

Université de Montréal

**Rôle du régulateur Fur et des petits ARN non codants RfrA et  
RfrB dans l'homéostasie du fer et la virulence de *Salmonella***

par

Jean-Mathieu Leclerc

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor

en microbiologie et immunologie

Septembre, 2013

© Jean-Mathieu Leclerc, 2013



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Rôle du régulateur Fur et des petits ARN non codants RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer  
et la virulence de *Salmonella*

présentée par :  
Jean-Mathieu Leclerc

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr George Szatmari  
Président-rapporteur

Dre France Daigle  
Directeur de recherche

Dr Charles Dozois  
Codirecteur de recherche

Dre Catherine Paradis-Bleau  
Membre du jury

Dr Jonathan Perreault  
Examineur externe



## Résumé

La régulation de l'homéostasie du fer est cruciale chez les bactéries. Chez *Salmonella*, l'expression des gènes d'acquisition et du métabolisme du fer au moment approprié est importante pour sa survie et sa virulence. Cette régulation est effectuée par la protéine Fur et les petits ARN non codants RfrA et RfrB. Le rôle de ces régulateurs est d'assurer que le niveau de fer soit assez élevé pour la survie et le métabolisme de *Salmonella*, et assez faible pour éviter l'effet toxique du fer en présence d'oxygène. Les connaissances concernant le rôle de ces régulateurs ont été principalement obtenues par des études chez *S. Typhimurium*, un sérovar généraliste causant une gastro-entérite chez les humains. Très peu d'informations sont connues sur le rôle de ces régulateurs chez *S. Typhi*, un sérovar humain-spécifique responsable de la fièvre typhoïde. Le but de cette étude était de déterminer les rôles de Fur, RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer et la virulence de *Salmonella*, et de démontrer qu'ils ont une implication distincte chez les sérovars Typhi et Typhimurium.

Premièrement, Fur, RfrA et RfrB régulent l'homéostasie du fer de *Salmonella*. Les résultats de cette étude ont démontré que Fur est requis pour la résistance au stress oxydatif et pour une croissance optimale dans différentes conditions *in vitro*. La sensibilité du mutant *fur* est due à l'expression des petits ARN RfrA et RfrB, et cette sensibilité est beaucoup plus importante chez *S. Typhi* que chez *S. Typhimurium*. Également, Fur inhibe la transcription des gènes codant pour les sidérophores en conditions riches en fer, tandis que les petits ARN RfrA et RfrB semblent être importants pour la production d'entérobactine et de salmochélines chez *S. Typhi* lors de conditions pauvres en fer.

Ensuite, ces régulateurs affectent la virulence de *Salmonella*. Fur est important pour la motilité de *Salmonella*, particulièrement chez *S. Typhi*. Fur est nécessaire pour l'invasion des deux sérovars dans les cellules épithéliales, et pour l'entrée et la survie de *S. Typhi* dans les macrophages. Chez *S. Typhimurium*, Fur ne semble pas impliqué dans l'interaction avec les macrophages. De plus, les petits ARN RfrA et RfrB sont importants pour la multiplication intracellulaire de *Salmonella* dans les macrophages pour les deux sérovars.

Finalement, la protéine Fur et les petits ARN RfrA et RfrB régulent l'expression de l'opéron fimbriaire *tcf*, absent du génome de *S. Typhimurium*. Un site de liaison putatif de la protéine Fur a été identifié dans la région promotrice de *tcfA* chez *S. Typhi*, mais une régulation directe n'a pas été confirmée. L'expression de *tcf* est induite par le fer et par Fur, et est inhibée par les petits ARN RfrA et RfrB. Ainsi, ces régulateurs affectent des gènes de virulence qui sont retrouvés spécifiquement chez *S. Typhi*.

En somme, ce projet a permis de démontrer que les régulateurs de l'homéostasie du fer de *Salmonella* peuvent affecter la résistance de cette bactérie pathogène à différents stress, notamment le stress oxydatif, la croissance en conditions de carence en fer ainsi que la virulence. Ces régulateurs jouent un rôle distinct chez les sérovars Typhi et Typhimurium.

**Mots-clés :** *Salmonella*, fer, homéostasie, virulence, régulateur, petit ARN, Fur, RfrA, RfrB

## Abstract

Regulation of iron homeostasis is crucial for bacteria. For *Salmonella*, proper timing of the expression of iron acquisition and metabolism genes is important for survival and virulence. This regulation is mediated by the protein Fur and the small non-coding RNAs (sRNAs) RfrA and RfrB. The role of these regulators is to assure that the iron level is high enough for survival and metabolism of *Salmonella*, and low enough to avoid the toxic effect of iron in the presence of oxygen. Thus far, information on the role of these regulators was principally obtained by studying *S. Typhimurium*, a generalist serovar causing gastro-enteritis in humans. Very little is known about the role of these regulators in *S. Typhi*, a human-specific serovar which causes typhoid fever. The goal of this study was to determine the roles of Fur, RfrA and RfrB in iron homeostasis and virulence of *Salmonella*, and to determine if they have a distinct implication in the serovars Typhimurium and Typhi.

First, Fur, RfrA and RfrB regulate iron homeostasis in *Salmonella*. The results of this study have shown that Fur is required for resistance to oxidative stress and for optimal growth in different *in vitro* conditions. The sensitivity of the *fur* mutant is due to the expression of the sRNAs RfrA and RfrB, and this sensitivity is worse in *S. Typhi* than in *S. Typhimurium*. Also, Fur represses the transcription of the genes encoding siderophores in high-iron conditions, and the sRNAs RfrA and RfrB are required for enterobactin and salmochelins production in *S. Typhi* in low-iron conditions.

Secondly, these regulators affect the virulence of *Salmonella*. Fur is important for the motility of *Salmonella*, especially in *S. Typhi*. Fur is required for the invasion of both serovars in epithelial cells, and for the uptake and survival of *S. Typhi* in macrophages. In *S. Typhimurium*, Fur is not required for the interaction with macrophages. Moreover, the sRNAs RfrA and RfrB are important for the intracellular multiplication of *Salmonella* within macrophages for both serovars.

Finally, the Fur protein and the sRNAs RfrA and RfrB regulate the expression of the *tcf* fimbrial operon, absent from the genome of *S. Typhimurium*. A putative Fur binding site was identified in the *tcfA* promoter region of *S. Typhi*, but direct regulation has not been

confirmed. *tcf* expression is activated by iron and Fur, and is inhibited by the sRNAs RfrA and RfrB. Therefore, these regulators affect virulence genes that are found specifically in *S. Typhi*.

To conclude, this project demonstrates that the iron homeostasis regulators of *Salmonella* can affect the bacterial resistance to different stresses, especially oxidative stress, the growth in iron-limiting conditions and virulence. These regulators have a distinct role in the serovars Typhi and Typhimurium.

**Keywords :** *Salmonella*, iron, homeostasis, virulence, regulator, small RNA, Fur, RfrA, RfrB

# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des sigles et abréviations.....	xv
Remerciements.....	xx
CHAPITRE 1 - Revue de la littérature.....	1
1.1. <i>Salmonella</i> .....	1
1.1.1. Généralités sur <i>Salmonella</i> .....	1
1.1.1.1. Classification des salmonelles.....	1
Évolution.....	1
Taxonomie et nomenclature.....	2
Spectre d'hôtes.....	3
Maladies.....	5
1.1.1.2. Comparaison de <i>S. Typhimurium</i> et <i>S. Typhi</i> .....	5
1.1.2. Pathogénicité.....	7
1.1.2.1. Salmonelloses.....	7
Gastro-entérite.....	7
Fièvre typhoïde.....	8
1.1.2.2. Infections et facteurs de virulence.....	9
1.1.3. Régulation.....	14
1.1.3.1. Protéines régulatrices.....	15
1.1.3.2. Petits ARN régulateurs.....	17
1.2. Homéostasie du fer.....	23
1.2.1. Généralités sur le fer.....	23
1.2.2. Acquisition du fer.....	24
1.2.2.1. Acquisition du fer par des sidérophores.....	27
Entérobactine.....	28
Salmochélines.....	35

Sidérophores produits par certaines salmonelles .....	40
Sidérophores produits par d'autres microorganismes .....	41
Rôle des systèmes d'acquisition du fer avec sidérophores dans la virulence .....	43
1.2.2.2. Acquisition du fer sidérophore-indépendante .....	45
Rôle des systèmes d'acquisition du Fe <sup>2+</sup> dans la virulence .....	49
1.2.3. Détoxification et stockage du fer .....	49
1.2.3.1. Stress oxydatif.....	49
1.2.3.2. Stockage.....	51
Rôle des systèmes de stockage du fer dans la virulence .....	53
1.2.4. L'homéostasie du fer dans les relations hôte-pathogènes.....	53
1.2.4.1. Homéostasie du fer chez l'hôte.....	54
1.2.4.2. Réponse de l'hôte lors d'infection par des bactéries pathogènes .....	56
Infections extracellulaires .....	56
Infections intracellulaires.....	59
1.2.5. Régulation de l'homéostasie du fer.....	61
1.2.5.1. La protéine Fur.....	62
Propriétés et mécanismes d'action de Fur .....	62
Régulation du gène <i>fur</i> .....	65
Régulon de Fur.....	66
Rôles de Fur .....	67
1.2.5.2. Le petit ARN RyhB .....	70
Mécanismes d'action de RyhB .....	72
Rôles de RyhB .....	76
RyhB chez <i>Salmonella</i> .....	80
1.2.5.3. Autres systèmes de régulation de l'homéostasie du fer.....	82
1.3. Problématique et objectifs.....	88
Préface au Chapitre 2 .....	91
CHAPITRE 2 – 1 <sup>er</sup> Article.....	92
INTRODUCTION .....	94
METHODS .....	96
RESULTS AND DISCUSSION .....	100

ACKNOWLEDGEMENTS .....	106
REFERENCES .....	107
TABLES AND FIGURES .....	110
Préface au Chapitre 3 .....	122
CHAPITRE 3 – 2 <sup>e</sup> article.....	123
ABSTRACT.....	124
INTRODUCTION .....	125
MATERIAL AND METHODS.....	128
RESULTS .....	131
DISCUSSION.....	135
ACKNOWLEDGMENTS .....	139
TABLES AND FIGURES .....	145
Préface au Chapitre 4 .....	153
CHAPITRE 4 – 3 <sup>e</sup> Article.....	154
ABSTRACT.....	155
INTRODUCTION .....	156
MATERIALS AND METHODS.....	158
RESULTS .....	161
DISCUSSION.....	166
ACKNOWLEDGMENTS .....	171
REFERENCES .....	172
TABLES AND FIGURES .....	178
CHAPITRE 5 - Discussion.....	187
5.1. Expression des régulateurs Fur, RfrA et RfrB.....	187
5.2. Le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer de <i>Salmonella</i> ..	188
5.3. Le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB dans la virulence de <i>Salmonella</i> .....	194
5.4. Le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB dans la régulation du fimbriae Tcf de <i>S.</i>	
Typhi.....	199
5.5. Perspectives.....	205
CHAPITRE 6 - Conclusion .....	209
Bibliographie.....	211

ANNEXE I : Résultats supplémentaires .....	I
ANNEXE II : Article publié non discuté dans cette thèse.....	IV

# Liste des tableaux

## **CHAPITRE 2 :**

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study ..... 110

**Table 2.** Primers used in this study ..... 112

## **CHAPITRE 3 :**

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study ..... 145

**Table 2.** Primers used in this study ..... 146

## **CHAPITRE 4 :**

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study ..... 178

**Table 2.** Primers used in this study ..... 180

# Liste des figures

## CHAPITRE 1 :

<b>Figure 1.</b> Description du genre <i>Salmonella</i> .....	3
<b>Figure 2.</b> Spectre d'hôtes de <i>Salmonella</i> .....	4
<b>Figure 3.</b> Principales caractéristiques qui différencient <i>S. Typhimurium</i> et <i>S. Typhi</i> .....	7
<b>Figure 4.</b> Mécanismes utilisés par <i>Salmonella</i> pour franchir la barrière de cellules intestinales. .....	10
<b>Figure 5.</b> Différences dans la réponse inflammatoire intestinale lors de l'infection par <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> et <i>S. Typhi</i> .....	12
<b>Figure 6.</b> Interconnexion dans la régulation des éléments de virulence de <i>Salmonella</i> par plusieurs protéines régulatrices.....	17
<b>Figure 7.</b> Différents types d'ARN présents chez les bactéries.....	18
<b>Figure 8.</b> ARN thermomètres et riboswitches.....	19
<b>Figure 9.</b> ARN régulateurs de protéines.....	20
<b>Figure 10.</b> ARN CRISPR.....	21
<b>Figure 11.</b> ARN antisens.....	23
<b>Figure 12.</b> Systèmes d'acquisition du fer de <i>Salmonella</i> .....	26
<b>Figure 13.</b> Structure de l'entérobactine et de la salmochéline .....	28
<b>Figure 14.</b> Synthèse de l'entérobactine .....	30
<b>Figure 15.</b> Les quatre molécules d'entérobactine .....	35
<b>Figure 16.</b> Les neuf molécules de salmochélines.....	37
<b>Figure 17.</b> Homéostasie du fer chez l'hôte .....	55
<b>Figure 18.</b> La salmochéline procure un avantage à <i>Salmonella</i> contre le lipocalin 2.....	58
<b>Figure 19.</b> Réponses antimicrobiennes par les macrophages pour diminuer l'accès au fer lors d'infection par <i>Salmonella</i> .....	60
<b>Figure 20.</b> Fonctions régulatrices de la protéine Fur .....	64

<b>Figure 21.</b> Région régulatrice du gène <i>fur</i> .....	65
<b>Figure 22.</b> Fur active les gènes du SPI-1 impliqués dans l'invasion .....	70
<b>Figure 23.</b> Structures secondaires des petits ARN RyhB, RfrA et RfrB .....	71
<b>Figure 24.</b> Mécanismes d'action du petit ARN RyhB .....	73
<b>Figure 25.</b> Régulation de l'homéostasie du fer par Fur et RyhB .....	77
<b>Figure 26.</b> RyhB stimule la production de l'entérobactine via l'inhibition de <i>cysE</i> .....	79
<b>Figure 27.</b> Résistance au Fe <sup>3+</sup> par le système à deux composantes PmrA/PmrB via la modification du LPS .....	84
<b>Figure 28.</b> Le SDC PhoP/PhoQ stimule la résistance au Fe <sup>3+</sup> et l'importation du Fe <sup>2+</sup> .....	87

## **CHAPITRE 2:**

<b>Figure 1.</b> Growth curves of <i>S. Typhi</i> wild-type strain ISP1820, isogenic mutants and <i>fur</i> complemented strain in (a) high iron (M63 + 100 µM FeCl <sub>3</sub> ) and (b) low iron (M63) conditions .....	114
<b>Figure 2.</b> Sensitivity of wild-type strain ISP1820 and isogenic mutants to 30 % hydrogen peroxide was measured by the growth inhibition zone.....	115
<b>Figure 3.</b> Siderophore production of <i>S. Typhi</i> ISP1820 wild-type strain, the isogenic mutants and <i>fur</i> complemented strain grown on CAS agar .....	116
<b>Figure 4.</b> Salmochelin gene expression.....	117
<b>Figure 5.</b> Expression of the regulatory genes <i>fur</i> , <i>rfrA</i> and <i>rfrB</i> .....	119
<b>Figure 6.</b> Role of the regulators Fur and RfrA/RfrB during interaction with human cells.....	120

## **CHAPITRE 3:**

<b>Figure 1.</b> Growth curves of <i>S. Typhi</i> (STY) (a-b) and <i>S. Typhimurium</i> (STM) (c-d) wild-type strains, isogenic <i>fur</i> and <i>fur/rfrA/rfrB</i> mutants and <i>fur</i> complemented strains in iron-rich (LB) (a-c) and in iron-limiting (LB + 200 µM 2,2'-dipyridyl) (b-d) conditions.....	147
<b>Figure 2.</b> Morphology of <i>S. Typhi</i> (STY) wild-type strain (a), isogenic <i>fur</i> mutant (b), isogenic <i>fur/rfrA/rfrB</i> mutant (c) and <i>fur</i> complemented strain (d), and <i>S. Typhimurium</i> (STM)	

wild-type strain (e) and isogenic <i>fur</i> mutant (f) grown in iron-rich conditions (LB) with agitation at 37°C to an OD <sub>600</sub> ranging from 0.5 to 0.6 corresponding to the exponential growth phase .....	148
<b>Figure 3.</b> Swimming motility of <i>S. Typhi</i> (STY) and <i>S. Typhimurium</i> (STM) wild-type strains, isogenic <i>fur</i> and <i>fur/rfrA/rfrB</i> mutants and <i>fur</i> complemented strains .....	150
<b>Figure 4.</b> Role of the <i>S. Typhi</i> and <i>S. Typhimurium</i> Fur regulators during interaction with human macrophages.....	151
<b>Figure 5.</b> Siderophore production by <i>S. Typhi</i> and <i>S. Typhimurium</i> .....	152

**CHAPITRE 4:**

<b>Figure 1.</b> Role of the <i>tcf</i> fimbrial cluster during the interaction of <i>S. Typhi</i> and <i>E. coli</i> with human epithelial cells .....	181
<b>Figure 2.</b> Role of the <i>tcf</i> fimbrial cluster during the interaction of <i>S. Typhi</i> with human macrophages .....	182
<b>Figure 3.</b> <i>tcf</i> expression in <i>S. Typhi</i> .....	183
<b>Figure 4.</b> Regulatory region of the <i>tcfA</i> promoter .....	184
<b>Figure 5.</b> Regulation of <i>tcf</i> expression .....	185
<b>Figure 6.</b> Role of iron, Fur and the sRNAs RfrA and RfrB in regulation of <i>tcf</i> expression ..	186

