intérieur des macrophages. Quelques mutants (*saf*, *sef* et *std*) ont produit une diminution alors que d'autre (*stc* et *stg*) ont provoqué une augmentation du taux de survie dans les macrophages humains.

Les analyses d'expression fournies par les tests de RT-PCR attestent d'une régulation fimbriaire complexe. Ces résultats indiquent que les fimbriae de *S. Typhi* répondent aux conditions environnementales et sont exprimés spécifiquement et séquentiellement selon l'évolution d'une infection de cellules humaines.

Nous avons également démontré qu'une souche afimbriaire, lorsque soumise à une compétition contre la souche sauvage, adhère et pénètre deux fois plus dans les cellules épithéliales. Ces résultats étonnants ouvrent la voie à une multitude de questions, de projets de recherches et de découvertes. En effet, la construction d'une souche afimbriaire s'avère un outil de recherche précieux qui nous permettra d'étudier plus en profondeur chaque système d'adhésion. Cette souche offre aussi les avantages de travailler dans le contexte de régulation de la souche parentale évitant ainsi les biais que pourrait causer l'utilisation d'une souche d'*E. coli* afimbriaire.

Pour finir, ce projet aura contribué à augmenter les connaissances et la compréhension des divers facteurs de virulence de *S. Typhi*.



## Bibliographie

1. **Abraham, S. N., J. D. Goguen, D. Sun, P. Klemm, and E. H. Beachey.** 1987. Identification of two ancillary subunits of *Escherichia coli* type 1 fimbriae by using antibodies against synthetic oligopeptides of fim gene products. *J Bacteriol* **169**:5530-5536.
2. **Aguirre, A., M. L. Cabeza, S. V. Spinelli, M. McClelland, E. Garcia Vescovi, and F. C. Soncini.** 2006. PhoP-induced genes within *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* **188**:6889-6898.
3. **Althouse, C., S. Patterson, P. Fedorka-Cray, and R. E. Isaacson.** 2003. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infect Immun* **71**:6446-6452.
4. **Arricau, N., D. Hermant, H. Waxin, C. Ecobichon, P. S. Duffey, and M. Y. Popoff.** 1998. The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol Microbiol* **29**:835-850.
5. **Baek, C. H., S. Wang, K. L. Roland, and R. Curtiss, 3rd.** 2009. Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) acts as a virulence repressor in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **191**:1278-1292.
6. **Baga, M., M. Norgren, and S. Normark.** 1987. Biogenesis of *E. coli* Pap pili: papH, a minor pilin subunit involved in cell anchoring and length modulation. *Cell* **49**:241-251.
7. **Balbontin, R., G. Rowley, M. G. Pucciarelli, J. Lopez-Garrido, Y. Wormstone, S. Lucchini, F. Garcia-Del Portillo, J. C. Hinton, and J. Casadesus.** 2006. DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **188**:8160-8168.
8. **Barnhart, M. M., and M. R. Chapman.** 2006. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* **60**:131-147.
9. **Barnhart, M. M., F. G. Sauer, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren.** 2003. Chaperone-subunit-usher interactions required for donor strand exchange during bacterial pilus assembly. *J Bacteriol* **185**:2723-2730.
10. **Bäumler, A. J.** 1997. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol* **5**:318-322.
11. **Bäumler, A. J., J. G. Kusters, I. Stojiljkovic, and F. Heffron.** 1994. *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect Immun* **62**:1623-1630.
12. **Bäumler, A. J., R. M. Tsohis, T. A. Ficht, and L. G. Adams.** 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **66**:4579-4587.

13. **Bergey, D. H., and J. G. Holt.** 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9 ed, Baltimore.
14. **Beuzon, C. R., G. Banks, J. Deiwick, M. Hensel, and D. W. Holden.** 1999. pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **33**:806-816.
15. **Bhan, M. K., R. Bahl, and S. Bhatnagar.** 2005. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet* **366**:749-762.
16. **Bian, Z., and S. Normark.** 1997. Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*. *EMBO J* **16**:5827-5836.
17. **Bishop, A., D. House, T. Perkins, S. Baker, R. Kingsley, and G. Dougan.** 2008. Interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion. *Microbiology* **154**:1914-1926.
18. **Blyn, L. B., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1990. Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential *dam* methylation states. *EMBO J* **9**:4045-4054.
19. **Boddicker, J. D., N. A. Ledeboer, J. Jagnow, B. D. Jones, and S. Clegg.** 2002. Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the *fimH* gene of the *fim* gene cluster. *Mol Microbiol* **45**:1255-1265.
20. **Boehm, A., and J. Vogel.** 2012. The *csgD* mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs. *Mol Microbiol* **84**:1-5.
21. **Brands, D. A.** 2005. *Salmonella* (Deadly Diseases & Epidemics). Chelsea House Publications, United States of America.
22. **Bravo, D., C. J. Blondel, A. Hoare, L. Leyton, M. A. Valvano, and I. Contreras.** 2011. Type IV(B) pili are required for invasion but not for adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhi into BHK epithelial cells in a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-independent manner. *Microb Pathog* **51**:373-377.
23. **Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan.** 2000. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* **38**:2465-2467.
24. **Brinton, C. C., Jr.** 1959. Non-flagellar appendages of bacteria. *Nature* **183**:782-786.
25. **Brinton, C. C., Jr.** 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Transactions of the New York Academy of Sciences* **27**:1003-1054.
26. **Burmolle, M., T. R. Thomsen, M. Fazli, I. Dige, L. Christensen, P. Homoe, M. Tvede, B. Nyvad, T. Tolker-Nielsen, M. Givskov, C. Moser, K. Kirketerp-Moller, H. K. Johansen, N. Hoiby, P. O. Jensen, S. J. Sorensen, and T. Bjarnsholt.** 2010. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**:324-336.