**CHAPITRE 5:**

<b>Figure 1.</b> Rôle du régulateur Fur et des petits ARN non codants RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer et la virulence de <i>Salmonella</i> . .....	204
---	-----

**ANNEXE 1:**

<b>Figure S1.</b> Sensibilité de <i>S. Typhimurium</i> au peroxyde d'hydrogène.....	I
<b>Figure S2.</b> Production de sidérophore par <i>S. Typhi</i> et <i>S. Typhimurium</i> .....	II
<b>Figure S3.</b> Rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB de <i>S. Typhimurium</i> pendant l'interaction avec les macrophages humains.....	III

## Liste des sigles et abréviations

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
APEC	<i>Avian pathogenic Escherichia coli</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ASP	<i>Acid shock proteins</i>
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	<i>acid tolerance response</i>
CAP	<i>Catabolite-activator protein</i>
CAS	Chrome azurol S
Cas	<i>CRISPR associated</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFU ou c.f.u.	<i>Colony-forming unit</i>
CRISPR	<i>Clustered, Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DAP	<i>Diaminopimelic acid</i>
DGE	Diglucosyl-C-entérobactine
DHB	Dihydroxybenzoate
DHBS	Dihydroxybenzoyl sérine
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
DOC	<i>Deoxycholic acid sodium salt</i>
Dps	<i>DNA-binding protein from starved cells</i>
DtxR	<i>Diphtheria toxin regulator</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ExPEC	<i>Extra-intestinal pathogenic E. coli</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Feo	<i>Ferrous iron transport</i>

Fhu	<i>Ferric hydroxamate uptake</i>
Fis	<i>Factor for inversion stimulation</i>
Fur	<i>Ferric uptake regulator</i>
FURTA	<i>Fur titration assay</i>
GTP	Guanosine triphosphate
Hfq	<i>host factor for phage Q<math>\beta</math></i>
Hha	<i>High hemolysin activity</i>
H-NS	<i>Histone-like nucleoid structuring protein</i>
HPI	<i>High-Pathogenicity Island</i>
HU	<i>Heat unstable</i>
IceT	<i>Iron citrate efflux transporter</i>
IFN	Interféron
IHF	<i>Integration Host Factor</i>
IL	Interleukine
IPAF	<i>IL-1<math>\beta</math> converting enzyme protease activating factor</i>
IRE	<i>Iron responsive elements</i>
IROMPs	<i>Iron-regulated outer membrane proteins</i>
IRP	<i>Iron regulatory proteins</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
LPS	Lipopolysaccharide
m.o.i	<i>Multiplicity of infection</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MGE	Monoglucosyl-C-entérobactine
MntH	<i>H<sup>+</sup>-coupled manganese transport</i>
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NLRC4	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family caspase-associated recruitment domain-containing protein 4</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>

Nramp	<i>Natural resistance-associated macrophage protein</i>
NRPS	<i>Non-ribosomal peptide synthetase</i>
o/n	<i>Overnight</i>
OD <sub>600</sub>	<i>Optical density at 600 nm</i>
Omr	<i>OmpR regulated sRNA</i>
ONPG	<i>o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	<i>Paire de bases</i>
PBP	<i>Periplasmic binding proteins</i>
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMA	<i>M phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PNPase	<i>Polynucléotide phosphorylase</i>
qPCR	<i>Real-time quantitative PCR</i>
qRT-PCR	<i>Real-time quantitative reverse transcription PCR</i>
RBS	<i>Ribosome binding site</i>
Rfr	<i>RNA for Fur response</i>
RNAse	<i>Ribonucléase</i>
RND	<i>resistance nodulation cell division</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
<i>S. Typhi</i>	<i>Salmonella enterica sous-espèce enterica sérovar Typhi</i>
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica sous-espèce enterica sérovar Typhimutium</i>
SCV	<i>Salmonella containing vacuole</i>
SDC	<i>Système à deux composantes</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
Slc11a1	<i>Solute carrier family 11 member a1</i>
SNT	<i>Salmonella non-typhoïdique</i>
SNTi	<i>Salmonella non-typhoïdique invasive</i>
SOD	<i>Superoxyde dismutase</i>
SPI	<i>Salmonella pathogenicity island</i>

sRNA	<i>Small non-coding RNA</i>
SST3	Système de sécrétion de type 3
TBDT	<i>TonB-dependent transporter</i>
TCA	<i>Tricarboxylic acid cycle</i>
Tcf	<i>Typhi colonization factor</i>
TGE	Triglycosyl-C-entérobactine
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
UFC	Unité formatrice de colonies
UTR	<i>Untranslated region</i>

*La vie humaine est comme le fer, elle s'use dans  
la pratique et se rouille dans l'inaction*

*Caton l'Ancien*

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche. Merci France de m'avoir permis de passer ces cinq années dans ton laboratoire et de ta confiance, ta disponibilité et de ton aide qui ont été très précieuses à mes yeux. Merci aussi de ta passion et de ta bonne humeur qui rendaient l'ambiance de travail très agréable.

Merci à mon codirecteur de recherche, Charles, pour ses idées et ses conseils judicieux et de m'avoir permis de réaliser des expériences importantes dans son laboratoire. Merci aussi à Sébastien Houle pour son aide avec les courbes de croissance et la spectrométrie de masse. Votre collaboration dans mon projet est très appréciée.

Un grand merci à mes collègues du V-630 (et dernièrement U-630) qui sont vite devenus des amis et qui ont permis de rendre mon travail au laboratoire très agréable durant toutes ces années, quelle équipe ! Merci Chantal d'avoir été un mentor pour moi à mes débuts dans le laboratoire. J'ai grandement apprécié ta bonne humeur et le temps passé ensemble à parler de tout et de rien comme de hockey et de François Pérusse. Merci Seb pour ton support dans mon travail et pour tous les moments au labo et hors du labo. On en a fait des choses ensemble et tu es devenu un ami important pour moi. Merci Cri d'être une personne attentionnée et de ta simplicité que j'apprécie beaucoup, et pour toutes les fois qu'on a parlé de séries télévisées. Merci à Élise et à Marilynne pour votre joie de vivre et votre folie qui ont contribué grandement à rendre l'atmosphère de travail très joyeux. Merci également à tous les stagiaires qui ont contribué à l'ambiance unique du laboratoire.

Je souhaite également remercier tous mes collègues étudiants du département, spécialement les membres du RÉMIC (Véro, Seb, Laetitia et Virginie), qui ont contribué à rendre la vie étudiante plaisante. Merci aussi à tous mes autres collègues du département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal, que ce soit les professeurs, les techniciens et les secrétaires.

Un merci spécial à ma famille qui m'a toujours soutenue non seulement durant mes études graduées mais durant tout mon cheminement scolaire. Vous avez toujours crû en moi et votre support a été très important pour moi. Merci à mon père et ma mère pour votre soutien et de

m'avoir transmis et encourager ma curiosité, vous le saviez mieux que quiconque que j'évoluerais dans le monde de la recherche.

Merci également à mes amis pour vos encouragements et de votre compréhension pour toutes les fois où mes études m'ont empêché de passer du temps avec vous. Merci à Sibane et Francis pour les deux années à vivre ensemble durant mon doctorat. Merci aussi à Xavier pour tous les soupers et les parties de squash après le travail qui m'ont permis de décompresser et de me changer les idées.

J'aimerais remercier les organismes subventionnaires qui m'ont grandement supporté tout le long de ma formation : le CRSNG (Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie) et la FESP (Faculté des études supérieures et post-doctorales).

En terminant, je voudrais remercier les membres de mon comité d'examen pré-doctoral ainsi que les membres du jury participant à l'évaluation de cette thèse : Dr. George Szatmari, Dr. Patrick Hallenbeck, Dr. Éric Massé, Dre. Catherine Paradis-Bleau, Dr. Jonathan Perreault sans oublier la Dre. France Daigle et le Dr. Charles Dozois encore une fois. Votre expertise, vos recommandations et vos conseils sont très importants pour moi.

# CHAPITRE 1 - Revue de la littérature

## 1.1. *Salmonella*

### 1.1.1. Généralités sur *Salmonella*

Les salmonelles sont des bâtonnets à Gram négatif anaérobies facultatives, mésophiles et mobiles munies de flagelles péritriches. La majorité des bactéries du genre *Salmonella* sont prototrophes, mais certains sérovars sont auxotrophes (94, 166). Les bactéries du genre *Salmonella* sont responsables de nombreuses infections chez les animaux et les humains. Elles sont retrouvées chez une grande variété d'organismes et parfois dans l'environnement. Les salmonelles sont des bactéries pathogènes intracellulaires facultatives qui infectent leurs hôtes par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés (94, 163). Les infections causées par les salmonelles sont multiples et la majorité se limite au développement de maladies localisées au niveau de l'intestin de type gastro-entérite, mais certaines infections plus graves produisent des maladies systémiques comme la fièvre entérique. Les infections par *Salmonella* constituent un important problème de santé publique dans le monde, car chaque année un très grand nombre d'humains et d'animaux sont malades ou décèdent suite à une infection par ces bactéries (163, 201, 213).

#### 1.1.1.1. Classification des salmonelles

##### Évolution

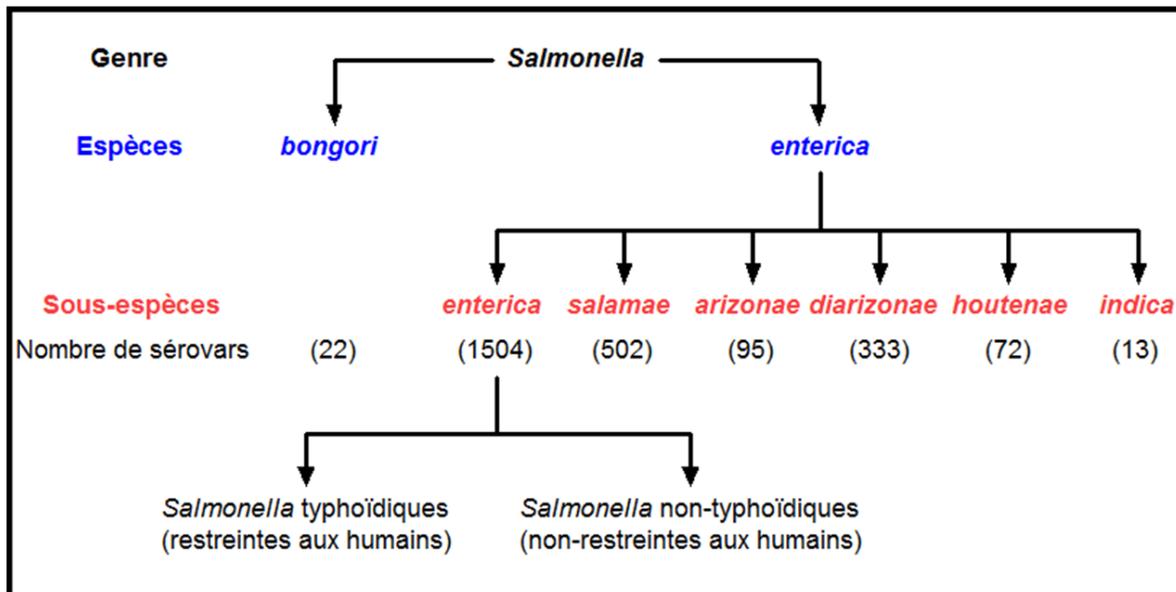
Le genre *Salmonella* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* qui regroupe un grand nombre de bactéries commensales nichant principalement au niveau de l'intestin des organismes infectés (166). *Escherichia coli* est également une entérobactérie qui possède beaucoup de similitudes avec *Salmonella*. En effet, leurs génomes partagent près de 80 % d'homologie (225). Il y a environ 120 millions d'années, *Salmonella* aurait divergé de *E. coli* (89, 255). L'apparition des mammifères a eu comme effet d'augmenter le nombre de niches d'infection et cela a engendré une divergence entre *Salmonella* et *E. coli*. Cette divergence entre les deux bactéries ainsi que la diversification du genre *Salmonella* se sont produites sur

des millions d'années par des événements de transferts horizontaux et de recombinaisons génétiques (25, 27, 106, 275). En effet, au cours de son évolution, *Salmonella* a acquis plusieurs îlots génétiques qui sont absents d'*E. coli* et qui renferment des éléments ayant des fonctions dans la virulence (25, 27, 275). Ils sont d'ailleurs dénommés îlots de pathogénicité de *Salmonella* (SPI pour *Salmonella pathogenicity island*) (146, 230, 314). Les îlots de pathogénicité 1 et 2 (SPI-1 et SPI-2) contiennent des gènes codant pour des systèmes de sécrétion de type 3 (SST3), et ces facteurs de virulence ont joué un rôle majeur dans l'évolution de *Salmonella* (27, 146). Le SST3 du SPI-1 (SST3-1) est requis pour l'invasion des cellules épithéliales de l'intestin (127, 128, 230), et le SST3 du SPI-2 (SST3-2) est essentiel pour la survie dans les macrophages (146, 161, 314). Donc, l'acquisition de ces deux SST3 a procuré à *Salmonella* la capacité de coloniser l'intestin des animaux et d'être disséminée dans les organismes pour causer des infections systémiques. Beaucoup d'autres éléments génétiques lui ont permis de se diversifier, notamment la variation de phase flagellaire et la capacité de coloniser les animaux à sang chaud (27, 275).

### **Taxonomie et nomenclature**

La taxonomie et la nomenclature du genre *Salmonella* ont beaucoup variées depuis que la première salmonelle fut découverte en 1884. *Salmonella* est divisée en deux espèces, *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*, et cette dernière est composée de six sous-espèces (*enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) et *indica* (VI)) (Fig. 1) (46, 274). La sous-espèce V correspond désormais à l'espèce *Salmonella bongori*. Chaque sous-espèce est sous-divisée en sérovars (ou sérotype), et l'espèce *Salmonella enterica* contient plus de 2500 sérovars (274, 331). Les sérovars sont déterminés selon certains antigènes de surface qui sont très variables et sont classifiés selon le schéma de Kauffmann-White (46, 331). La formule antigénique des sérovars comprend l'antigène O (antigène somatique correspondant au LPS), l'antigène H (flagelles de phase 1 ou 2) et l'antigène Vi (capsule, si présente) (46, 94). Cette classification a permis d'identifier les 2541 sérovars de *Salmonella*. Toutefois, les sérovars de *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sont désignés par des noms, contrairement aux sérovars des autres sous-espèces qui sont désignés par leur formule antigénique (5, 331). Les bactéries de la sous-espèce *enterica* sont les seules pouvant

infecter les mammifères et incluent les sérovars Typhimurium et Typhi, tandis que les bactéries des autres sous-espèces et de l'espèce *Salmonella bongori* sont principalement isolées chez des animaux à sang froid ou dans l'environnement, mais très rarement chez les humains (46). Les bactéries du genre *Salmonella* sont désignées par leur longue appellation, par exemple *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sérovar Typhi. Toutefois, au cours de cette thèse, des abréviations seront utilisées pour désigner les bactéries du genre *Salmonella*. Le terme *Salmonella* correspondra à *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica*, sauf lorsque spécifié, et seuls le genre et le sérovar seront utilisés, par exemple *S.* Typhimurium et *S.* Typhi.

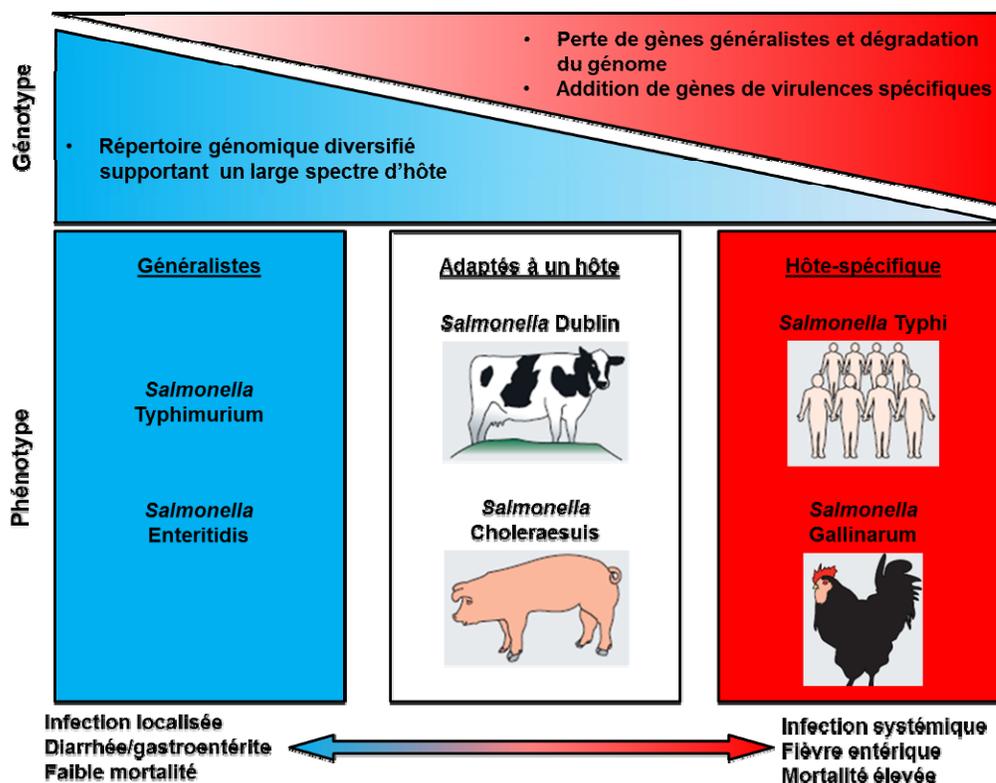


**Figure 1. Description du genre *Salmonella*.** Le genre *Salmonella* est divisé en deux espèces, *bongori* et *enterica*, et l'espèce *enterica* est divisée en six sous-espèces. La sous-espèce *enterica* peut être séparée en deux groupes, les *Salmonella* typhoïdiques et non-typhoïdiques. Figure conçue à partir de (94, 274, 331).