27. **Chan, K., C. C. Kim, and S. Falkow.** 2005. Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect. Immun.* **73**:5438-5449.
28. **Chapman, M. R., L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, and S. J. Hultgren.** 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**:851-855.
29. **Charles, R. C., A. Sheikh, B. Krastins, J. B. Harris, M. S. Bhuiyan, R. C. LaRocque, T. Logvinenko, D. A. Sarracino, I. T. Kudva, J. Eisenstein, M. J. Podolsky, A. Kalsy, W. A. Brooks, A. Ludwig, M. John, S. B. Calderwood, F. Qadri, and E. T. Ryan.** 2010. Characterization of anti-*Salmonella enterica* serotype Typhi antibody responses in bacteremic Bangladeshi patients by an immunoaffinity proteomics-based technology. *Clin Vaccine Immunol* **17**:1188-1195.
30. **Chessa, D., M. G. Winter, M. Jakomin, and A. J. Baumler.** 2009. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha(1,2)fucose residues in the cecal mucosa. *Mol Microbiol* **71**:864-875.
31. **Choudhury, D., A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, and S. D. Knight.** 1999. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **285**:1061-1066.
32. **Cooke, F. J., and J. Wain.** 2004. The emergence of antibiotic resistance in typhoid fever. *Travel medicine and infectious disease* **2**:67-74.
33. **Coombes, B. K., N. F. Brown, Y. Valdez, J. H. Brumell, and B. B. Finlay.** 2004. Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *The Journal of biological chemistry* **279**:49804-49815.
34. **Corcoran, C. P., and C. J. Dorman.** 2009. DNA relaxation-dependent phase biasing of the fim genetic switch in *Escherichia coli* depends on the interplay of H-NS, IHF and LRP. *Mol Microbiol* **74**:1071-1082.
35. **Craig, L., and J. Li.** 2008. Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol* **18**:267-277.
36. **Crawford, R. W., D. L. Gibson, W. W. Kay, and J. S. Gunn.** 2008. Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for *Salmonella* biofilm formation on gallstone surfaces. *Infect Immun* **76**:5341-5349.
37. **Crawford, R. W., K. E. Reeve, and J. S. Gunn.** 2010. Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. *J Bacteriol* **192**:2981-2990.
38. **Crawford, R. W., R. Rosales-Reyes, L. Ramirez-Aguilar Mde, O. Chapa-Azuela, C. Alpuche-Aranda, and J. S. Gunn.** 2010. Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:4353-4358.

39. **Crump, J. A., S. P. Luby, and E. D. Mintz.** 2004. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* **82**:346-353.
40. **Daigle, F., J. Graham, and R. r. Curtiss.** 2001. Identification of *Salmonella* typhi genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol Microbiol* **41**:1211-1222.
41. **Darwin, K. H., and V. L. Miller.** 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* **12**:405-428.
42. **Datsenko, K., and B. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-6645.
43. **Deiwick, J., T. Nikolaus, S. Erdogan, and M. Hensel.** 1999. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* **31**:1759-1773.
44. **Dodson, K. W., F. Jacob-Dubuisson, R. T. Striker, and S. J. Hultgren.** 1993. Outer-membrane PapC molecular usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:3670-3674.
45. **Dragunsky, E. M., E. Rivera, H. D. Hochstein, and I. S. Levenbook.** 1990. In vitro characterization of *Salmonella* typhi mutant strains for live oral vaccines. *Vaccine* **8**:263-268.
46. **Driessen, A. J., and N. Nouwen.** 2008. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annual review of biochemistry* **77**:643-667.
47. **du Plessis, D. J., N. Nouwen, and A. J. Driessen.** 2011. The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta* **1808**:851-865.
48. **Duguid, J. P., E. S. Anderson, and I. Campbell.** 1966. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *The Journal of pathology and bacteriology* **92**:107-138.
49. **Duguid, J. P., I. W. Smith, G. Dempster, and P. N. Edmunds.** 1955. Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *The Journal of pathology and bacteriology* **70**:335-348.
50. **Dutta, U., P. K. Garg, R. Kumar, and R. K. Tandon.** 2000. Typhoid carriers among patients with gallstones are at increased risk for carcinoma of the gallbladder. *The American journal of gastroenterology* **95**:784-787.
51. **Edwards, R., D. Schifferli, and S. Maloy.** 2000. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:1258-1262.
52. **Eisenstein, B. I.** 1981. Phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* is under transcriptional control. *Science* **214**:337-339.
53. **Ellermeier, G. D., and J. M. Schlauch.** 2006. The Genus *Salmonella*, p. p.123-158. *In* 1 (ed.), E. Rosenberg, M. M. Dworkin, E. Sttackebrandt, K. H. Schleifer, and F. S. (ed) ,*The Prokaryotes*, 3 ed. Springer, New York.

54. **Epstein, E. A., M. A. Reizian, and M. R. Chapman.** 2009. Spatial clustering of the curlin secretion lipoprotein requires curli fiber assembly. *J Bacteriol* **191**:608-615.
55. **Faucher, S., S. Porwollik, C. Dozois, M. McClelland, and F. Daigle.** 2006. Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1906-1911.
56. **Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Heffron.** 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **83**:5189-5193.
57. **Foley, S. L., and A. M. Lynne.** 2008. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of animal science* **86**:E173-187.
58. **Forest, C., S. P. Faucher, K. Poirier, S. Houle, C. M. Dozois, and F. Daigle.** 2007. Contribution of the *stg* fimbrial operon of *Salmonella enterica* serovar Typhi during interaction with human cells. *Infect. Immun.* **75**:5264-5271.
59. **Forest, C. G.** 2011. Etude fonctionnelle de l'opéron fimbriaire *stg* de *Salmonella enterica* sérovar Typhi. Université de Montréal, Montréal.
60. **Forest, C. G., and D. France.** 2012. Molecular armory of *S. Typhi*: deciphering the putative arsenal of our enemy. *In e. impression (ed.)*. In Tech.
61. **Fronzes, R., H. Remaut, and G. Waksman.** 2008. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J* **27**:2271-2280.
62. **Galán, J., and R. r. Curtiss.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:6383-6387.
63. **Galan, J. E.** 1999. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:46-50.
64. **Gally, D. L., J. Leathart, and I. C. Blomfield.** 1996. Interaction of FimB and FimE with the fim switch that controls the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **21**:725-738.
65. **Garcia-del Portillo, F., J. Foster, and B. Finlay.** 1993. Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* **61**:4489-4492.
66. **Gerlach, R., D. Jäckel, B. Stecher, C. Wagner, A. Lupas, W. Hardt, and M. Hensel.** 2007. *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* **9**:1834-1850.
67. **Gerstel, U., C. Park, and U. Romling.** 2003. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol Microbiol* **49**:639-654.
68. **Ghosh, S., K. Chakraborty, T. Nagaraja, S. Basak, H. Koley, S. Dutta, U. Mitra, and S. Das.** 2011. An adhesion protein of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for pathogenesis and potential target for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:3348-3353.

69. **Gibson, D. L., A. P. White, C. M. Rajotte, and W. W. Kay.** 2007. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella enteritidis*. *Microbiology* **153**:1131-1140.
70. **Gibson, D. L., A. P. White, S. D. Snyder, S. Martin, C. Heiss, P. Azadi, M. Surette, and W. W. Kay.** 2006. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *J Bacteriol* **188**:7722-7730.
71. **Gillies, R. R., and J. P. Duguid.** 1958. The fimbrial antigens of *Shigella flexneri*. *J Hyg (Lond)* **56**:303-318.
72. **Giron, J. A., A. G. Torres, E. Freer, and J. B. Kaper.** 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* **44**:361-379.
73. **Goldberg, M. D., M. Johnson, J. C. Hinton, and P. H. Williams.** 2001. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**:549-559.
74. **Griffin, A. J., L. X. Li, S. Voedisch, O. Pabst, and S. J. McSorley.** 2011. Dissemination of persistent intestinal bacteria via the mesenteric lymph nodes causes typhoid relapse. *Infect Immun* **79**:1479-1488.
75. **Guzman, L., D. Belin, M. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J Bacteriol* **177**:4121-4130.
76. **Hacker, J., and E. Carniel.** 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO reports* **2**:376-381.
77. **Hacker, J., B. Hochhut, B. Middendorf, G. Schneider, C. Buchrieser, G. Gottschalk, and U. Dobrindt.** 2004. Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria. *Int J Med Microbiol* **293**:453-461.
78. **Halula, M., and B. Stocker.** 1987. Distribution and properties of the mannose-resistant hemagglutinin produced by *Salmonella* species. *Microb Pathog* **3**:455-459.
79. **Hammar, M., Z. Bian, and S. Normark.** 1996. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6562-6566.
80. **Hammer, N. D., J. C. Schmidt, and M. R. Chapman.** 2007. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:12494-12499.
81. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
82. **Haraga, A., M. Ohlson, and S. Miller.** 2008. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**:53-66.
83. **Harris, J., A. Baresch-Bernal, S. Rollins, A. Alam, R. LaRocque, M. Bikowski, A. Peppercorn, M. Handfield, J. Hillman, F. Qadri, S. Calderwood, E. Hohmann, R.**

- Breiman, W. Brooks, and E. Ryan.** 2006. Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* **74**:5161-5168.
84. **Harris, J. B., A. Baresch-Bernal, S. M. Rollins, A. Alam, R. C. LaRocque, M. Bikowski, A. F. Peppercorn, M. Handfield, J. D. Hillman, F. Qadri, S. B. Calderwood, E. Hohmann, R. F. Breiman, W. A. Brooks, and E. T. Ryan.** 2006. Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect. Immun.* **74**:5161-5168.
85. **Heyns, K., Kiessling, G., Lindenberg, W., Paulsen, h. & Webster, M. E.** 1959. D-Galaktosaminuornsäure (2-amino-2-desoxy-D-galakturonsäure) als Baustein des Vi-Antigens. *Chemische Berichte* **92**:2435-2437.
86. **Hirose, K., T. Ezaki, M. Miyake, T. Li, A. Khan, Y. Kawamura, H. Yokoyama, and T. Takami.** 1997. Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted *Salmonella typhi* strains in cultured macrophage expressing different levels of CD14 antigen. *FEMS Microbiol Lett* **147**:259-265.
87. **Hoiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, and O. Ciofu.** 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents* **35**:322-332.
88. **Holden, N. J., M. Totsika, E. Mahler, A. J. Roe, K. Catherwood, K. Lindner, U. Dobrindt, and D. L. Gally.** 2006. Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **152**:1143-1153.
89. **Holmqvist, E., J. Reimegard, M. Sterk, N. Grantcharova, U. Romling, and E. G. Wagner.** 2010. Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *EMBO J* **29**:1840-1850.
90. **House, D., A. Bishop, C. Parry, G. Dougan, and J. Wain.** 2001. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr Opin Infect Dis* **14**:573-578.
91. **Houwink, A. L., and I. W. van.** 1950. Electron microscopical observations on bacterial cytology; a study on flagellation. *Biochim Biophys Acta* **5**:10-44.
92. **Hu, Y., Y. Cong, S. Li, X. Rao, G. Wang, and F. Hu.** 2009. Identification of in vivo induced protein antigens of *Salmonella enterica* serovar Typhi during human infection. *Sci China C Life Sci* **52**:942-948.
93. **Humphries, A. D., M. Raffatellu, S. Winter, E. H. Weening, R. A. Kingsley, R. Droleskey, S. Zhang, J. Figueiredo, S. Khare, J. Nunes, L. G. Adams, R. M. Tsois, and A. J. Baumler.** 2003. The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Mol Microbiol* **48**:1357-1376.
94. **Humphries, A. D., S. M. Townsend, R. A. Kingsley, T. L. Nicholson, R. M. Tsois, and A. J. Baumler.** 2001. Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol Lett* **201**:121-125.

95. **Janis, C., A. J. Grant, T. J. McKinley, F. J. Morgan, V. F. John, J. Houghton, R. A. Kingsley, G. Dougan, and P. Mastroeni.** 2011. In vivo regulation of the Vi antigen in *Salmonella* and induction of immune responses with an in vivo-inducible promoter. *Infect Immun* **79**:2481-2488.
96. **Jones, B., N. Ghori, and S. Falkow.** 1994. *Salmonella* typhimurium initiates murine infection by destroying and penetrating the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**:15-23.
97. **Kader, A., R. Simm, U. Gerstel, M. Morr, and U. Romling.** 2006. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **60**:602-616.
98. **Kaniga, K., M. S. Compton, R. Curtiss, 3rd, and P. Sundaram.** 1998. Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* **66**:5599-5606.
99. **Klemm, P.** 1986. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J* **5**:1389-1393.
100. **Klemm, P., and G. Christiansen.** 1987. Three *fim* genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet* **208**:439-445.
101. **Klemm, P., B. J. Jorgensen, I. van Die, H. de Ree, and H. Bergmans.** 1985. The *fim* genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*, cloning and genetic organization. *Mol Gen Genet* **199**:410-414.
102. **Klumpp, J., and T. Fuchs.** 2007. Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella* typhimurium replication in macrophages. *Microbiology* **153**:1207-1220.
103. **Kohbata, S., H. Yokoyama, and E. Yabuuchi.** 1986. Cytopathogenic effects of *Salmonella* typhi GIFU 10007 on M cells off murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol. Immunol.* **30**:1225-1237.
104. **Kolyva, S., H. Waxin, and M. Y. Popoff.** 1992. The Vi antigen of *Salmonella* typhi: molecular analysis of the *viaB* locus. *J Gen Microbiol* **138**:297-304.
105. **Korea, C., R. Badouraly, M. Prevost, J. Ghigo, and C. Beloin.** 2010. *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environ Microbiol* **12**:1957-1977.
106. **Kossack, R., R. Guerrant, P. Densen, J. Schadelin, and G. Mandell.** 1981. Diminished neutrophil oxidative metabolism after phagocytosis of virulent *Salmonella* typhi. *Infect Immun* **31**:674-678.
107. **Kuhle, V., and M. Hensel.** 2004. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* **61**:2812-2826.