### Spectre d'hôtes

Les sérovars de *Salmonella* infectent une grande diversité d'organismes et peuvent être divisés en trois groupes selon leur spectre d'hôtes (Fig. 2) (94, 105, 352). Certaines salmonelles sont dites généralistes et peuvent infecter un large spectre d'hôtes, allant des mammifères aux

reptiles (94). Certains sérovars sont plutôt adaptés à un hôte, c'est-à-dire qu'ils infectent préférentiellement un hôte particulier, mais peuvent occasionnellement infecter d'autres organismes (352). Finalement, certains sérovars sont spécifiques à un seul hôte, c'est-à-dire qu'ils infectent une seule espèce et ne sont pas retrouvés chez d'autres animaux (94, 352). Généralement, plus les sérovars possèdent un large spectre d'hôtes, plus les infections sont localisées à l'intestin et sont associées à une faible mortalité (105). Également, ces sérovars possèdent un répertoire génomique diversifié afin de coloniser un large spectre d'hôtes, tandis que le génome des sérovars à hôte-spécifique est associé à une perte de plusieurs gènes généralistes et à une acquisition de gènes de virulence spécifiques (105).



**Figure 2. Spectre d'hôtes de *Salmonella*.** Les sérovars de *Salmonella* sont divisés en trois groupes, les sérovars généralistes caractérisés par un répertoire génomique diversifié et des maladies bénignes, les sérovars adaptés à un hôte qui infectent préférentiellement un hôte, mais peuvent parfois se retrouver chez d'autres organismes, et les sérovars hôte-spécifique qui causent des maladies graves et qui sont caractérisés par une perte de plusieurs gènes

généralistes, une dégradation du génome et une acquisition de gènes de virulence spécifiques. Figure adaptée de (105).

## **Maladies**

Les salmonelles sont associées à différents types d'infection et *Salmonella* peut être divisée en deux groupes selon le type de maladie associée aux infections chez l'humain, soit le groupe des *Salmonella* typhoïdiques et le groupe des *Salmonella* non-typhoïdiques (Fig. 1) (11, 94). Les salmonelles du premier groupe sont des sérovars qui sont restreints aux humains et causent une infection systémique qui entraîne une fièvre typhoïde (ou fièvre entérique). Les représentants de ce groupe sont limités aux sérovars Typhi et Paratyphi. Le deuxième groupe, les *Salmonella* non-typhoïdiques (SNT), est représenté par des sérovars qui ne sont pas restreints aux humains et qui peuvent infecter un grand nombre d'animaux, tels que les sérovars Typhimurium et Enteritidis. Ces bactéries causent majoritairement des infections de type gastro-entérite chez l'homme, associées à une importante inflammation intestinale (94, 163). Ce groupe de salmonelles contient des sérovars qui peuvent causer des infections non-invasives ou invasives. Les salmonelles non-invasives produisent des infections limitées à l'intestin, tandis que les salmonelles invasives causent des infections extra-intestinales qui peuvent conduire à des bactériémies et des infections systémiques (94, 105). Les *Salmonella* non-typhoïdiques invasives (SNTi) sont un problème majeur dans les pays en développement, principalement en Afrique où elles infectent un grand nombre d'enfants et d'adultes souffrant de malnutrition, de la malaria et du sida (105, 236). Chez ces populations, les infections aux SNTi sont associées à des symptômes sévères et ont un taux de mortalité de 20-25 % (105).

### **1.1.1.2. Comparaison de *S. Typhimurium* et *S. Typhi***

*S. Typhimurium* et *S. Typhi* sont deux sérovars qui causent des infections distinctes chez les humains. *S. Typhimurium* cause une infection localisée, la gastro-entérite, tandis que *S. Typhi* cause une infection systémique, soit la fièvre typhoïde. Puisque *S. Typhi* infecte uniquement les humains, aucun modèle animal n'existe pour étudier ce sérovar. Dans certains modèles de souris, *S. Typhimurium* cause une infection systémique qui ressemble à la fièvre typhoïde causée par *S. Typhi* chez les humains, ce qui fait de *S. Typhimurium* le sérovar le

plus étudié car il permet d'analyser les infections localisées et systémiques (351). Les génomes des deux bactéries partagent près de 90 % d'homologie, et le sérovar Typhimurium possède environ 480 gènes uniques tandis que le sérovar Typhi possède environ 600 gènes uniques (225, 266). Comme mentionné précédemment, les salmonelles à hôte unique sont caractérisées par une perte de fonction de plusieurs gènes. Ceci est vrai dans le cas de *S. Typhi* qui possède près de 5 % de pseudogènes dans son génome, tandis que *S. Typhimurium* ne possède que 0.6 % de pseudogènes (225, 266). Cela s'explique par l'adaptation de *S. Typhi* aux humains, ce qui a mené à l'inactivation de plusieurs gènes due à certains besoins qui étaient satisfaits par l'hôte (301). *S. Typhimurium* et *S. Typhi* sont différents sur plusieurs points, entre autre par le fait que le premier est prototrophe et le deuxième est auxotrophe pour la cystéine et le tryptophane (94). Contrairement à *S. Typhimurium*, *S. Typhi* possède une capsule qui lui permet notamment d'échapper à la réponse immunitaire (301). Les gènes codant pour cette capsule sont retrouvés sur le SPI-7, un îlot absent du sérovar Typhimurium (272). Le SPI-7 renferme également les gènes codant pour un pilus de type IVB. D'ailleurs, chaque sérovar possède un répertoire distinct de fimbriae, dont certains sont communs et d'autres uniques à chaque bactérie (225, 253, 266, 345). Au cours de son évolution, *Salmonella* a acquis plusieurs SPI, et 11 SPI sont communs aux deux sérovares (301). Un seul SPI est unique à *S. Typhimurium*, tandis que quatre SPI sont spécifiques à *S. Typhi* (301). De plus, chaque sérovar possède des plasmides différents. Le plasmide de virulence pSLT est retrouvé chez *S. Typhimurium* et des plasmides de type incHI, impliqués dans la résistance aux antibiotiques, sont communément retrouvés chez *S. Typhi* (301). Finalement, les deux sérovares possèdent des flagelles péritriches, mais *S. Typhi* possède un seul type de flagelline (H1) alors que *S. Typhimurium* possède deux types de flagelline (H1 et H2) (156). Cette variation antigénique (variation de phase flagellaire) permet à la bactérie de s'évader de la reconnaissance immunologique. La figure 3 présente les principales différences entre ces deux sérovares.

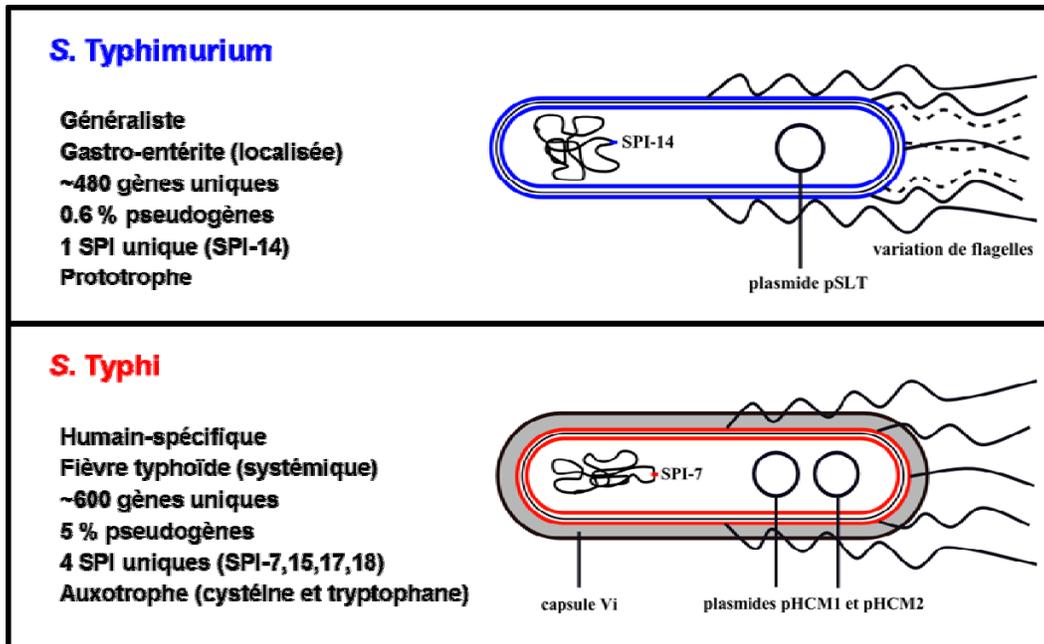


Figure 3. Principales caractéristiques qui différencient *S. Typhimurium* et *S. Typhi*.  
 Figure adaptée de (301).

## 1.1.2. Pathogénicité

### 1.1.2.1. Salmonelloses

#### Gastro-entérite

Plusieurs sérovars dont *S. Typhimurium* causent des infections localisées à l'intestin de type gastro-entérite chez les humains. Il est estimé que ces infections causent environ 94 millions de cas et 155 000 décès par année (213). Le nombre de cas est probablement beaucoup plus élevé, car une grande proportion de la population atteinte de gastro-entérite ne se rend pas à l'hôpital. La grande majorité des salmonelloses de type gastro-entérite est due à l'ingestion de nourriture contaminée, et les symptômes se déclarent après 6 à 24 h d'incubation. Ces symptômes se résument à des maux de ventre, de la diarrhée, des vomissements et de la fièvre (163). Dans la majorité des cas, le traitement aux antibiotiques n'est pas nécessaire. La meilleure façon de limiter les infections à la salmonelle demeure la prévention, en utilisant de bonnes méthodes sanitaires durant le traitement de la nourriture et la prévention de l'infection chez les animaux. Il existe d'ailleurs des vaccins contre *S.*

Typhimurium et *S. Enteritidis* afin d'immuniser la volaille (86, 389). Par ailleurs, des vaccins servant à immuniser contre les SNTi sont en développement afin de protéger la population humaine présente dans les régions endémiques, particulièrement en Afrique (217).

### **Fièvre typhoïde**

Les sérovars Typhi et Paratyphi causent une infection systémique chez les humains qui se nomme fièvre typhoïde, une maladie associée à des maux de tête, des maux de ventre, de la fièvre et de la léthargie (170, 267). Les infections par *S. Typhi* ont lieu principalement dans les pays sous-développés où les conditions sanitaires sont déficientes et où l'eau potable est rare. Les infections sont principalement dues à l'ingestion d'eau contaminée, et les symptômes se déclarent après une incubation de 7 à 14 jours (267). *S. Typhi* et *S. Paratyphi* sont responsables d'environ 22 millions de cas de fièvre typhoïde annuellement (75), faisant plus de 200 000 décès, et le taux de mortalité est de 5 à 30 % lorsque l'infection n'est pas traitée (170). Durant les dernières années, le nombre de décès a diminué mais le nombre de cas a augmenté. Cette observation est due en grande partie à l'utilisation d'antibiotiques qui sont efficaces pour contrer la fièvre typhoïde, tels les fluoroquinolones (ciprofloxacine et acide nalidixique), les céphalosporines et l'azithromycine (387). Le traitement de cette maladie par ces antibiotiques a contribué à diminuer le nombre de décès, mais cela a toutefois engendré l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques (387). L'augmentation du nombre de souches de *S. Typhi* résistantes aux antibiotiques est un problème sérieux dans les régions endémiques et contribue à l'accroissement du nombre de cas de fièvre typhoïde et complique beaucoup le traitement des patients.

Il existe actuellement deux vaccins disponibles pour prévenir les infections de *S. Typhi*. Le premier est constitué de la capsule de polysaccharide Vi et est administré par injection, et le deuxième contient la souche vivante atténuée Ty21a et est administré par voie orale (217, 268). Ces vaccins possèdent plusieurs caractéristiques avantageuses, mais leur efficacité est d'environ 70 % et aucun ne confère une protection à long terme (217, 268). Différents vaccins de nouvelle génération sont présentement en développement dans le but d'offrir une meilleure efficacité et une protection à long terme (217, 268).

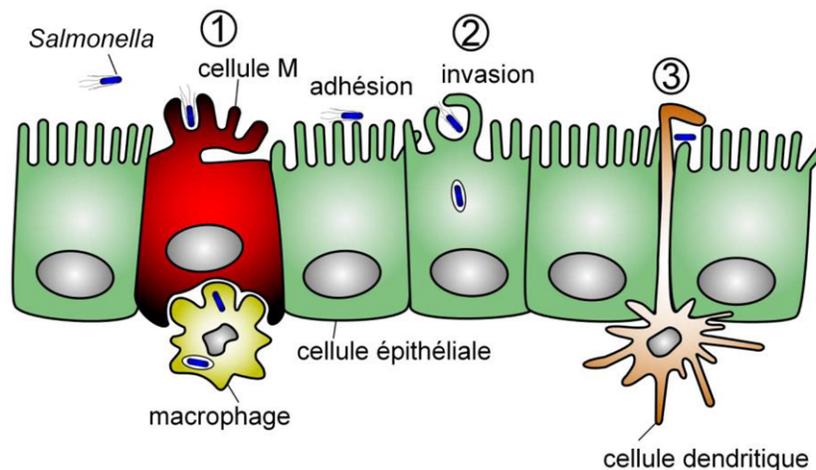
La colonisation des humains par *S. Typhi* provoque majoritairement des symptômes graves, mais quelques fois l'infection n'est associée à aucun symptôme (267). De plus, entre 1 % et 5 % des patients ayant eu la fièvre typhoïde deviennent des porteurs chroniques de *S. Typhi* (267). Chez ces porteurs asymptomatiques, les bactéries persistent généralement au niveau de la vésicule biliaire sous la forme de biofilms qui les protègent contre les antibiotiques et les effecteurs du système immunitaire (72, 134, 164, 318, 333). Ces porteurs asymptomatiques excrètent les bactéries dans leur urine et leurs selles, ce qui augmente le risque d'infection de la population et constitue une menace importante pour la santé publique (34, 267).

#### **1.1.2.2. Infections et facteurs de virulence**

*S. Typhimurium* et *S. Typhi* causent des infections différentes, mais plusieurs étapes de l'infection et plusieurs facteurs de virulence utilisés sont similaires. Les salmonelles infectent leur hôte par la voie fécale-orale et colonisent le tractus gastro-intestinal. Le premier environnement hostile rencontré par *Salmonella* est le pH acide de l'estomac. L'exposition de cette bactérie à un pH modéré (4.5 à 5.8) induit une réponse de tolérance à l'acidité (ATR pour *acid tolerance response*) (10, 19, 30, 300). Ce système permet à *Salmonella* de survivre au pH très acide de l'estomac (autour de 2.0) et lui permet de se propager au petit intestin.