108. **Kukkonen, M., T. Raunio, R. Virkola, K. Lahteenmaki, P. H. Makela, P. Klemm, S. Clegg, and T. K. Korhonen.** 1993. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Mol Microbiol* **7**:229-237.
109. **Kumar, S., S. Kumar, and S. Kumar.** 2006. Infection as a risk factor for gallbladder cancer. *Journal of surgical oncology* **93**:633-639.
110. **Kusters, J. G., G. A. Mulders-Kremers, C. E. van Doornik, and B. A. van der Zeijst.** 1993. Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **61**:5013-5020.
111. **Lai, C. W., R. C. Chan, A. F. Cheng, J. Y. Sung, and J. W. Leung.** 1992. Common bile duct stones: a cause of chronic salmonellosis. *The American journal of gastroenterology* **87**:1198-1199.
112. **Lambert, M., and S. Smith.** 2008. The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol* **8**:142.
113. **Lawley, T. D., K. Chan, L. J. Thompson, C. C. Kim, G. R. Govoni, and D. M. Monack.** 2006. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* **2**:e11.
114. **Ledeboer, N. A., J. G. Frye, M. McClelland, and B. D. Jones.** 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infect Immun* **74**:3156-3169.
115. **Levine, M. M., R. E. Black, and C. Lanata.** 1982. Precise estimation of the numbers of chronic carriers of *Salmonella typhi* in Santiago, Chile, an endemic area. *J Infect Dis* **146**:724-726.
116. **Li, H., L. Qian, Z. Chen, D. Thibault, G. Liu, T. Liu, and D. G. Thanassi.** 2004. The outer membrane usher forms a twin-pore secretion complex. *J Mol Biol* **344**:1397-1407.
117. **Libby, S. J., M. A. Brehm, D. L. Greiner, L. D. Shultz, M. McClelland, K. D. Smith, B. T. Cookson, J. E. Karlinsey, T. L. Kinkel, S. Porwollik, R. Canals, L. A. Cummings, and F. C. Fang.** 2010. Humanized nonobese diabetic-scid IL2rgammanull mice are susceptible to lethal *Salmonella Typhi* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:15589-15594.
118. **Lillehoj, E. P., B. T. Kim, and K. C. Kim.** 2002. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **282**:L751-756.
119. **Liu, S. L., T. Ezaki, H. Miura, K. Matsui, and E. Yabuuchi.** 1988. Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infect Immun* **56**:1967-1973.
120. **Liu, W., Y. Feng, Y. Wang, Q. Zou, F. Chen, J. Guo, Y. Peng, Y. Jin, Y. Li, S. Hu, R. Johnston, G. Liu, and S. Liu.** 2009. *Salmonella paratyphi C*: genetic divergence

- from *Salmonella choleraesuis* and pathogenic convergence with *Salmonella typhi*. *PLoS ONE* **4**:e4510.
121. **Loferer, H., M. Hammar, and S. Normark.** 1997. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. *Mol Microbiol* **26**:11-23.
  122. **Looney, R., and R. Steigbigel.** 1986. Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense in vitro. *J Lab Clin Med* **108**:506-516.
  123. **Low, A., N. Holden, T. Rosser, A. Roe, C. Constantinidou, J. Hobman, D. Smith, J. Low, and D. Gally.** 2006. Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environ Microbiol* **8**:1033-1047.
  124. **Lyczak, J., and G. Pier.** 2002. *Salmonella enterica* serovar typhi modulates cell surface expression of its receptor, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, on the intestinal epithelium. *Infect Immun* **70**:6416-6423.
  125. **Mappingire, O. S., N. S. Henderson, G. Duret, D. G. Thanassi, and A. H. Delcour.** 2009. Modulating effects of the plug, helix, and N- and C-terminal domains on channel properties of the PapC usher. *J Biol Chem* **284**:36324-36333.
  126. **Mattick, J. S.** 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**:289-314.
  127. **McClelland, M., K. Sanderson, J. Spieth, S. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-856.
  128. **McFarland, K. A., S. Lucchini, J. C. Hinton, and C. J. Dorman.** 2008. The leucine-responsive regulatory protein, Lrp, activates transcription of the fim operon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium via the *fimZ* regulatory gene. *J Bacteriol* **190**:602-612.
  129. **Merselis, J. G., Jr., D. Kaye, C. S. Connolly, and E. W. Hook.** 1964. THE TYPHOID CARRIER STATE: QUANTITATIVE BACTERIOLOGY AND PRELIMINARY OBSERVATIONS ON THERAPY. *East African medical journal* **41**:219-227.
  130. **Mika, F., S. Busse, A. Possling, J. Berkholz, N. Tschowri, N. Sommerfeldt, M. Pruteanu, and R. Hengge.** 2012. Targeting of *csgD* by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **84**:51-65.
  131. **Muller, C. M., A. Aberg, J. Straseviciene, L. Emody, B. E. Uhlin, and C. Balsalobre.** 2009. Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS Pathog* **5**:e1000303.