À l'intérieur de cet environnement, plusieurs facteurs de l'hôte sont nuisibles pour *Salmonella*. Celle-ci doit résister aux défenses immunitaires innées de l'hôte (enzymes digestives, sels biliaires, anticorps IgA sécrétoires et peptides antimicrobiens) en plus de compétitionner avec les micro-organismes de la flore intestinale (microbiote) (10, 154, 339). De plus, *Salmonella* doit traverser le mucus intestinal et utilise ses flagelles pour y parvenir, lui permettant de se rendre à la surface de l'épithélium intestinal (156, 285). L'adhésion aux cellules épithéliales est une étape clé pour l'infection de *Salmonella* et elle est effectuée par différentes adhésines fimbriaires et afimbriaires situées à la surface de la bactérie. Ensuite, l'infection par *Salmonella* se caractérise par l'invasion des cellules intestinales. *Salmonella* peut franchir la barrière de cellules intestinales de trois façons (Fig. 4). Premièrement, les salmonelles peuvent être internalisées par les cellules M, des cellules spécialisées de l'épithélium intestinal situées dans les plaques de Peyer qui internalisent les antigènes par

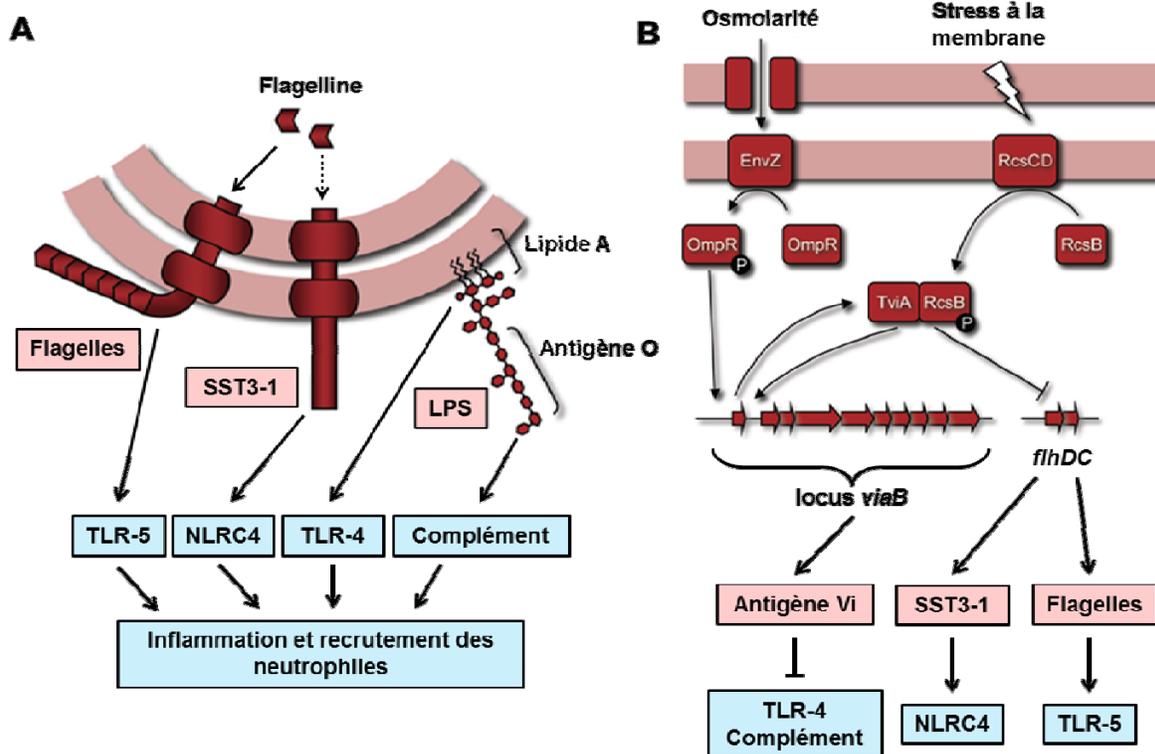
pinocytose et qui les présentent aux cellules lymphoïdes (182, 198). Deuxièmement, suite à l'adhésion des cellules épithéliales, *Salmonella* peut forcer son entrée à l'aide de son SST3-1. Celui-ci permet d'injecter des effecteurs protéiques directement dans le cytoplasme des cellules, ce qui provoque une réorganisation de l'actine du cytosquelette et une ondulation de la membrane qui englobe et internalise les bactéries dans des vésicules (127, 146, 170). Troisièmement, *Salmonella* peut traverser la barrière de cellules épithéliales en étant capturée par des phagocytes CD18 positifs, spécialement les cellules dendritiques, qui sont situés du côté baso-latéral et qui étendent des pseudopodes entre les entérocytes pour phagocyter les bactéries présentes sur le côté apical (293, 356).



**Figure 4. Mécanismes utilisés par *Salmonella* pour franchir la barrière de cellules intestinales.** 1) *Salmonella* est internalisée par pinocytose dans les cellules M et est présentée aux macrophages de l'épithélium sous-jacent. 2) *Salmonella* adhère aux cellules épithéliales et force son entrée à l'aide de son SST3-1 qui permet de sécréter des effecteurs dans le cytoplasme des cellules et de provoquer le remaniement de l'actine. 3) Les cellules dendritiques situées du côté baso-latéral peuvent capturer les bactéries présentes du côté apical par l'extension de pseudopodes. Figure inspirée de (304).

L'infection de *S. Typhimurium* chez les humains est associée à une forte réponse inflammatoire au niveau de l'intestin (306). Cette réponse est due à la reconnaissance de plusieurs composants retrouvés à la surface de la bactérie par le système immunitaire (Fig. 5a). Entre autres, la flagelline, la composante majeure des flagelles, est reconnue par le TLR-5

(*Toll-like receptor 5*) et l'IPAF (*IL-1 $\beta$  converting enzyme protease activating factor*), ce qui provoque la relâche d'interleukine 8 (IL-8) par les entérocytes et des IL-18 et IL-1 $\beta$  par les macrophages (306, 365). Également, le LPS est reconnu par le TLR-4 et par le complément, tandis que le SST3-1 est reconnu par NLRC4 (*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family caspase-associated recruitment domain-containing protein 4*) (306, 365). Ces interactions déclenchent une réaction inflammatoire caractérisée par un important recrutement de neutrophiles au site de l'infection. L'action des neutrophiles cause des dommages à l'épithélium intestinal et une fuite de liquides extravasculaires dans l'intestin, contribuant ainsi à la diarrhée (306). En revanche, l'infection de *S. Typhi* chez les humains n'est pas associée à cette réponse inflammatoire, et le principal facteur de virulence responsable est la capsule Vi (283, 365). Lorsque cette bactérie pénètre dans la muqueuse intestinale, l'expression du locus *viaB*, contenant les gènes codant pour la capsule, est induite et il en résulte une production de capsule et l'expression du régulateur TviA (346) (Fig. 5b). D'une part, la capsule dissimule le LPS et les flagelles, ce qui empêche leur interaction avec leurs récepteurs et le complément (376, 377). D'autre part, le régulateur TviA peut s'associer à RcsB, le régulateur du système à phosphorelais RcsBCD. Conjointement avec RcsB, TviA active les gènes du locus *viaB* et inhibe l'expression des gènes *flhDC* codant pour un régulateur positif des gènes de synthèse des flagelles et du SST3-1 (360, 361, 377). Cela permet l'expression de la capsule et inhibe l'expression des flagelles ainsi que du SST3-1. Donc, la capsule Vi empêche *S. Typhi* d'être reconnue par les défenses immunitaires, ce qui empêche le déclenchement de la réponse inflammatoire et le recrutement des neutrophiles, et cela explique pourquoi la fièvre typhoïde n'est généralement pas associée à une diarrhée au stade précoce de l'infection.



**Figure 5. Différences dans la réponse inflammatoire intestinale lors de l'infection par *S. Typhimurium* et *S. Typhi*.** A) Certains composants (flagelles, SST3-1 et LPS) de la surface de *S. Typhimurium* sont reconnus par le système immunitaire inné de l'hôte, ce qui recrute les neutrophiles et déclenche une forte réaction inflammatoire. B) *S. Typhi* possède le locus *viaB* qui code pour la capsule Vi et le régulateur TviA qui permettent de diminuer la production des flagelles, du SST3-1 et du LPS et de les dissimuler du système immunitaire, ce qui empêche le recrutement des neutrophiles et le déclenchement de la réponse inflammatoire. Figure adaptée de (365).

Cette caractéristique explique en grande partie la différence entre l'infection de *S. Typhimurium* et celle de *S. Typhi*. *S. Typhimurium* colonise l'intestin, force son entrée dans les cellules épithéliales et peut survivre dans les macrophages du tissu intestinal, mais l'infection se limite généralement au niveau de l'intestin dû à une réponse immunitaire rapide et efficace (154). Cependant, l'infection peut devenir invasive, particulièrement chez les patients ayant un système immunitaire affaibli, et mener à une infection systémique plus grave (105, 163). Au contraire de *S. Typhimurium*, l'infection par *S. Typhi* ne se limite pas à

l'intestin. La faible réponse immunitaire intestinale lui permet de franchir la barrière de cellules épithéliales et d'infecter les macrophages sous-jacents (283).

*S. Typhi* survit dans les macrophages humains, ce qui lui permet d'être disséminée dans le système réticulo-endothélial (170, 223). Lorsque *S. Typhi* est internalisée dans les cellules phagocytaires, elle se retrouve dans des phagosomes appelés vacuoles contenant des salmonelles (SCV pour *Salmonella-containing vacuoles*) (136, 326). *Salmonella* possède un deuxième SST3 retrouvé sur le SPI-2 qui lui permet de survivre dans les macrophages. Lorsque la bactérie se trouve dans les SCV du macrophage, elle rencontre des conditions de faible concentration en magnésium et en phosphate ainsi que de pH acide qui induisent l'expression des gènes du SPI-2 et du SST3-2 (104, 146, 160). Ce dernier permet d'injecter des effecteurs protéiques dans les cellules qui auront pour effet de modifier la composition de la SCV et la signalisation cellulaire du macrophage. Cela protège les bactéries contre les défenses antimicrobiennes du macrophage et permet la réplication de *Salmonella* dans les SCV (21, 109, 146). La survie dans les macrophages a été démontrée pour *S. Typhimurium* dans des modèles de fièvre typhoïde murine. En effet, des mutants défectifs en SPI-2 de *S. Typhimurium* sont sévèrement atténués lors de l'infection de souris, étant incapable de proliférer dans les différents organes (160). Les gènes du SPI-2 sont également requis dans la survie et la prolifération intracellulaire de *S. Typhimurium* dans les macrophages murins *in vitro* (161). Toutefois, la survie intracellulaire de *S. Typhi* dans les macrophages humains *in vitro* semble être indépendante du SPI-2, suggérant que le SST3-2 ne soit pas requis pour la survie et la croissance intracellulaire chez *S. Typhi* (116). *Salmonella* possède également un grand nombre de facteurs de virulence et de systèmes de défense pour survivre aux multiples facteurs antimicrobiens du macrophage. La survie dans les macrophages est essentielle à l'établissement de l'infection systémique et permet à *S. Typhi* d'être transportée vers les ganglions lymphatiques, le foie et la rate de son hôte (91, 108, 170, 356).

Après 7 à 14 jours, *S. Typhi* est relâchée dans le sang et colonise le foie, la rate, la moelle osseuse, la vésicule biliaire et les plaques de Peyer (170, 267). À ce moment, les symptômes de la fièvre typhoïde apparaissent (170, 267). Les bactéries associées à la vésicule biliaire sont excrétées dans les selles et peuvent infecter de nouveau l'intestin, menant à des symptômes

beaucoup plus graves comme des saignements intestinaux, des perforations de l'intestin, des encéphalopathies et possiblement à la mort du patient (170, 267).

### 1.1.3. Régulation

Durant son cycle d'infection, *Salmonella* rencontre divers environnements. L'habilité à s'adapter rapidement aux changements de conditions environnementales est essentielle pour la survie et la virulence de *Salmonella*. En réponse aux différents signaux environnementaux, *Salmonella* exprime plusieurs gènes de stress et de virulence qui sont requis pour faire face à ces changements de conditions. Comme la majorité des bactéries, *Salmonella* possède plusieurs systèmes de régulation pour répondre aux différents stress. Parmi les principaux systèmes de régulation, on retrouve le système SOS, le système de réponse au choc thermique, la répression catabolique, le système de transition entre les conditions aérobiques et anaérobiques, la réponse stringente, les systèmes de réponse faces à une carence en nutriments, et le système de réponse aux pH acides (137, 300).

L'activité d'un régulateur est généralement affectée par un signal environnemental ou intracellulaire. Il existe différentes sortes de régulateurs et les plus importants sont les protéines régulatrices et les ARN régulateurs. Ces régulateurs affectent l'expression de gènes ou la production de protéines de multiples façons. La régulation peut affecter la transcription ou la traduction, par l'activation ou l'inhibition de leur initiation ou par leur arrêt précoce, causant une augmentation ou une baisse de production d'ARN messagers (ARNm) ou de protéines. La régulation de la transcription se fait généralement par la liaison d'un facteur de transcription sur une région de l'ADN située au niveau du promoteur du gène régulé, ce qui empêche ou facilite la liaison de l'ARN polymérase. La régulation de la traduction implique souvent une modification dans la machinerie impliquée dans l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction (ribosome, ARN de transfert, facteurs protéiques). La traduction peut également être régulée par la présence d'une structure secondaire de l'ARNm qui modifie positivement ou négativement la traduction, ou par un appariement entre l'ARNm et un petit ARN régulateur qui modifie l'accès au ribosome ou qui induit la dégradation de l'ARNm. Finalement, d'autres régulateurs agissent au niveau post-traductionnel, où les protéines subissent des modifications qui changent leur activité.

### 1.1.3.1. Protéines régulatrices

*Salmonella* possède un grand nombre de protéines régulatrices qui ont comme principale fonction d'activer ou d'inhiber la transcription des gènes. Certaines protéines régulent un nombre restreint de gènes, souvent impliqués dans la même fonction, tandis que d'autres protéines appelées « régulateurs globaux » régulent un grand nombre de gènes de diverses fonctions. Bien que beaucoup de protéines régulatrices n'appartiennent pas à une famille précise de régulateurs, plusieurs protéines font partie de groupes de régulateurs qui partagent la même structure ou les mêmes fonctions.

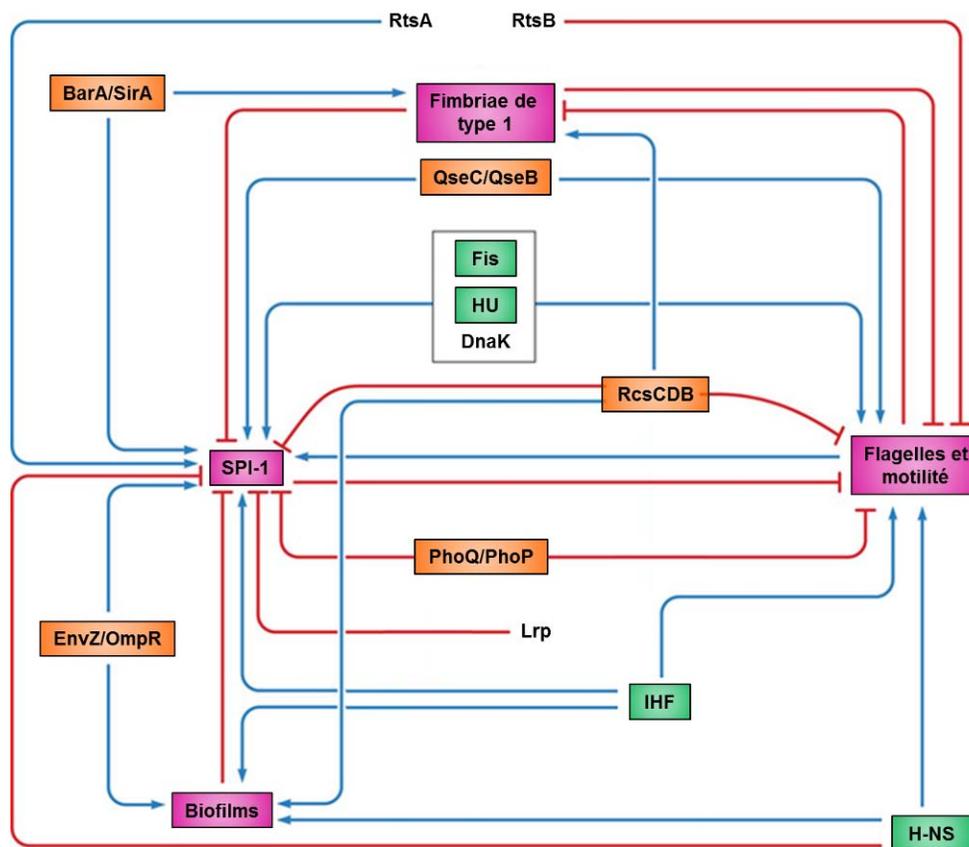
Les facteurs sigma alternatifs sont un groupe de protéines qui s'associent à l'ARN polymérase et permettent une reconnaissance spécifique de certains promoteurs ainsi qu'une séparation des brins d'ADN lors de la transcription (187). Chez *Salmonella*,  $\sigma^{70}$  est responsable de l'expression des gènes de ménage (*housekeeping genes*) durant la croissance normale (315). Le remplacement de ce facteur sigma par des facteurs alternatifs lors de situations particulières modifie le choix des promoteurs de l'ARN polymérase et influence ainsi l'expression de plusieurs gènes (294). *Salmonella* possède cinq facteurs sigma alternatifs,  $\sigma^E$  ( $\sigma^{24}$ ),  $\sigma^F$  ( $\sigma^{28}$ ),  $\sigma^H$  ( $\sigma^{32}$ ),  $\sigma^S$  ( $\sigma^{38}$ ) et  $\sigma^N$  ( $\sigma^{54}$ ) (315). Ces facteurs sont impliqués dans la régulation d'un grand nombre de gènes, dont plusieurs ont un rôle dans la virulence de *Salmonella*. RpoS ( $\sigma^S$ ) est particulièrement important chez cette bactérie car il permet l'expression des gènes qui contribuent à la survie lors de conditions de stress, particulièrement lors de la phase de croissance stationnaire. RpoS est également important pour la virulence de *Salmonella* (101, 187, 294).

Un autre groupe de régulateurs importants comprend les protéines associées au nucléoïde, ou protéines de type histone, qui altèrent la topologie de l'ADN (90, 100). Ces protéines modifient le niveau de surenroulement de l'ADN, et l'expression de plusieurs gènes s'en trouve affectée. Ces protéines contribuent ainsi à la structure du nucléoïde et à la régulation génique. *Salmonella* possède environ 12 de ces protéines régulatrices (294), dont Fis, H-NS, Hha, HU, IHF et Ydgt qui ont un rôle dans la virulence de *Salmonella* (90, 100, 294).

L'adaptation aux différentes conditions rencontrées lorsque *Salmonella* infecte son hôte se fait souvent par l'intermédiaire de systèmes à deux composantes (SDC) (31). Un SDC

classique est composé d'une protéine senseur située dans la membrane cytoplasmique, et d'une protéine régulatrice cytoplasmique (31, 294). La protéine senseur perçoit un stimulus dans le périplasme, s'autophosphoryle et transfère son phosphate au régulateur cytoplasmique (31, 100, 294). L'activation du régulateur cause un changement de conformation qui modifie sa capacité de liaison à l'ADN, ce qui entraîne un changement dans l'expression des gènes cibles (31, 100, 294). *Salmonella* possède plusieurs SDC qui répondent à différents signaux, tels la température, le pH, l'oxygène, l'osmolarité, le niveau de certains ions et le contact avec les cellules de l'hôte, et plusieurs de ces systèmes ont un rôle dans la virulence de *Salmonella* (31, 100, 315).