132. **Mulvey, M. A., J. D. Schilling, and S. J. Hultgren.** 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* **69**:4572-4579.
133. **Muscas, P., G. M. Rossolini, A. Chiesurin, A. Santucci, and G. Satta.** 1994. Purification and characterization of type 1 fimbriae of *Salmonella typhi*. *Microbiol Immunol* **38**:353-358.
134. **Narita, S., S. Matsuyama, and H. Tokuda.** 2004. Lipoprotein trafficking in *Escherichia coli*. *Archives of microbiology* **182**:1-6.
135. **Nath, G., Y. K. Singh, P. Maurya, A. K. Gulati, R. C. Srivastava, and S. K. Tripathi.** 2010. Does *Salmonella Typhi* primarily reside in the liver of chronic typhoid carriers? *Journal of infection in developing countries* **4**:259-261.
136. **Nenninger, A. A., L. S. Robinson, N. D. Hammer, E. A. Epstein, M. P. Badtke, S. J. Hultgren, and M. R. Chapman.** 2011. CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation. *Mol Microbiol* **81**:486-499.
137. **Nenninger, A. A., L. S. Robinson, and S. J. Hultgren.** 2009. Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:900-905.
138. **Nicholson, B., and D. Low.** 2000. DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **35**:728-742.
139. **Nishiyama, M., T. Ishikawa, H. Rechsteiner, and R. Glockshuber.** 2008. Reconstitution of pilus assembly reveals a bacterial outer membrane catalyst. *Science* **320**:376-379.
140. **Nuccio, S., and A. Bäuml.** 2007. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:551-575.
141. **Ochman, H., and A. C. Wilson.** 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *Journal of molecular evolution* **26**:74-86.
142. **Ogasawara, H., K. Yamamoto, and A. Ishihama.** 2011. Role of the biofilm master regulator CsgD in cross-regulation between biofilm formation and flagellar synthesis. *J Bacteriol* **193**:2587-2597.
143. **Olsen, A., A. Arnquist, M. Hammer, S. Sukupolvi, and S. Normark.** 1993. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcription repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **7**:523-536.
144. **Opel, M. L., S. M. Arfin, and G. W. Hatfield.** 2001. The effects of DNA supercoiling on the expression of operons of the *ilv* regulon of *Escherichia coli* suggest a physiological rationale for divergently transcribed operons. *Mol Microbiol* **39**:1109-1115.
145. **Ottow, J. C.** 1975. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu Rev Microbiol* **29**:79-108.

146. **Paranchych, W., and L. S. Frost.** 1988. The physiology and biochemistry of pili. *Adv Microb Physiol* **29**:53-114.
147. **Parkhill, J., G. Dougan, K. James, N. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. Mungall, S. Bentley, M. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. Barrell.** 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**:848-852.
148. **Parry, C. M., T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White, and J. J. Farrar.** 2002. Typhoid fever. *N Engl J Med* **347**:1770-1782.
149. **Pier, G., M. Grout, T. Zaidi, G. Meluleni, S. Mueschenborn, G. Banting, R. Ratcliff, M. Evans, and W. Colledge.** 1998. *Salmonella* Typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* **393**:79-82.
150. **Popoff, M. Y., J. Bockemuhl, and L. L. Gheesling.** 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* **155**:568-570.
151. **Porwollik, S., and M. McClelland.** 2003. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* **5**:977-989.
152. **Ramos, H. C., M. Rumbo, and J. C. Sirard.** 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* **12**:509-517.
153. **Remaut, H., R. Rose, T. Hannan, S. Hultgren, S. Radford, A. Ashcroft, and G. Waksman.** 2006. Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly proceeds through a concerted beta strand displacement mechanism. *Mol Cell* **22**:831-842.
154. **Remaut, H., C. Tang, N. S. Henderson, J. S. Pinkner, T. Wang, S. J. Hultgren, D. G. Thanassi, G. Waksman, and H. Li.** 2008. Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell* **133**:640-652.
155. **Roberts, M., S. M. Chatfield, and G. Dougan.** 1994. *Salmonella* as carriers of heterologous antigens, p. p. 27-48. In O. H. D. T (ed.), *Novel delivery systems for oral vaccines*. CRC Press, Inc.
156. **Robinson, L. S., E. M. Ashman, S. J. Hultgren, and M. R. Chapman.** 2006. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol Microbiol* **59**:870-881.
157. **Russell, P. W., and P. E. Orndorff.** 1992. Lesions in two *Escherichia coli* type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding. *J Bacteriol* **174**:5923-5935.
158. **Sabbagh, S., C. Forest, C. Lepage, J. Leclerc, and F. Daigle.** 2010. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett*.

159. **Sabbagh, S., C. Lepage, M. McClelland, and F. Daigle.** 2012. Selection of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Genes Involved during Interaction with Human Macrophages by Screening of a Transposon Mutant Library. PLoS ONE.
160. **Saini, S., J. M. Slauch, P. D. Aldridge, and C. V. Rao.** 2010. Role of cross talk in regulating the dynamic expression of the flagellar *Salmonella* pathogenicity island 1 and type 1 fimbrial genes. J Bacteriol **192**:5767-5777.
161. **Saldana, Z., J. Xicohtencatl-Cortes, F. Avelino, A. D. Phillips, J. B. Kaper, J. L. Puente, and J. A. Giron.** 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**:992-1006.
162. **Salih, O., H. Remaut, G. Waksman, and E. Orlova.** 2008. Structural analysis of the Saf pilus by electron microscopy and image processing. J Mol Biol **379**:174-187.
163. **Satta, G., L. Ingianni, P. Muscas, A. Rossolini, and R. Pompei.** 1993. The pathogenicity determinants of *Salmonella typhi*: potential role of fimbrial structures, p. 83-90. In F. Cabello, C. Hormaeche, P. Mastroeni, and L. Bonina (ed.), *Biology of Salmonella*. Plenum Press, New York.
164. **Sauer, F. G., K. Fütterer, J. S. Pinkner, K. W. Dodson, S. J. Hultgren, and G. Waksman.** 1999. Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. Science **285**:1058-1061.
165. **Sauer, F. G., J. S. Pinkner, G. Waksman, and S. J. Hultgren.** 2002. Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. Cell **111**:543-551.
166. **Sauer, F. G., H. Remaut, S. J. Hultgren, and G. Waksman.** 2004. Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. Biochim Biophys Acta **1694**:259-267.
167. **Saulino, E. T., E. Bullitt, and S. J. Hultgren.** 2000. Snapshots of usher-mediated protein secretion and ordered pilus assembly. Proc Natl Acad Sci U S A **97**:9240-9245.
168. **Saulino, E. T., D. G. Thanassi, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren.** 1998. Ramifications of kinetic partitioning on usher-mediated pilus biogenesis. EMBO J **17**:2177-2185.
169. **Segura, I., J. Casadesús, and F. Ramos-Morales.** 2004. Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. J Microbiol Methods **56**:83-91.
170. **Sheikh, J., S. Hicks, M. Dall'Agnol, A. D. Phillips, and J. P. Nataro.** 2001. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. Mol Microbiol **41**:983-997.
171. **Shelobolina, E. S., S. A. Sullivan, K. R. O'Neill, K. P. Nevin, and D. R. Lovley.** 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated

- subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. Appl Environ Microbiol **70**:2959-2965.
172. **Shpargel, J. S., R. S. Berardi, and D. Lenz.** 1985. *Salmonella* typhi carrier state 52 years after illness with typhoid fever: a case study. American journal of infection control **13**:122-123.
173. **Smyth, C.** 1988. Assay for fimbrial adhesins, p. 223-240. In P. F. Owen, T.J. (ed.), Immunochemical and molecular genetic analysis of bacterial pathogens. Elsevier Science.
174. **Sommerfeldt, N., A. Possling, G. Becker, C. Pesavento, N. Tschowri, and R. Hengge.** 2009. Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. Microbiology **155**:1318-1331.
175. **Stoebel, D. M., A. Free, and C. J. Dorman.** 2008. Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. Microbiology **154**:2533-2545.
176. **Strom, M. S., and S. Lory.** 1993. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. Annu Rev Microbiol **47**:565-596.
177. **Su, L. H., and C. H. Chiu.** 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung medical journal **30**:210-219.
178. **Tasteyre, A., M. C. Barc, A. Collignon, H. Boureau, and T. Karjalainen.** 2001. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. Infect Immun **69**:7937-7940.
179. **Tessier, M. C., R. Graveline, C. Crost, J. A. Desabrais, C. Martin, M. Drolet, and J. Harel.** 2007. Effects of DNA supercoiling and topoisomerases on the expression of genes coding for F165(1), a P-like fimbriae. FEMS Microbiol Lett **277**:28-36.
180. **Thomason, M. K., F. Fontaine, N. De Lay, and G. Storz.** 2012. A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **84**:17-35.
181. **Tinker, J. K., and S. Clegg.** 2000. Characterization of FimY as a coactivator of type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Infect Immun **68**:3305-3313.
182. **Tinker, J. K., L. S. Hancox, and S. Clegg.** 2001. FimW is a negative regulator affecting type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. J Bacteriol **183**:435-442.
183. **Torres, A. G., L. Milflores-Flores, J. G. Garcia-Gallegos, S. D. Patel, A. Best, R. M. La Ragione, Y. Martinez-Laguna, and M. J. Woodward.** 2007. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. Int J Med Microbiol **297**:177-185.
184. **Townsend, S., N. Kramer, R. Edwards, S. Baker, N. Hamlin, M. Simmonds, K. Stevens, S. Maloy, J. Parkhill, G. Dougan, and A. Bäumlner.** 2001. *Salmonella*

- enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* **69**:2894-2901.
185. **Tran, Q. T., G. Gomez, S. Khare, S. D. Lawhon, M. Raffatellu, A. J. Baumler, D. Ajithdoss, S. Dhavala, and L. G. Adams.** 2010. The *Salmonella enterica* serotype Typhi Vi capsular antigen is expressed after the bacterium enters the ileal mucosa. *Infect Immun* **78**:527-535.
  186. **Tsui, I. S., C. M. Yip, J. Hackett, and C. Morris.** 2003. The type IVB pili of *Salmonella enterica* serovar Typhi bind to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infect Immun* **71**:6049-6050.
  187. **Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. Bäumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W. Parks, and F. Fang.** 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**:804-808.
  188. **Verger, D., E. Miller, H. Remaut, G. Waksman, and S. Hultgren.** 2006. Molecular mechanism of P pilus termination in uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO reports* **7**:1228-1232.
  189. **Vetsch, M., D. Erilov, N. Moliere, M. Nishiyama, O. Ignatov, and R. Glockshuber.** 2006. Mechanism of fibre assembly through the chaperone-usher pathway. *EMBO reports* **7**:734-738.
  190. **Waksman, G., and S. J. Hultgren.** 2009. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **7**:765-774.
  191. **Wang, R. F., and S. R. Kushner.** 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**:195-199.
  192. **Waterman, S. R., and D. W. Holden.** 2003. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* **5**:501-511.
  193. **Weening, E. H., J. D. Barker, M. C. Laarakker, A. D. Humphries, R. M. Tsois, and A. J. Baumler.** 2005. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect Immun* **73**:3358-3366.
  194. **Wilson, R. P., M. Raffatellu, D. Chessa, S. E. Winter, C. Tukel, and A. J. Baumler.** 2008. The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cell Microbiol* **10**:876-890.
  195. **Wilson, R. P., S. E. Winter, A. M. Spees, M. G. Winter, J. H. Nishimori, J. F. Sanchez, S. P. Nuccio, R. W. Crawford, C. Tukel, and A. J. Baumler.** 2011. The Vi capsular polysaccharide prevents complement receptor 3-mediated clearance of *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infect Immun* **79**:830-837.
  196. **Winter, S. E., P. Thiennimitr, S. P. Nuccio, T. Haneda, M. G. Winter, R. P. Wilson, J. M. Russell, T. Henry, Q. T. Tran, S. D. Lawhon, G. Gomez, C. L. Bevins, H. Russmann, D. M. Monack, L. G. Adams, and A. J. Baumler.** 2009. Contribution of

- flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype typhimurium infection. *Infect Immun* **77**:1904-1916.
197. **Winter, S. E., M. G. Winter, P. Thiennimitr, V. A. Gerriets, S. P. Nuccio, H. Russmann, and A. J. Baumler.** 2009. The TviA auxiliary protein renders the *Salmonella enterica* serotype Typhi RcsB regulon responsive to changes in osmolarity. *Mol Microbiol* **74**:175-193.
  198. **Wright, K. J., P. C. Seed, and S. J. Hultgren.** 2007. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol* **9**:2230-2241.
  199. **Yeh, K. S., L. S. Hancox, and S. Clegg.** 1995. Construction and characterization of a *fimZ* mutant of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**:6861-6865.
  200. **Young, G. M., J. L. Badger, and V. L. Miller.** 2000. Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **68**:4323-4326.
  201. **Young, G. M., D. H. Schmiel, and V. L. Miller.** 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:6456-6461.
  202. **Yu, X. J., M. Liu, and D. W. Holden.** 2004. SsaM and SpiC interact and regulate secretion of *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system effectors and translocators. *Mol Microbiol* **54**:604-619.
  203. **Zavialov, A. V., J. Berglund, A. F. Pudney, L. J. Fooks, T. M. Ibrahim, S. MacIntyre, and S. D. Knight.** 2003. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. *Cell* **113**:587-596.
  204. **Zhang, X. L., I. S. Tsui, C. M. Yip, A. W. Fung, D. K. Wong, X. Dai, Y. Yang, J. Hackett, and C. Morris.** 2000. *Salmonella enterica* serovar typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **68**:3067-3073.
  205. **Zhao, L., T. Ezak, Z. Y. Li, Y. Kawamura, K. Hirose, and H. Watanabe.** 2001. Vi-Suppressed wild strain *Salmonella typhi* cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches. *Microbiol. Immunol.* **45**:149-158.

## Annexe

**Tableau VIII: Liste des amorces utilisées pour la création de mutants**

| Opéron     | Nom de l'amorce | Séquence   | Site de restriction |
|------------|-----------------|--|---------------------|
| <i>stg</i> | STGA-F          | 5' - CGG GAT CCG AGA TGA GAA TAA CGG AAT A - 3'          | BamHI               |
|            | STGA-R          | 5' - AAC TGC AGC CAG CAA ATG CCG TTT TGT T - 3'          | PstI                |
|            | STGD-F          | 5' - GCT CTA GAC ATT GAT ATG ACT TAT TTT G - 3'          | XbaI                |
|            | STGD-R          | 5' - AAC TGC AGG CCG CAG AGC TGT GAA ATT G - 3'          | PstI                |
| <i>sta</i> | StaAF           | 5' - AACTGCAGGCGTGAAGAGGAACTACT T - 3'                   | PstI                |
|            | StaAR           | 5' - GCT CTA GAA AAT AAT CAT GGA ACC AGT C - 3'          | XbaI                |
|            | StaGF           | 5' - AACTGCAGTTATCCAAAGCAGATTATGG - 3'                   | PstI                |
|            | StaGR           | 5' - CGGGATCCGCGTTAGCCTTTTCTGGCA - 3'                    | BamHI               |
| <i>saf</i> | safA-F          | 5' - CGG GAT CCG ACT GGC ATT CTA TTC CAC CCT G - 3'      | BamHI               |
|            | safA-R          | 5' - GTG GAC CTG CAG TTA TCA TGC TCA ACA CGC TTG - 3'    | chevauchement       |
|            | safD-F          | 5' - TGA TAA CTG CAC CTG GAC GCT GGA TTT TAA G - 3'      | chevauchement       |
|            | safD-R          | 5' - GCT CTA GAC CCG CTC ACA AAA GAG TGA ATC - 3'        | XbaI                |
| <i>fim</i> | FimAF           | 5'-CGGGATCCGATATCGAAACCGGGTGTGT-3'                       | BamHI               |
|            | FimAR-over      | 5'-ACCTACAGGGCATATTTGGTGCCTTC-3'                         | chevauchement       |
|            | FimWR-over      | 5'-ATACGCTGCCCTGTAGGTATCGTTACT-3'                        | chevauchement       |
|            | Fim WF          | 5'-GCTCTAGACTCAGCACGCATAAAGTG-3'                         | XbaI                |
| <i>tcf</i> | tcfAF prom      | 5'-gctctagaCATGATGATCAGTCTATTTGTGGC-3'                   | XbaI                |
|            | tcfAR over      | 5'-tgtcagggtAATTTCTGCCGCATGGGATA-3'                      | chevauchement       |
|            | tcfDF over      | 5'-gcagaaattACCCTGACAACACACCCTT-3'                       | chevauchement       |
|            | tcfDR           | 5'-aaggaaaaaagcggccgcAGCAGAACCTCACGCATTGA-3'             | NotI                |
| <i>csg</i> | csg F           | 5'-CGG GAT CCT GGG GCT AAT CTT TGG CTA T-3'              | BamHI               |
|            | csg R over      | 5'-AAC TCA ATC TAT GAA GTA CAG GCA GGC GT-3'             | chevauchement       |
|            | csg F over      | 5'-TAC TTC ATA GAT TGA GTT GTC TCG TCT TA-3'             | chevauchement       |
|            | csg R           | 5'-AAG GAA AAA AGC GGC CGC GCC TAT GGC AGG GAT ATT TT-3' | NotI                |
| <i>bcf</i> | Bcf F1          | 5'-cgggatcc act cagcagcttg agtagct-3'                    | BamHI               |
|            | Bcf R2          | 5'-acgtcattTGACGGTTGTAGTATCCGCT-3'                       | chevauchement       |
|            | Bcf F3          | 5'-CAACCGTCAgaatgacgtgggaaccttag-3'                      | chevauchement       |
|            | Bcf R4          | 5'-aaggaaaaaagcggccgc TGCTACGCGG TTCAGTCATA-3'           | NotI                |
| <i>stb</i> | Stb F1          | 5'-cgggatcc tgtgaattc tggcctgtct -3'                     | BamHI               |
|            | Stb R2          | 5'-gttattgccCGCCGAAAACAGCACTTGAT-3'                      | chevauchement       |
|            | Stb F3          | 5'-TTTTTCGGCGggcaataacacg acgggttt-3'                    | chevauchement       |
|            | Stb R4          | 5'-aaggaaaaaagcggccgc CAGGAGGGTATAGCTCACAT-3'            | NotI                |
| <i>stc</i> | STY2378-81 F1   | 5'-gctctaga TGTGACT GCCTTCACTA CC -3'                    | XbaI                |
|            | STY2378-81 R2   | 5'-gctgaaattAAGCGACT G CGCTGATCT AT-3'                   | chevauchement       |
|            | STY2378-81 F3   | 5'-cagtcgcttAATTCA GC GGTGTTTCG TAC-3'                   | chevauchement       |
|            | STY2378-81 R4   | 5'-aaggaaaaaagcggccgc GCGA TAACCTCCTG TCTATG -3'         | NotI                |
| <i>std</i> | stdA F1         | 5'-cgggatcc cgatgaaagttagctgct-3'                        | BamHI               |
|            | stdA R2         | 5'-TTAAGGGCA CCGCCATGGCAAGTATTATT-3'                     | chevauchement       |
|            | stdC F3         | 5'-CCATGGCGGTGCCCTTAAAGGCTGTCTG-3'                       | chevauchement       |
|            | stdC R4         | 5'-gctctaga atacctggctcaaccgata-3'                       | XbaI                |
| <i>ste</i> | steA F1         | 5'-cgggatcc ctatgcccatatccctga-3'                        | BamHI               |
|            | steA R2         | 5'-CTCTGCCAA CCGGAGACAATCCCATAAC-3'                      | chevauchement       |
|            | steD F3         | 5'-TGCTCCGG TTGGCAGAGGAAATACCAT-3'                       | chevauchement       |
|            | steD R4         | 5'-gctctaga ccagagcatcaatgcttt-3'                        | XbaI                |
| <i>sef</i> | sefA F1         | 5'-cgggatcc gcatcgcacagataaattg-3'                       | BamHI               |
|            | sefA R2         | 5'-GTCTTCTCC CTGCCTGAACCTCTGCTTTG-3'                     | chevauchement       |
|            | sefD F3         | 5'-TTCAGGCAG GGAGAAGACTGGCAACCAGA-3'                     | chevauchement       |
|            | sefD R4         | 5'-gctctaga atgccctaggaatgtcaagc-3'                      | XbaI                |
| <i>sth</i> | sthA F1         | 5'-cgggatcc cgtagaatagcgcctgctt-3'                       | BamHI               |
|            | sthA R2         | 5'-ccgTCAGTT TGTGGATGCTACGGCAGTTA-3'                     | chevauchement       |
|            | sthE F3         | 5'-GCATCCACA AACTGAcggatcacatttc-3'                      | chevauchement       |
|            | sthE R4         | 5'-gctctaga gccatctggactgtattcg-3'                       | XbaI                |
| <i>pil</i> | pilL F1         | 5'-cgggatcc gagcctaagccaaatctcc-3'                       | BamHI               |
|            | pilL R2         | 5'-CTCCTGTAG GCTGCTGACTCTGTGCAAAT-3'                     | chevauchement       |
|            | pilK F3         | 5'-GTCAGCAGC CTACAGGAGTGGCGGCTTAT-3'                     | chevauchement       |
|            | pilK R4         | 5'-gctctaga cgactgaaatcgactgaaa -3'                      | XbaI                |