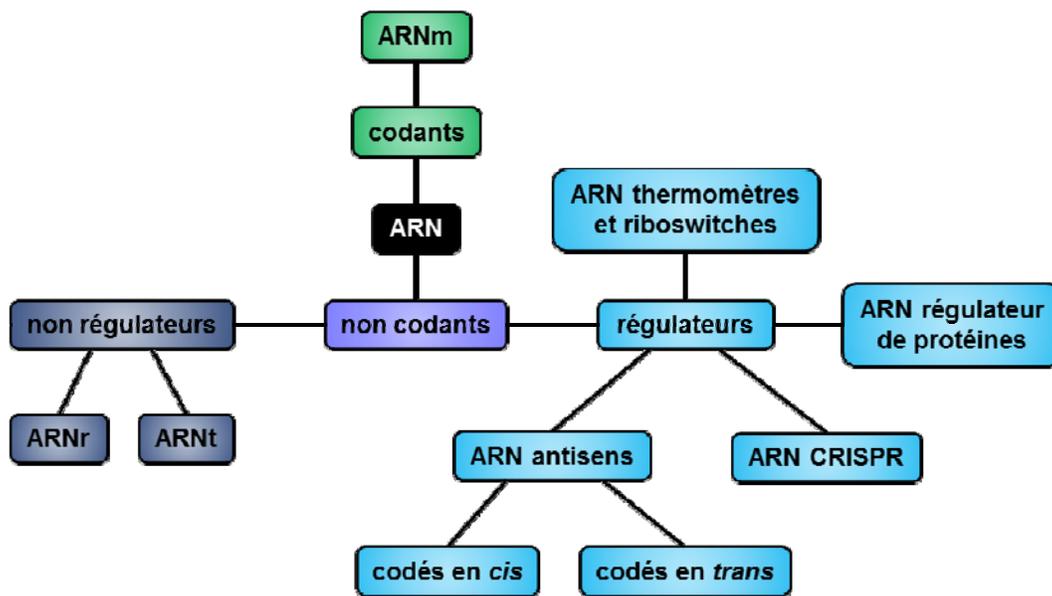
La régulation de l'expression des gènes joue un rôle majeur dans la pathogenèse de *Salmonella*, permettant de coordonner l'expression des facteurs de virulence dans le bon endroit et au bon moment (100). Un grand nombre de protéines régulatrices affectant la virulence ont été décrites chez cette bactérie. Ces régulateurs affectent l'expression de différents éléments ayant un rôle dans la virulence, comme les différents SPI, les fimbriae, les flagelles, les composants du biofilm, les gènes du plasmide de virulence pSLT chez *S. Typhimurium* et de la capsule chez *S. Typhi* (100, 294). Une même cible peut être régulée par plusieurs protéines, et un régulateur peut réguler plusieurs cibles. Chez *Salmonella*, les voies de régulation des différents éléments de virulence sont partagées entre les différentes protéines régulatrices, ce qui permet de synchroniser l'expression des différents facteurs de virulence afin d'assurer une pathogenèse efficace (100) (Fig. 6).



**Figure 6. Interconnexion dans la régulation des éléments de virulence de *Salmonella* par plusieurs protéines régulatrices.** Plusieurs protéines régulatrices (cadre vert : protéines associées au nucléoïde, cadre orange : SDC) régulent les mêmes éléments de virulence (cadre violet) chez *Salmonella*, permettant une régulation spatio-temporelle rigoureuse de la pathogenèse. Figure adaptée de (100).

### 1.1.3.2. Petits ARN régulateurs

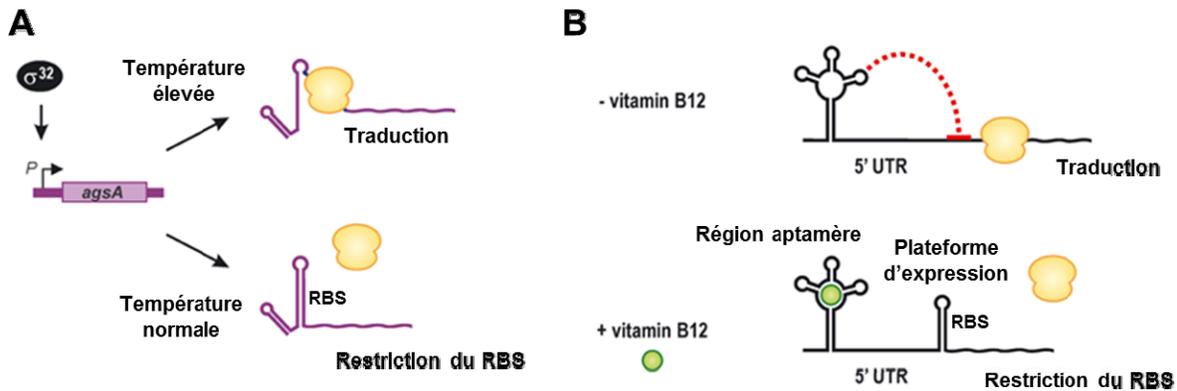
L'activation et l'inhibition de la transcription par des protéines régulatrices ont longtemps été considérées comme les seuls mécanismes utilisés pour modifier l'expression des gènes. Cependant, la régulation post-transcriptionnelle au niveau de l'ARNm est maintenant considérée comme un mécanisme majeur de la régulation génique (264). Il existe deux classes d'ARN : les ARN codants qui sont les ARNm, et les ARN non codants (Fig. 7). Les ARN non codants peuvent être sous-divisés entre les ARN régulateurs et les ARN non régulateurs, comprenant les ARN ribosomiaux (ARNr) et les ARN de transfert (ARNt).



**Figure 7. Différents types d'ARN présents chez les bactéries.** Les molécules d'ARN peuvent être classées en deux catégories, les ARN codants et les ARN non codants. Ces derniers sont divisés en ARN non régulateurs et régulateurs. Parmi les ARN régulateurs, il y a les ARN thermomètres et les riboswitches, les ARN régulateurs de protéines, les ARN CRISPR et les ARN antisens. Figure adaptée de (181).

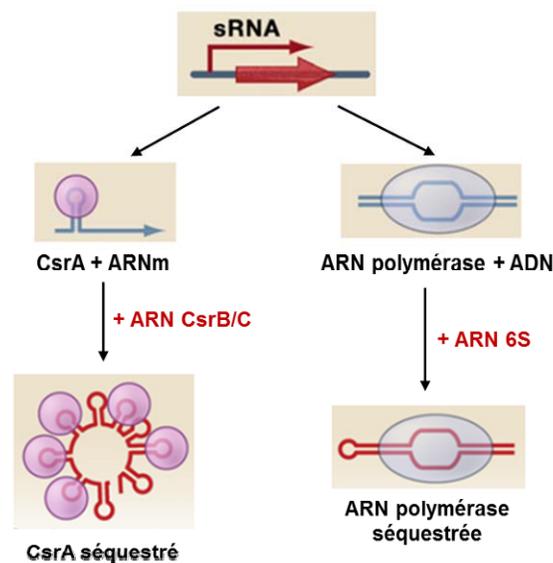
Le premier groupe d'ARN régulateurs est constitué d'ARN qui contrôlent l'expression génique en *cis*, soit les ARN thermomètres et les riboswitches (Fig. 8). Ces éléments régulateurs sont des séquences d'ARN retrouvées dans la région non codante (UTR pour *untranslated region*) située en 5' de certains ARNm. Ces séquences d'ARN non codantes peuvent adopter différentes conformations en réponse aux signaux environnementaux, influençant ainsi l'expression des gènes en aval (369). Les ARN thermomètres se retrouvent dans la région 5'UTR de gènes répondant à la température et peuvent changer entre deux structures distinctes (265). Lorsque la température est basse, ils forment une conformation fermée qui restreint l'accès des ribosomes au site de liaison du ribosome (RBS pour *ribosome binding site*) ou au premier codon AUG. Lorsque la température augmente, la structure inhibitrice est modifiée en conformation ouverte qui permet l'accès au ribosome et l'initiation de la traduction (265). Les riboswitches sont des éléments d'ARN structuraux situés dans la région 5'UTR de gènes métaboliques qui ressentent le métabolite qui est synthétisé ou utilisé

par la protéine codée en aval (264, 369). Les riboswitches sont généralement organisés en deux parties : la région aptamère qui s'associe au ligand, et la plateforme d'expression qui peut interchanger entre deux conformations en fonction de la liaison du ligand à la région aptamère (264, 369). Dans de nombreux cas, la liaison du ligand inhibe la traduction de l'ARNm en aval en bloquant l'accès du RBS par la formation d'une structure inhibitrice de la plateforme d'expression, créant ainsi une boucle de rétroaction inhibitrice (264, 369). *Salmonella* possède des ARN thermomètres qui régulent certains gènes de réponse au choc thermique comme *agsA*, et des riboswitches qui régulent des gènes métaboliques comme la vitamine B12, le cofacteur molybdène, la flavine mononucléotide et la thiamine pyrophosphate (363).



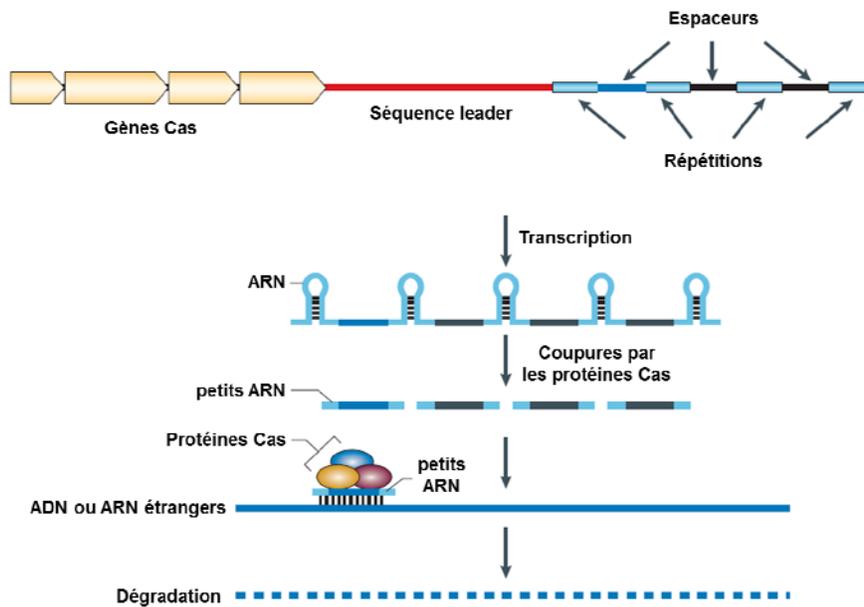
**Figure 8. ARN thermomètres et riboswitches.** A) Lorsque la température est basse, les ARN thermomètres forment une structure inhibitrice qui restreint l'accès du ribosome et inhibe la traduction, et lorsque la température est élevée, un changement de conformation permet la liaison du ribosome et la traduction. B) En absence de métabolite, les riboswitches permettent la liaison du ribosome et la traduction, et en présence de métabolite, celui-ci s'associe à la région aptamère provoquant une structure inhibitrice de la plateforme d'expression, ce qui restreint l'accès du ribosome et inhibe la traduction. Figure adaptée de (363).

Le deuxième groupe d'ARN non codants régulateurs sont des ARN qui s'associent directement à des protéines et qui modifient l'activité de ces protéines en mimant la structure d'autres acides nucléiques (369) (Fig. 9). *Salmonella* exprime trois ARN de cette catégorie. L'ARN 6S mime un promoteur ouvert et s'associe spécifiquement au complexe de l'ARN polymérase associé au  $\sigma^{70}$ , ce qui empêche ce complexe de lier l'ADN (366, 367). Ce complexe entre l'ARN polymérase et  $\sigma^{70}$  est donc séquestré par l'ARN 6S et cela augmente l'association de l'ARN polymérase avec les facteurs sigma alternatifs (366, 367). Les petits ARN CsrB et CsrC modifient l'activité de la protéine CsrA, un régulateur traductionnel pouvant lier l'ARN (363). CsrA affecte la stabilité et la traduction de plusieurs ARNm en s'associant à leur région 5'UTR sur des motifs GGA (369). CsrB et CsrC contiennent plusieurs motifs GGA et lorsqu'ils sont exprimés, ils séquestrent CsrA loin des ARNm (265, 369). Ces deux petits ARN sont importants dans la virulence de *Salmonella* (181, 363).



**Figure 9. ARN régulateurs de protéines.** Certains ARN s'associent directement à des protéines et modifient leur activité en mimant la structure d'autres acides nucléiques. Figure adaptée de (369).

Le troisième groupe a été découvert récemment et comprend les ARN CRISPR (*Clustered, Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*). Les loci CRISPR sont des régions d'ADN très variables formées d'une séquence leader suivie de plusieurs séries de répétitions identiques entrecoupées d'espaceurs non similaires qui forment le système CRISPR avec les gènes *cas* (*CRISPR associated*) adjacents (Fig. 10) (324). Il a été démontré que ces systèmes CRISPR offrent une immunité aux bactéries en les protégeant contre l'ADN ou l'ARN étranger provenant de plasmides et de phages (169). Le mode d'action précis de ce système n'est pas encore connu, mais une fois transcrit, les répétitions forment des structures secondaires de type tige-boucle dans le long ARN, ce qui entraîne sa coupure en petits ARN par les protéines Cas (324). Ces petits ARN correspondent aux espaceurs et leurs séquences sont souvent homologues aux séquences de plasmides ou de phages étrangers (324). Ces petits ARN s'apparient à l'ADN ou à l'ARN étranger et provoquent leur dégradation à l'aide des protéines Cas (324). *Salmonella* possède quelques systèmes CRISPR dont les espaceurs ont de l'homologie avec certains prophages, suggérant que cette bactérie ait acquis une immunité contre ces phages (181).



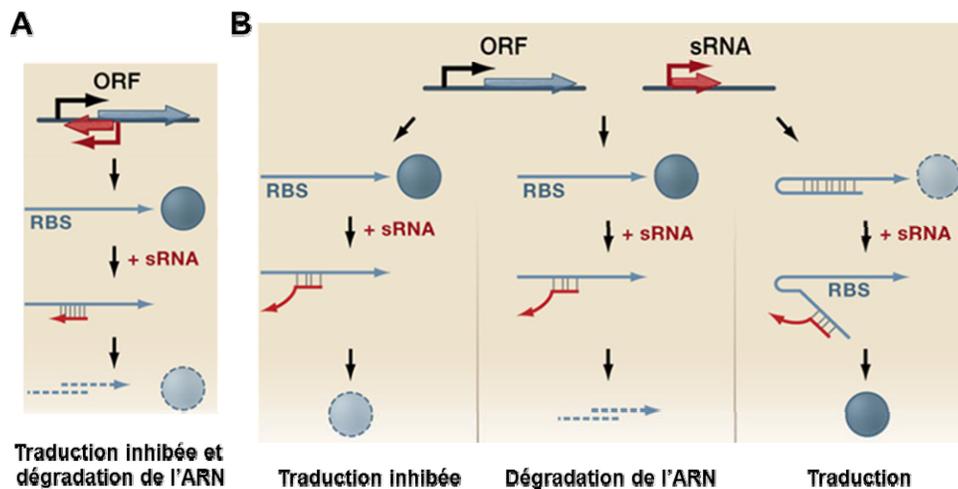
**Figure 10. ARN CRISPR.** Le système CRISPR est formé de gènes Cas, d'une séquence leader, de répétitions et d'espaceurs non similaires. Après la transcription, les protéines Cas

coupent le long transcrit en petits ARN. Ces petits ARN reconnaissent et s'associent à de l'ADN ou à de l'ARN étranger, ce qui provoque leur dégradation. Figure adaptée de (324).

Finalement, le dernier groupe d'ARN régulateurs non codants est constitué des petits ARN dont la régulation est effectuée par un appariement antisens avec les ARNm, de loin le groupe contenant le plus grand nombre de petits ARN (Fig. 11). Certains ARN sont codés en *cis* sur le brin d'ADN opposé à leurs ARN cibles et partagent une grande complémentarité avec leurs cibles (265, 369). Lorsqu'ils sont exprimés, ces petits ARN codés en *cis* s'apparient à l'ARNm codé sur le brin opposé et induisent sa dégradation ou inhibent sa traduction (265, 369). *Salmonella* possède plusieurs petits ARN codés en *cis* et certains d'entre eux semblent jouer un rôle dans la virulence (263, 265). D'autres petits ARN sont codés en *trans* et régulent des ARNm cibles qui sont situés sur des régions différentes du chromosome. Ces ARN mesurent généralement entre 50 à 250 nucléotides, possèdent des structures secondaires diversifiées et sont codés dans les régions intergéniques (265). Ces petits ARN peuvent réguler un grand nombre de cibles et les séquences d'appariement avec les ARNm sont souvent courtes et imparfaites (369). La régulation par ces petits ARN est souvent négative, où leur appariement dans la région 5'UTR des ARNm cibles restreint l'accès du RBS ou des premiers codons, ce qui inhibe la traduction ou diminue la stabilité de l'ARNm (181, 264, 369). Dans de plus rares occasions, la régulation est positive et l'appariement modifie la conformation de l'ARNm de sorte à augmenter sa stabilité ou permettre l'initiation de la traduction (123). La majorité de ces petits ARN codés en *trans* nécessite la chaperonne Hfq pour leur activité. Hfq augmente leur stabilité et facilite leur appariement avec les ARNm (364).

Il y a plus de 70 petits ARN antisens qui ont été identifiés chez *Salmonella* (181, 363). La majorité de ces ARN régulateurs sont exprimés dans des conditions physiologiques et environnementales très spécifiques (369). Plusieurs petits ARN sont impliqués dans la régulation de la composition de l'enveloppe cellulaire, du transport et du métabolisme des acides aminés, de la synthèse et du métabolisme du fer et de différents sucres, de la réponse au stress oxydatif et dans la régulation du facteur RpoS (157, 181, 363). Également, beaucoup de petits ARN antisens ont un rôle dans la virulence de *Salmonella* (157, 181, 265, 363). En effet, certains petits ARN antisens dont les gènes se retrouvent dans une région conservée du génome de *Salmonella* régulent des cibles situées dans des régions spécifiques à cette bactérie,

notamment dans des îlots de pathogénicité. C'est le cas de SgrS, un petit ARN dont le gène est situé dans une région conservée du génome de *Salmonella*, qui inhibe la traduction de *sopD*, un gène situé dans le SPI-1 et codant pour un effecteur important dans l'invasion des cellules épithéliales (265). De plus, l'expression d'un grand nombre de petits ARN antisens est régulée par des facteurs de transcription et beaucoup de petits ARN régulent en retour des protéines régulatrices, indiquant qu'il y a une connexion importante entre ces deux types de régulateurs (215).



**Figure 11. ARN antisens.** A) Les ARN antisens (*sRNA*) codés en *cis* s'apparient avec une très grande complémentarité à l'ARNm codé sur le brin opposé, ce qui cause sa dégradation ou inhibe sa traduction. B) Les ARN antisens codés en *trans* s'apparient de façon imparfaite à l'ARNm codé par une région différente du chromosome, ce qui peut inhiber la traduction, causer la dégradation de l'ARN ou activer la traduction. Figure adaptée de (369).

## 1.2. Homéostasie du fer

### 1.2.1. Généralités sur le fer

Le fer est le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre, ce qui fait de cet élément un des métaux le plus abondants sur la Terre. Il est retrouvé sous deux états redox interchangeables, la forme réduite  $Fe^{2+}$  appelée fer ferreux et la forme oxydée  $Fe^{3+}$  appelée fer ferrique. L'état du fer dépend de la teneur en oxygène et du pH de l'environnement où il se

trouve. En absence d'oxygène (anaérobie) et à pH acide, le fer se retrouve principalement sous la forme réduite  $\text{Fe}^{2+}$  alors qu'en présence d'oxygène (aérobie) et à pH neutre, le fer se retrouve sous la forme oxydée  $\text{Fe}^{3+}$  (311). Le fer est essentiel pour la vie de la très grande majorité des organismes, des bactéries aux animaux. Au niveau biologique, le fer ferreux est incorporé dans des protéines sous différentes formes (groupement hémunique et groupement fer-soufre) et agit souvent en tant que donneur d'électron ou de catalyseur. Il est impliqué dans plusieurs processus biologiques importants comme la photosynthèse, la fixation d'azote, la méthanogenèse, la respiration, le cycle de Krebs (cycle TCA), le transport d'oxygène, la régulation génique et la synthèse d'ADN (13). Seuls les bactéries lactiques *Lactobacillus* et le pathogène intracellulaire obligatoire responsable de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, ne semblent pas dépendre du fer pour survivre (175, 276).

Les bactéries ont besoins de fer, mais son acquisition et son utilisation ne sont pas sans difficultés. L'oxygène est le principal problème car, en sa présence, la disponibilité du fer devient restreinte et le fer favorise la production de radicaux oxygénés toxiques. Sous la forme ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ), le fer est relativement soluble (0,1 M à pH 7). Par contre, lorsque le fer est oxydé ( $\text{Fe}^{3+}$ ), il devient beaucoup moins soluble ( $10^{-9}$  M à pH 7) et la biodisponibilité diminue lorsque le fer est lié aux molécules de l'hôte ( $10^{-24}$  M) (288, 290). De plus, la majorité du fer retrouvé dans l'environnement est sous la forme oxydée et les bactéries ne peuvent utiliser le fer que sous sa forme réduite (13). Puisqu'une cellule bactérienne a besoin d'une concentration de fer d'environ  $10^{-6}$  M cela nécessite le déploiement de mécanismes d'acquisition spécialisés (43, 290). De plus, le fer ferreux est toxique lorsqu'il est en présence d'oxygène. À l'intérieur de la bactérie, le fer est sous la forme réduite et l'interaction entre le  $\text{Fe}^{2+}$  et l'oxygène produit des espèces réactives oxygénées (*reactive oxygen species* ou ROS) qui causent des dommages aux différents composants cellulaires (69). Les bactéries doivent donc employer divers moyens permettant de détoxifier le fer intracellulaire.

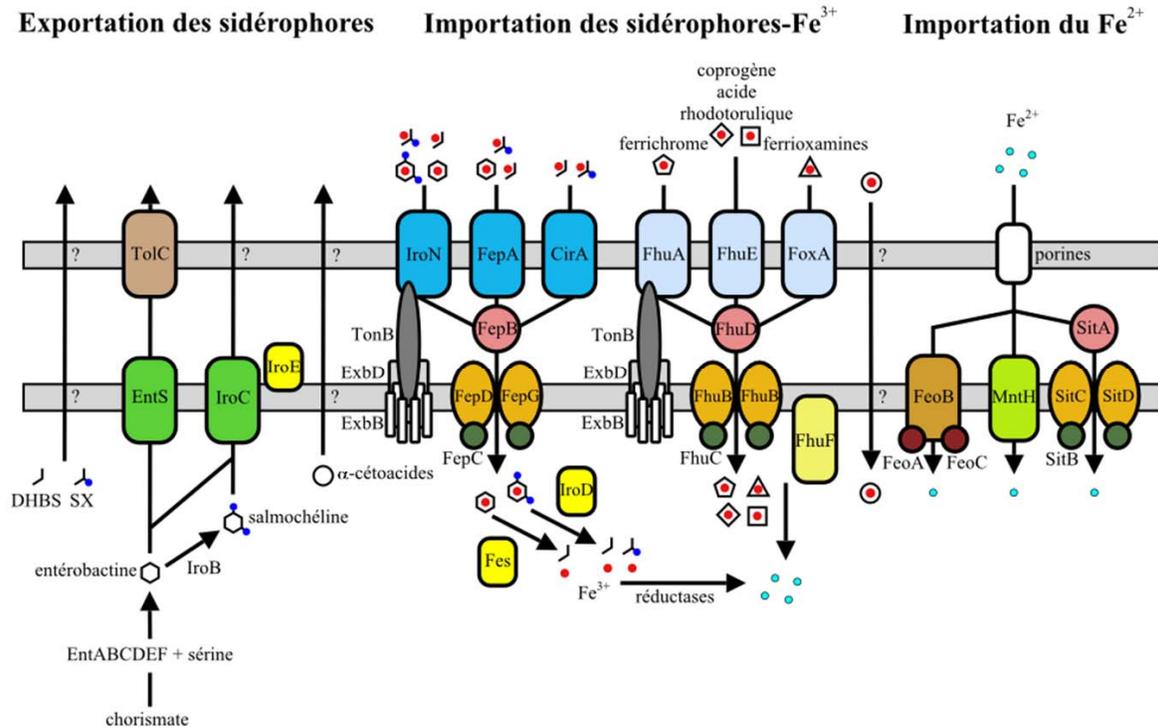
### **1.2.2. Acquisition du fer**

Les bactéries pathogènes se retrouvent dans différents environnements tout au long de leur cycle d'infection. Lorsqu'elles ne sont pas dans leurs hôtes, elles se retrouvent dans l'environnement (eau, nourriture, surfaces, etc.). Une fois qu'elles sont dans leurs hôtes, elles

vont infecter différents systèmes selon le type d'agents pathogènes, que ce soit le système respiratoire, nerveux, lymphatique, digestif ou sanguin. Dans tous ces environnements, elles doivent acquérir les différents nutriments nécessaires à leur survie et multiplication. Ces nutriments, dont le fer, sont généralement très peu disponibles. Le fer peut se retrouver en grande quantité dans certains environnements, principalement dans des conditions expérimentales. Les systèmes de faible affinité permettant l'acquisition du fer lorsque sa concentration est élevée sont peu connus (13). Néanmoins, la disponibilité du fer est généralement très restreinte due à l'oxydation en  $\text{Fe}^{3+}$  en conditions aérobiques. Les bactéries pathogènes font face à un autre problème puisque l'hôte séquestre le fer par des complexes avec différentes molécules. Ces complexes constituent une source de fer pour l'hôte et la séquestration permet de diminuer l'effet toxique du fer libre. C'est également une façon de restreindre le niveau de fer libre pour limiter les infections par des bactéries pathogènes. Les humains et les animaux possèdent une famille de glycoprotéines transportant le fer qui inclue la transferrine retrouvée dans le sérum, la lactoferrine présente dans divers fluides extracellulaires, et l'ovotransferrine retrouvée dans l'albumen d'oeufs (287, 288). Le fer est également transporté par les molécules d'hème retrouvées dans plusieurs protéines, dont l'hémoglobine. Finalement, la majorité des organismes possèdent la ferritine, la principale protéine qui entrepose le fer (287, 288).

Afin de parvenir à se procurer le fer dont elles ont besoin, les bactéries emploient différentes stratégies. Elles peuvent diminuer le pH extérieur ou réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  dans le but d'augmenter la biodisponibilité du fer (13). Les bactéries peuvent également acquérir le fer en utilisant des petites molécules ayant une forte affinité pour le  $\text{Fe}^{3+}$ , appelées sidérophores, qui peuvent extraire le fer ferrique retrouvé dans l'environnement et contenu dans les différentes molécules de l'hôte. Les bactéries peuvent synthétiser et utiliser leurs propres sidérophores, ou tout simplement utiliser les sidérophores sécrétés par d'autres organismes. En plus des sidérophores, certaines bactéries pathogènes peuvent intercepter directement les différentes molécules de l'hôte complexées avec le fer afin de leur prendre ce nutriment. Finalement, lorsque les bactéries se trouvent dans des conditions anaérobiques, elles acquièrent directement le fer qui est dans son état réduit  $\text{Fe}^{2+}$ . Ces stratégies impliquent une panoplie de systèmes souvent redondants avec différentes molécules sécrétées, des récepteurs

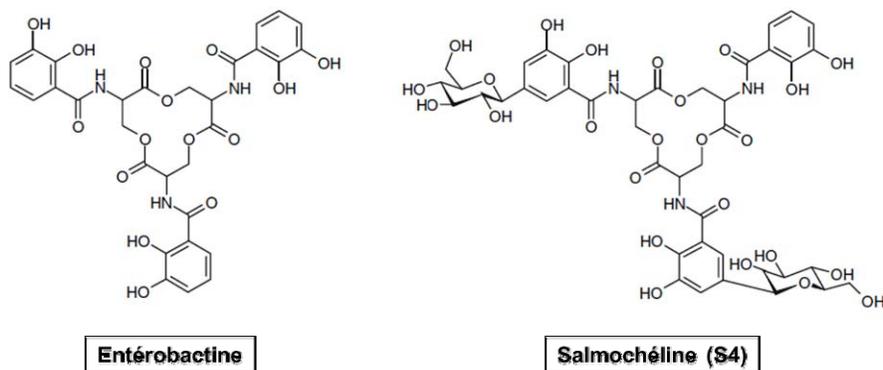
et des transporteurs retrouvés au niveau de l'enveloppe bactérienne. Les systèmes d'acquisition du fer de *Salmonella* sont présentés dans la figure 12.



**Figure 12. Systèmes d'acquisition du fer de *Salmonella*.** *Salmonella* synthétise les sidérophores entérobactine et salmochéline qui sont exportés à l'extérieur de la bactérie à l'aide de transporteurs situés dans la membrane interne. Les sidérophores s'associent au Fe<sup>3+</sup> et les complexes ferri-sidérophores de *Salmonella* ainsi que certains complexes provenant d'autres microorganismes sont internalisés par des récepteurs de la membrane externe et des systèmes de transport de type ABC dans le périplasma et la membrane interne. L'internalisation des complexes ferri-sidérophores nécessite l'action du complexe TonB-ExbB-ExbD. Une fois dans le cytoplasme, le fer est relâché par l'hydrolyse des sidérophores via des estérases ou par une réduction du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> via des réductases. Le Fe<sup>3+</sup> peut être obtenu également par des α-cétoacides qui sont synthétisés, exportés et internalisés par *Salmonella* par des mécanismes méconnus. Finalement, le Fe<sup>2+</sup> diffuse librement au travers la membrane externe via des porines et traverse la membrane interne par les systèmes Feo, Sit et MntH.

### 1.2.2.1. Acquisition du fer par des sidérophores

Lorsque les bactéries se trouvent dans des milieux où la concentration en fer est limitante, elles doivent recourir à différentes stratégies afin d'obtenir le fer dont elles ont besoin pour leur métabolisme. Une de ces stratégies est l'utilisation de sidérophores qui sont des petites molécules ayant une forte affinité pour le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ces molécules sont sécrétées par les bactéries dans le milieu extracellulaire et vont soutirer le fer qui est lié aux molécules de l'hôte ou de l'environnement. Il existe différents types de sidérophores, classés selon la structure chimique du groupement chélateur liant les ions  $\text{Fe}^{3+}$  : les catécholates, les hydroxamates et les carboxylates (289). En général, les bactéries de l'espèce *Salmonella enterica* possèdent deux systèmes de sidérophores, c'est-à-dire qu'elles codent pour les gènes nécessaires à la synthèse, l'exportation, l'internalisation et l'hydrolyse des sidérophores entérobactine et salmochéline (Fig. 13). Certaines souches possèdent également des sidérophores qui ne se retrouvent pas chez la majorité des salmonelles. Finalement, *Salmonella* exprime quelques récepteurs et transporteurs reconnaissant des sidérophores produits par d'autres microorganismes (bactéries et champignons). Tous les sidérophores sont reconnus par des récepteurs situés dans la membrane externe des bactéries. L'internalisation de tous les complexes ferri-sidérophores de *Salmonella* nécessite l'action du complexe TonB-ExbB-ExbD qui procure l'énergie nécessaire à la translocation du sidérophore lié au récepteur de la membrane externe jusque dans le périplasma. Des protéines périplasmiques facilitent le transport des sidérophores jusqu'à des transporteurs de type ABC (*ATP-binding cassettes*) situés dans la membrane cytoplasmique. Finalement, une fois dans le cytoplasme, les complexes ferri-sidérophores sont hydrolysés par des estérases ou sont la cible de réductases qui réduisent le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), diminuant ainsi son affinité pour le sidérophore. Les processus de synthèse, d'exportation, d'internalisation et d'hydrolyse des sidérophores entérobactine et salmochéline sont présentés en détails dans les sections qui suivent, ainsi que les différents types de sidérophores utilisés seulement par certaines salmonelles et les différents systèmes d'acquisition des sidérophores produits par d'autres microorganismes.



**Figure 13. Structure de l'entérobactine et de la salmochéline.** Figure adaptée de (140).

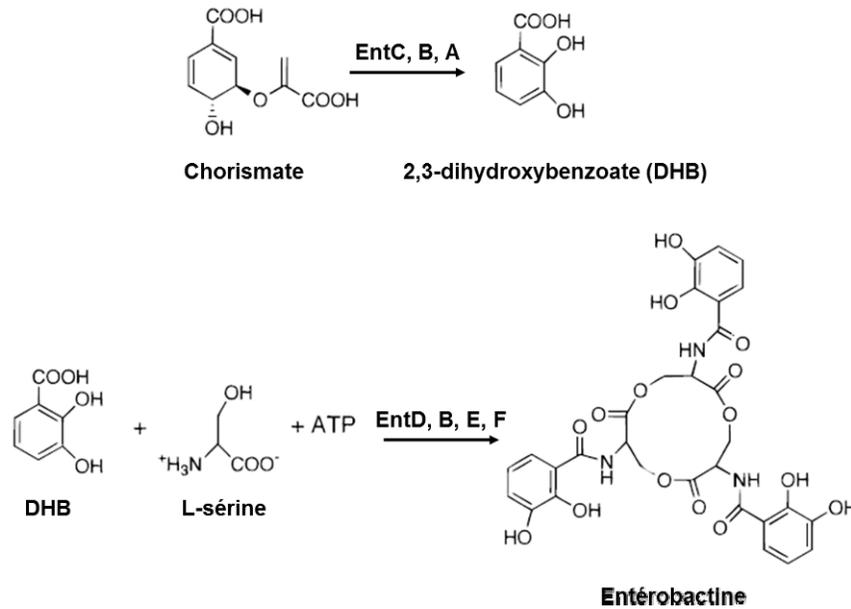
### Entérobactine

L'entérobactine (également appelée enterochéline) (254, 273) est le sidérophore le plus étudié et probablement le mieux compris, que ce soit son transport ou son interaction avec le fer. Ce sidérophore est le plus commun chez les entérobactéries. Plusieurs bactéries pathogènes et commensales possèdent ce système d'acquisition du fer comme *Shigella*, *Klebsiella*, *Escherichia* et *Salmonella*. Ce sidérophore fait partie de la famille des catécholates, puisque sa structure contient des groupements catéchols qui ont une forte affinité pour le fer (Fig. 13). Effectivement, l'entérobactine est la molécule possédant la plus forte affinité pour le fer, avec une constante d'affinité de l'ordre de  $10^{-49}$  M ( $10^{-35}$  M dans les conditions physiologiques) (289).