**Tableau IX: Liste des amorces utilisées pour les essais de RT-PCR**

| Opéron     | Nom           | Séquence                                     | Site de restriction |
|------------|---------------|--|---------------------|
| <i>bcf</i> | bcfA ATG      | 5'-ccggaattcttatatttaaaggagcttgaatg-3'       | EcoR1               |
|            | bcf R2        | 5'-acgtcattcTGACGGTTGTAGTATCCGCT-3'          |                     |
| <i>fim</i> | fimA ATG      | 5'-atagaagagagctcgtgaattcaaggaaatccATG-3'    | Sac1                |
|            | fimLR2prom    | 5'-AGTAGGATCAGCCGCAACC-3'                    |                     |
| <i>pil</i> | pilL ATG      | 5'-gttttgtagctccacgggattttcATGAACA-3'        | Nhe1                |
|            | pilL R3       | 5'-GGTTCAGCAGCTCAGAAAAG-3'                   |                     |
| <i>saf</i> | safAR qPCR    | 5'-TGCGATCGCGAATTGTTTAGCAGC-3'               | Xba1                |
|            | safApBAD      | 5'-GCTCTAGATTCTGGACGTGCGATTTTAAC-3'          |                     |
| <i>sef</i> | sefA ATG      | 5'-gttttgtagctttggagatttgaatATGCGT-3'        | Nhe1                |
|            | sefA R3       | 5'-CTTCTGACCAGCAGCAACA-3'                    |                     |
| <i>sta</i> | staA ATG      | 5'-atagaagagagctc tgtaaggatacagcaATGAAAAA-3' | Sac1                |
|            | staAF         | 5'-AACTGCAGGCGTGAAGGAAACTACT T-3'            |                     |
| <i>stb</i> | stbA ATG      | 5'-atagaagagagctctacaggaacattattatATGTCTA-3' | Sac1                |
|            | stbF3         | 5'-TTTTCGGCGgcaataacacagcgggtt-3'            |                     |
| <i>stc</i> | stcA ATG      | 5'-cggggtaccattaaggaagattATGAAAC-3'          | Kpn1                |
|            | STY2378-81 F3 | 5'-cagtcgcttAATTCAGCGGTTCGTAC-3'             |                     |
| <i>std</i> | stdA ATG      | 5'-atagaagagagctcaaaggacattatctATGCGTA-3'    | Sac1                |
|            | stdA R3       | 5'-TGCGATATCACAGGGGAGT-3'                    |                     |
| <i>ste</i> | steA ATG      | 5'-atagaagagagctcattaagataaacagATGAAGTC-3'   | Sac1                |
|            | steA R3       | 5'-AGCAGGGGAATCAACAATA-3'                    |                     |
| <i>stg</i> | stgAR         | 5'-AACTGCAGCCAGCAAATGCCGTTTTGTT-3'           | PstI                |
|            | stgAFnoprom   | 5'-GGAATCCAATAGAGTTATAATGAAACTGAA-3'         |                     |
| <i>sth</i> | sthA ATG      | 5'-gttttgtagcatagaatcaggcaacaattaatATG-3'    | Nhe1                |
|            | sthA R3       | 5'-CCTGAACCGTACACGCCTGA-3'                   |                     |
| <i>tcf</i> | tcfA ATG      | 5'-atagaagagagctc atacggtaaatctggtATGAAT-3'  | Sac1                |
|            | tcfA R3       | 5'-CCTCCTTCTCCTGTGGCATA-3'                   |                     |
| <i>csg</i> | csgAB         | 5'-ATG TGCTCTGCAAAGCGATGCC-3'                | Not1                |
|            | csgA R4       | 5'-aaggaaaaagcggccgcTTGCTGAGTCGTGGTAAACG-3'  |                     |

Dans les séquences présentées dans les tableaux VIII et IX, chaque base en lettre minuscule est localisée dans la région intergénique, la portion non codante du gène, tandis que les bases en lettres majuscules sont dans la portion codante, après le codon de départ ATG.