### Synthèse de l'entérobactine

Lorsque la concentration en fer est faible, les gènes codant pour les protéines impliquées dans la synthèse, l'exportation, l'importation et l'hydrolyse de l'entérobactine sont exprimés car le répresseur Fur est inactif. Ces différents gènes sont retrouvés dans un segment du génome d'environ 22 kb. En tout, 14 gènes organisés en six opérons s'y trouvent et 13 de ces gènes sont liés à l'entérobactine. Il a été démontré que le gène *fepE* code plutôt pour la protéine Wzz impliquée dans la régulation de la polymérisation de l'antigène O du LPS (240). Les gènes et les opérons de ce complexe génomique contiennent une séquence consensus de liaison du régulateur Fur (*Fur box*) au niveau de leur promoteur. La synthèse de

l'entérobactine commence par un précurseur, le chorismate, qui est également un précurseur des acides aminés aromatiques. À l'aide des enzymes EntABC, il y a formation d'une molécule de 2,3-dihydroxybenzoate (DHB). EntC, une isochorismate synthétase, agit en premier en convertissant le chorismate en isochorismate. Ensuite EntB, une isochorismate lyase, transforme l'isochorismate en 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate et cette molécule est convertie en DHB par EntA, une 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate déshydrogénase. Ensuite, les enzymes EntDBEF ajoutent une molécule de L-sérine au DHB pour former le 2,3-dihydroxybenzoyl sérine (DHBS). Les trois enzymes EntBEF font partie du système de synthèse peptidique non ribosomale (*non-ribosomal peptide synthetase* ou NRPS). EntB est donc une enzyme qui possède deux fonctions qui sont impliquées dans les deux étapes de synthèse de l'entérobactine (131). EntD est une phosphopantetheinyl transférase qui active les enzymes EntF et EntB en catalysant leur phosphopantetheinylation (124, 131). Ensuite, les trois enzymes du NRPS assemblent les molécules de sérine et de DHB pour former un trimère de DHBS linéaire. Finalement, il y a formation de l'entérobactine cyclique à l'aide de EntF qui provoque la cyclisation de trois DHBS (124). Les deux étapes de synthèse de l'entérobactine sont représentées de façon simplifiée à la figure 14. Lors de cette synthèse, il y a certains précurseurs (monomère et dimère de DHBS) de l'entérobactine qui sont relâchés prématurément. Il a été démontré que ces molécules de DHBS peuvent servir de sidérophores de moins grande affinité pour le fer mais pouvant permettre la croissance bactérienne en carence de fer (149). Les précurseurs DHB et les produits de dégradation DHBS peuvent également promouvoir la croissance de *Salmonella* en présence de norépinephrine (227).



**Figure 14. Synthèse de l'entérobactine.** Une molécule de DHB est synthétisée par les enzymes EntC, EntB et EntA à partir du précurseur chorismate. Ensuite, les enzymes EntD, EntB, EntE et EntF rajoutent une molécule de L-sérine au DHB pour former le DHBS. La cyclisation de trois DHBS forme la molécule d'entérobactine. Figure adaptée de (131).

### Exportation de l'entérobactine

Une fois synthétisée, l'entérobactine est exportée par EntS, un exportateur de la famille des *major facilitator superfamily* (MFS) situé dans la membrane cytoplasmique. Cette protéine est codée par le gène *entS*, anciennement nommée *ybdA* (126). Un mutant du gène *entS* chez *E. coli* ne sécrète pratiquement pas d'entérobactine et une augmentation des sous-produits de dégradation (monomère, dimère et trimère linéaires de DHBS) est observée. Cette augmentation est due à l'hydrolyse de l'entérobactine accumulée dans le cytoplasme par l'estérase Fes. Le moyen de transport de ces sous-produits de dégradation vers l'extérieur de la bactérie reste indéterminé. Chez *Salmonella*, un deuxième exportateur de sidérophores, IroC, permet l'exportation de l'entérobactine (74). Un mutant *entS* chez *S. Typhimurium* sécrète moins d'entérobactine que la souche sauvage, confirmant que EntS est le principal exportateur de l'entérobactine. Cependant, un niveau assez élevé d'entérobactine est détecté dans le milieu extracellulaire pour prédire qu'elle peut être exportée par un autre transporteur (74). Un

double mutant *entS iroC* ne sécrète aucune entérobactine, démontrant que la protéine IroC est le second transporteur impliqué dans l'export de ce sidérophore (74).

Dans le périplasma, l'enzyme IroE peut dégrader la molécule cyclique d'entérobactine en molécule trimérique (DHBS)<sub>3</sub>. IroE est une estérase périplasmique (153) qui hydrolyse préférentiellement les molécules d'entérobactine et de salmochéline qui ne sont pas liées au fer (*apo* sidérophores) (210). IroE permet donc l'exportation de deux formes d'entérobactine vers le milieu extracellulaire.

Il n'est pas connu si l'entérobactine circule librement dans le périplasma ou si une protéine périplasmique aide le transport du sidérophore vers la membrane externe. Par contre, il a été démontré que TolC, une protéine située dans la membrane externe, est requise pour l'exportation de l'entérobactine vers le milieu extracellulaire (38). TolC forme un canal de la membrane externe ayant un prolongement périplasmique impliqué dans l'exportation de plusieurs molécules, comme des antibiotiques, des peptides antibactériens (microcines et colicines), des toxines, des détergents et des sels biliaires (200). Le fonctionnement de TolC est généralement en partenariat avec des protéines situées dans la membrane interne et le périplasma, formant différentes combinaison de système à efflux (167). Un mutant du gène *tolC* chez *E. coli* ne sécrète plus d'entérobactine, démontrant le rôle de TolC dans l'exportation de ce sidérophore (38). Par contre, aucun des systèmes à efflux de type *resistance nodulation cell division* (RND) ne semble être requis pour cette sécrétion. Toutefois, les sous-produits de dégradation DHBS sont tout de même présents dans le milieu extracellulaire d'un mutant *tolC*, donc une autre protéine de la membrane externe doit transporter ces molécules. Ces découvertes ont été réalisées chez *E. coli*, mais à ce jour aucune étude chez *Salmonella* n'a démontré le rôle de TolC dans l'exportation de l'entérobactine.

#### Internalisation des complexes ferri-entérobactine

Lorsque l'entérobactine est à l'extérieur de la bactérie, la très forte affinité de ce sidérophore pour le fer va lui permettre de lier les ions Fe<sup>3+</sup> en complexe avec des molécules de l'hôte ou libres dans l'environnement. Le complexe ferri-entérobactine est reconnu par le récepteur FepA situé dans la membrane externe. Lorsque le complexe ferri-entérobactine se lie

au récepteur FepA, celui-ci subit un changement de conformation permettant la translocation du complexe jusqu'au périplasme (49). En plus de reconnaître l'entérobactine, FepA reconnaît d'autres sidérophores de type catécholate comme les différentes formes de DHBS, les myxochélines, la protochéline et deux sidérophores catécholates synthétiques (TRENCAM et MECAM) (14, 93, 149, 159, 280, 341). Ce récepteur est également la cible de microcines, colicines et bactériophages (44, 269, 279). Chez *Salmonella*, l'entérobactine peut également lier le récepteur IroN, le récepteur de la salmochéline (26). Un simple mutant *fepA* ou *iroN* dans une souche *ent-* (aucune synthèse de sidérophore) peut croître sans problème sur un milieu minimal où la seule source de fer est l'entérobactine, mais un double mutant *fepA iroN* est incapable de survivre. Cela démontre que ces deux récepteurs peuvent transporter l'entérobactine (280, 281). Un troisième récepteur de la membrane externe nommé CirA (ou Cir) permet de reconnaître les sous-produits de dégradation de l'entérobactine : (DHBS) et DHB (149, 250). Ce récepteur peut lui aussi reconnaître d'autres sidérophores de types catécholates comme les myxochélines, la protochéline, les amonabactines et le produit de dégradation de la salmochéline SX (153, 269, 280, 291, 374). Il est également la cible de certaines molécules antibactériennes (269, 291). Seulement un triple mutant *fepA iroN cirA* est incapable de croître sur un milieu minimal où la seule source de fer est le DHBS. Cela démontre que ces produits de dégradation de l'entérobactine utilisent les trois récepteurs de sidérophores catécholates de *Salmonella* : FepA, IroN et CirA (280). La majorité des souches de *E. coli* possèdent le récepteur Fiu et certaines souches UPEC possèdent le récepteur Iha qui ont sensiblement les mêmes fonctions que CirA, c'est-à-dire qu'ils internalisent les produits linéaires DHBS de l'entérobactine (208, 250). Ces récepteurs sont absents chez *Salmonella*.

Le transport du complexe ferri-entérobactine du récepteur de la membrane externe jusqu'au périplasme nécessite de l'énergie qui est fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD. Ce complexe est situé au niveau de la membrane cytoplasmique et procure l'énergie nécessaire à la translocation du sidérophore par la force protomotrice (*proton motive force*). TonB est la protéine qui procure cette force protomotrice aux différents récepteurs de la membrane externe, appelés transporteurs dépendants de TonB (TBDT pour *TonB-dependent transporter*) (252). TonB a d'abord été associé avec les transporteurs de sidérophores et de la vitamine B-12, démontrant qu'il est requis pour l'acquisition de complexes ferri-sidérophores,

de la vitamine B-12 ainsi que de certaines colicines qui utilisent ces récepteurs (309). Dernièrement, il a été démontré que TonB interagit avec beaucoup d'autres transporteurs et qu'il est important pour l'acquisition du nickel, du cobalt, du cuivre et de glucides dans différentes bactéries (309). Présentement, il y a 98 TBDT qui ont été identifiés chez les bactéries (232).

TonB possède un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal périplasmique et est en complexe avec les protéines ExbB et ExbD. Celles-ci sont situées dans la membrane cytoplasmique, et ExbD possède également un domaine C-terminal périplasmique (202). Ces trois protéines sont retrouvées sous le ratio 1 TonB : 2 ExbD : 7 ExbB (162). La liaison entre le sidérophore et son récepteur provoque un changement de conformation de ce dernier et cela envoie un signal au complexe TonB-ExbB-ExbD. Cela entraîne une interaction entre TonB et une séquence d'environ sept acides aminés du domaine N-terminal du récepteur appelée boîte TonB (*TonB box*). Il n'est pas encore clair comment cette interaction entre TonB et le récepteur provoque le transport du sidérophore. Il existe différents modèles, mais de façon simpliste, le complexe ExbB-ExbD utilise le gradient de proton de la membrane cytoplasmique et transmet l'énergie à TonB, ce qui entraîne son mouvement via son domaine C-terminal dans le périplasma pour aller lier le récepteur et y transférer l'énergie. L'interaction entre TonB et le récepteur provoque un autre changement de conformation permettant la translocation du sidérophore dans le périplasma (202). *Salmonella* possède huit TBDT : FepA, Iron, CirA, FoxA, BtuB, YncD, FhuA et FhuE, les deux derniers étant des pseudogènes chez le sérovar Typhi (232, 381). Chez *Salmonella*, le complexe TonB-ExbB-ExbD est requis pour la croissance en milieu pauvre en fer (350).

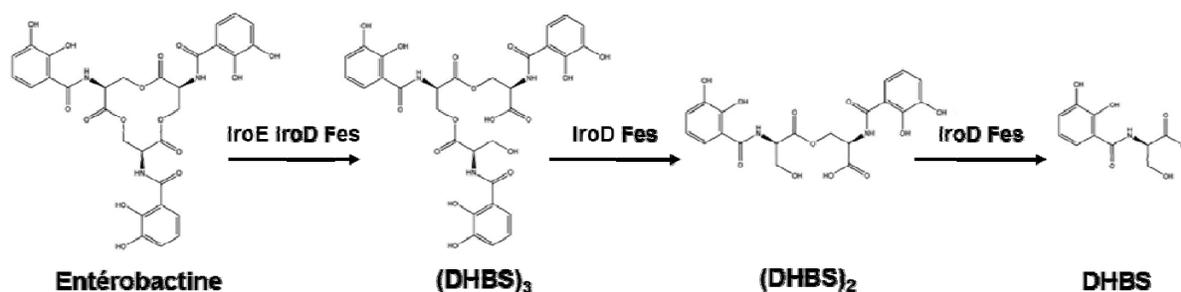
Dans le périplasma, le complexe ferri-entérobactine s'associe avec la protéine FepB qui transporte le sidérophore vers le système de transport de type ABC situé dans la membrane interne (325, 327). FepB est une protéine périplasmique faisant partie de la famille des *periplasmic binding proteins* (PBP) et la liaison spécifique entre le complexe ferri-entérobactine et FepB permet à cette protéine de diriger le sidérophore vers son système spécifique de perméase de la membrane cytoplasmique (92). Le transport du complexe ferri-entérobactine à travers la membrane cytoplasmique se fait via le système de transport ABC formé par les protéines FepD, FepG et FepC (313). Un système de transport de type ABC

classique contient deux domaines hydrophobes et deux domaines liant l'ATP. FepD et FepG sont deux protéines hydrophobes situées dans la membrane cytoplasmique et forment un hétérodimère (59, 92, 313). Ces deux protéines forment un canal qui peut être en mode fermé ou ouvert. FepC est une protéine située dans le cytoplasme en périphérie de la membrane cytoplasmique qui contient des motifs pouvant lier l'ATP. Deux protéines FepC lient les domaines hydrophobes de FepDG. Lorsque le complexe ferri-entérobactine entre en contact avec les protéines FepDG, un changement de conformation de ce canal de l'état fermé à l'état ouvert se produit. Ce changement de conformation entraîne la liaison de l'ATP aux deux protéines FepC et l'hydrolyse de l'ATP fournit finalement l'énergie pour la translocation du sidérophore dans le cytoplasme. Chez *E. coli*, un mutant dans un des trois gènes *fepD*, *fepG* ou *fepC* est incapable de croître dans des conditions de carence en fer. Un tel mutant ne peut incorporer le fer, démontrant le rôle de FepD, FepG et FepC dans l'internalisation du fer (58). Chez *Salmonella*, un mutant *fepD* et un mutant *fepB* sont incapables de croître sur un milieu pauvre en fer, démontrant la nécessité de ce système ABC pour le transport des sidérophores (74). Une étude chez *E. coli* a démontré qu'il n'y a pas d'accumulation du complexe ferri-entérobactine au niveau du périplasme dans un mutant *fepB* (248). En effet, chez ce mutant, l'entérobactine entre dans le périplasme par le récepteur FepA mais est immédiatement expulsée par TolC.

### Hydrolyse de l'entérobactine

Une fois dans le cytoplasme, le complexe ferri-entérobactine est hydrolysé par l'enzyme Fes. Cette protéine est une estérase qui hydrolyse les liaisons ester de l'entérobactine (47). Cette hydrolyse a pour effet de linéariser ce sidérophore en différents produits de dégradation : le trimère (DHBS)<sub>3</sub> ou entérobactine linéaire, le dimère (DHBS)<sub>2</sub> et le monomère DHBS (Fig. 15) (47, 210). Fes hydrolyse plus efficacement l'entérobactine lorsqu'elle est associée avec le Fe<sup>3+</sup> (*holo* Ent) que lorsqu'elle est sous la forme *apo* Ent. Cela confirme que cette enzyme est l'hydrolase impliquée dans la dissociation du fer de l'entérobactine dans le cytoplasme (210). L'enzyme IroD, l'estérase de la salmochéline, peut également hydrolyser l'entérobactine en DHBS (210, 393). L'hydrolyse de l'entérobactine en sous-produits de moins grande affinité pour le fer par Fes et IroD facilite donc la relâche et le transfert du fer aux différentes

protéines bactériennes. Le fer est réduit sous la forme  $Fe^{2+}$  par le milieu réducteur intracellulaire et par l'action de réductases, et le  $Fe^{2+}$  peut alors être utilisé par les différents systèmes bactériens (229).



**Figure 15. Les quatre molécules d'entérobactine.** L'entérobactine cyclique est hydrolysée en trois produits de dégradation (DHBS)<sub>3</sub>, (DHBS)<sub>2</sub> et DHBS par les différentes estérases. Figure adaptée de (55).

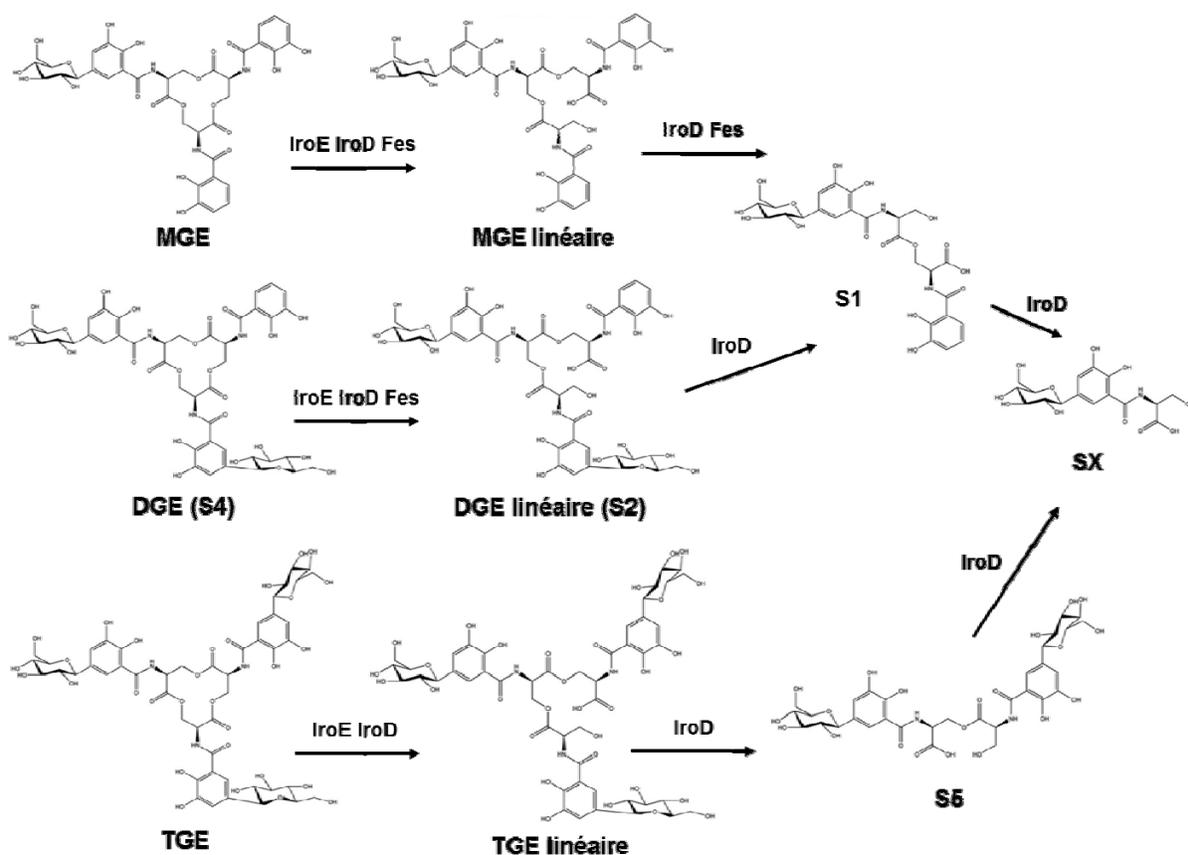
### Salmochélines

Certaines bactéries possèdent des sidérophores de type aéro bactéine, yersiniabactine ou salmochéline. Cette dernière est retrouvée principalement chez des bactéries pathogènes comme les différents sérovars de *Salmonella enterica* (sauf *Salmonella bongori*), *Klebsiella pneumoniae* ainsi que certaines souches de *E. coli* pathogènes (153). Le locus *iroA* contient cinq gènes, *iroBCDEN*, codant pour les protéines responsables de la synthèse, l'exportation, l'importation et l'hydrolyse des salmochélines. Les salmochélines consistent en des molécules d'entérobactine qui sont glucosylées (Fig. 13). Les salmochélines font donc également partie de la famille des sidérophores catécholates et cette modification ne change pas l'affinité du sidérophore pour le fer (211). La glucosylation de l'entérobactine procure divers avantages aux salmochélines. Elles sont moins hydrophobes que l'entérobactine et elles ne sont pas séquestrées par le lipocalin 2, une protéine du système immunitaire inné des mammifères qui séquestre l'entérobactine (111).

### Synthèse des salmochélines

Le locus *iroA* est organisé en deux parties : l'opéron *iroBCDE* suivi du gène *iroN* dans l'orientation opposée (26). Les régions promotrices des gènes *iroBCDE* et *iroN* contiennent

une séquence de liaison au régulateur Fur (26, 28). La synthèse des salmochélines dépend des enzymes EntABCDEF nécessaires à la synthèse de l'entérobactine. L'ajout de glucose se fait par l'enzyme IroB, codé par le gène *iroB*, qui est une C-glucosyltransférase (36, 110). IroB transfère les groupes glucosyls de l'uridine-5'-diphosphoglucose sur le groupement 2,3-dihydroxybenzoate (DHB) de l'entérobactine en position C5 (110). L'ajout des molécules de glucose par IroB peut se faire sur une, deux ou trois unités de DHB de l'entérobactine pour ainsi créer les trois molécules cycliques de salmochélines : monoglucosyl-C-entérobactine (MGE), diglucosyl-C-entérobactine (DGE) et triglucosyl-C-entérobactine (TGE) (110). La salmochéline la plus produite par les bactéries est le DGE aussi nommé salmochéline S4. Il a été démontré chez *S. Typhimurium* qu'un mutant *iroB* ne produit plus aucun type de salmochélines, confirmant le rôle de IroB comme étant la seule enzyme responsable de la glucosylation et de la formation des salmochélines (74). Il existe également des sous-produits de dégradation des trois types de salmochélines. Ces molécules sont obtenues par l'hydrolyse des liaisons esters par les estérases IroD, IroE et Fes (210, 393). Les trois types de salmochélines peuvent être linéarisées pour former les molécules de MGE linéaire, DGE linéaire (aussi nommé salmochéline S2) et TGE linéaire. L'hydrolyse des molécules de MGE linéaire et DGE linéaire sur un groupement ester par IroD ou Fes produit la salmochéline S1 qui consiste en un dimère de DHBS avec un glucose. L'hydrolyse de la molécule de TGE linéaire par IroD produit la salmochéline S5 qui consiste à un dimère de DHBS avec deux glucoses. Finalement, l'hydrolyse des molécules S1 et S5 par IroD forme la salmochéline SX, un monomère de DHBS avec un glucose. Les neuf différentes formes de salmochélines sont représentées dans la figure 16.



**Figure 16. Les neuf molécules de salmochélines.** Il existe trois molécules cycliques de salmochélines selon le nombre de glucose, soit le MGE (un glucose), le DGE (deux glucoses) et le TGE (trois glucoses). Ces trois molécules peuvent être linéarisées par les estérases IroE, IroD et Fes. Les trois molécules linéaires peuvent être hydrolysées en produits de dégradation S1, S5 et SX. Figure adaptée de (55).

Certaines souches de *E. coli* et de *K. pneumoniae* possèdent des gènes homologues aux gènes *iroB* et *iroD* qui sont impliqués dans la modification post-traductionnelle de peptides antibactériens appelés microcines (153). Les microcines E492 (*K. pneumoniae*), H47 et M (*E. coli*) font partie de la famille des sidérophores-peptides (ou sidérophores-microcines) où les peptides sont liés à des sidérophores de type salmochéline MGE linéaire (291, 340, 354). La synthèse de ces microcines dépend de la synthèse de l'entérobactine, et les homologues de IroB et IroD permettent la maturation de ces peptides. Ces microcines matures peuvent reconnaître et entrer par les récepteurs FepA, CirA, Fiu et IroN, un processus dépendant du complexe TonB-ExbB-ExbD (269). Cette modification des microcines leur permet donc d'être

plus efficaces et de reconnaître une plus large gamme de récepteurs. Il est possible que certaines bactéries sécrètent ces sidérophores-microcines à titre de cheval de Troie pour tuer des bactéries compétitrices exprimant des récepteurs de sidérophores sans elles-mêmes produire ces sidérophores (111).

### Exportation des salmochélines

Le gène *iroC* du locus *iroA* code pour un transporteur de type ABC situé dans la membrane cytoplasmique permettant l'exportation des molécules de salmochélines vers le périplasma (153). Une étude analysant le rôle des pompes EntS et IroC dans la sécrétion de l'entérobactine et des salmochélines chez *S. Typhimurium* a montré qu'il n'y a aucune sécrétion de salmochéline S4 chez un mutant *iroC*, confirmant que la salmochéline S4 est exportée uniquement par IroC (74). Un fait intéressant est qu'un mutant *entS* sécrète plus de salmochélines, probablement dû à la glycosylation de l'entérobactine accumulée dans le cytoplasme. Le double mutant *entS iroC* sécrète plus de sidérophores monomères SX et DHBS que la souche sauvage, un résultat également observé chez une souche de *E. coli* pathogène extra-intestinal (ExPEC) (54, 74). L'accumulation de l'entérobactine et des salmochélines dans le cytoplasme du double mutant *entS iroC* favorise leur dégradation par les estérases Fes et IroD. Cette observation montre toutefois que ces produits de dégradation de l'entérobactine et des salmochélines sont exportés par un autre moyen que par les transporteurs EntS et IroC. Ce mode d'exportation reste toujours indéterminé.

Dans le périplasma, l'estérase IroE peut dégrader les molécules cycliques de salmochélines en sidérophores linéaires. IroE hydrolyse les molécules cycliques d'entérobactine et de salmochélines en trimères linéaires et, contrairement aux estérases Fes et IroD, IroE ne dégrade pas ces sidérophores en produits dimériques et monomériques (210, 393). L'action de IroE expliquerait en partie la grande proportion de produits linéaires dans les surnageants de bactéries cultivées en condition de carence en fer. Un mutant *iroE* sécrète plus de salmochéline cyclique (S4) et moins de produits linéaires (36). Cette dégradation en sidérophores linéaires permet d'exporter une plus grande diversité de formes de molécules chélatrices, offrant un avantage pour acquérir le fer dans différents milieux.

Un des avantages des salmochélines est que ces molécules glycosylées sont moins hydrophobes comparativement à l'entérobactine (111). L'hydrophobicité de l'entérobactine fait en sorte que ce sidérophore a tendance à se loger dans les membranes lipidiques, diminuant ainsi ses capacités à lier le fer. La glucosylation de l'entérobactine par IroB et surtout son hydrolyse par IroE diminue grandement l'affinité des molécules pour les membranes lipidiques, favorisant les chances des salmochélines d'obtenir le fer dans les environnements riches en membranes, grandement retrouvés chez l'hôte (111, 211).

Bien que l'exportation de l'entérobactine par TolC a été démontré chez *E. coli*, aucune étude n'a encore démontré que TolC est impliqué dans l'exportation des salmochélines.

### Internalisation des complexes ferri-salmochélines

Une fois à l'extérieur de la bactérie, les salmochélines vont extraire le fer contenu dans les molécules de l'hôte ou dans l'environnement. Les complexes ferri-salmochélines sont reconnus par le récepteur IroN (homologue de FepA) dans la membrane externe (26). Contrairement à l'entérobactine qui peut lier FepA et IroN, les salmochélines sont reconnues par un seul récepteur, IroN (153). Effectivement, un double mutant *cirA fepA* croît très bien sur un milieu où la seule source de fer est la salmochéline, mais un triple mutant *cirA fepA iroN* ne pousse pas (153). IroN reconnaît différents sidérophores de type catécholate comme l'entérobactine, les DHBS, les amonabactines, la protochéline, les myxochélines et la corynebactine (280). Comme FepA et CirA, IroN est la cible de diverses molécules antibactériennes comme les microcines (269). L'internalisation de ces différentes molécules par IroN nécessite l'énergie de la force protomotrice fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD (227). Certaines études mentionnent que le récepteur CirA peut internaliser le produit de dégradation de la salmochéline SX (Rabsh 2003, Williams 2006, Hantke 2003), mais aucune étude ne l'a directement démontré. Puisque CirA internalise la molécule DHBS, il est donc probable qu'il internalise sa forme glucosylée, c'est-à-dire la molécule SX.

Une étude effectuée chez *E. coli* a démontré que le transporteur IroC est impliqué dans l'entrée des salmochélines (393). L'ajout de salmochéline S2 comme seule source de fer permettait la croissance d'un mutant *fepB* possédant les gènes *iroBCDN* sur un plasmide, ce

qui signifiait également que FepB n'est pas important pour l'acquisition de la salmochéline S2. Hors, une étude subséquente chez *S. Typhimurium* a démontré que IroC n'est pas impliqué dans l'entrée des salmochélines à l'intérieur de la bactérie (74). Cette même étude a démontré que la présence des protéines FepD et FepB est essentielle pour la croissance sur un milieu contenant uniquement la salmochéline S4 comme source de fer, indiquant que l'internalisation de ce sidérophore requiert la protéine périplasmique FepB ainsi que le système de transport de type ABC FepDGC. Les résultats de cette dernière étude sont ceux qui ont été le plus utilisés par la communauté scientifique.

### Hydrolyse des salmochélines

Dans le cytoplasme, les salmochélines sont hydrolysées par l'estérase IroD qui est un homologue de Fes (210, 393). Comme Fes, IroD hydrolyse plus efficacement les sidérophores liés au fer (210). IroD peut hydrolyser l'entérobactine et les trois types de salmochélines cycliques (MGE, DGE et TGE) dans toutes les formes de produits de dégradation. Fes peut également hydrolyser les molécules MGE et DGE en produits linéaires, mais de façon peu efficace (210). L'incapacité de l'enzyme Fes à hydrolyser efficacement les molécules de salmochélines explique la présence de l'estérase IroD encodée par le locus *iroA* (210). La dégradation des salmochélines par IroD facilite donc la relâche et le transfert du fer aux différentes protéines bactériennes. Le fer est réduit sous la forme  $Fe^{2+}$  par le milieu réducteur intracellulaire et par l'action de réductases, et le  $Fe^{2+}$  peut alors être utilisé par les différents systèmes bactériens (229).

### **Sidérophores produits par certaines salmonelles**

Les systèmes de sidérophores entérobactine et salmochélines sont retrouvés chez toutes les salmonelles, sauf *Salmonella bongori* qui ne produisent pas les salmochélines. En plus de ces deux types de sidérophores, certains sérovars et certaines souches de *Salmonella enterica* possèdent d'autres systèmes de sidérophores qui sont absents de la majorité des salmonelles.

Certaines souches épidémiques de *S. Typhimurium* et de *S. Wien* ainsi que certain isolats de *S. Arizona*, *S. Austin* et *S. Memphis* possèdent les gènes codant pour l'aérobactine, un sidérophore de type hydroxamate (66, 177, 226). Lorsqu'une souche de *Salmonella* possède

les gènes codant pour l'aérobactine, ceux-ci se retrouvent typiquement sur des plasmides (271). L'aérobactine est un sidérophore qui est produit généralement par l'espèce *Aerobacter aerogenes*, par certaines espèces de *E. coli* pathogènes ainsi que par la majorité des *Shigella flexneri* et *boydii* (271). La synthèse de l'aérobactine dépend des quatre gènes *iucABCD*, et le gène *iutA* code pour un récepteur de la membrane externe, IutA (271). L'internalisation est dépendante du complexe TonB-ExbB-ExbD. De plus, l'importation dans le périplasme et la membrane cytoplasmique est effectuée par le système de transport ABC des sidérophores hydroxamates, FhuDBC. Comme les sidérophores catécholates entérobactine et salmochélines, les gènes de l'opéron *iucABCDiutA* sont régulés négativement par Fur.

Dans une étude cherchant à déterminer quelles salmonelles possèdent l'îlot de pathogénicité trouvé chez les souches virulentes de *Yersinia* (*High-Pathogenicity Island* ou HPI), il a été démontré que seulement certains isolats des sous-espèces III et VI de *Salmonella enterica* possèdent cet îlot (256). Le HPI, retrouvé chez les souches virulentes de *Yersinia* ainsi que chez certaines souches de *E. coli*, de *Citrobacter*, de *Enterobacter*, de *Klebsiella* et de *Salmonella* renferme les gènes codant pour la yersiniabactine, un sidérophore de type carboxylate-mixte (271). La yersiniabactine est donc retrouvée chez certains isolats des sous-espèces III et VI de *Salmonella enterica*, mais aucun sérovar de la sous-espèce I ne possède ce sidérophore (256). Différents gènes *ybt* codent pour la synthèse et le transport de ce sidérophore, et le gène *fyuA* code pour le récepteur de la membrane externe.

### **Sidérophores produits par d'autres microorganismes**

En plus de posséder les systèmes complets de production et d'acquisition des sidérophores entérobactine et salmochélines, les bactéries de l'espèce *Salmonella enterica* peuvent acquérir le fer en reconnaissant des sidérophores produits par d'autres microorganismes (xénosidérophores). Effectivement, *Salmonella* possède différents récepteurs qui permettent de reconnaître des sidérophores produits par d'autres espèces bactériennes ou de champignons, mais qui ne sont pas synthétisés par *Salmonella*. *Salmonella* exprime le récepteur FhuA qui reconnaît le ferrichrome, un sidérophore produit par le champignon *Ustilago sphaerogena* (41, 247, 271). Ce récepteur est également la cible de différents phages, colicines, microcines et des antibiotiques albomycine et rifamycine (41, 42). *Salmonella* exprime aussi le récepteur

FhuE qui reconnaît le coprogène et l'acide rhodotorulique, deux sidérophores produits par certains champignons (*Neurospora crassa* et *Rhodotorula pilimanae*) (148, 349). Il est intéressant de noter que les gènes codant pour ces deux récepteurs, *fhuA* et *fhuE*, sont considérés comme pseudogènes chez *S. Typhi* (266). La perte de fonction de ces deux gènes chez *S. Typhi* semble indiquer que cette bactérie humain-spécifique n'utilise pas les sidérophores xénogènes reconnus par FhuA et FhuE. Finalement, les bactéries des sous-espèces I, II et IIIb de *Salmonella enterica* possèdent un gène codant pour le récepteur FoxA qui est capable de lier les ferrioxamines B, E et G, des sidérophores produits par certaines espèces bactériennes (*Streptomyces*) (197). Contrairement aux récepteurs FhuA et FhuE, FoxA n'est pas commun aux entérobactéries et n'est pas retrouvé chez les espèces d'*Escherichia* et de *Shigella* (271).

Tous ces xénosidérophores sont de type hydroxamate et leur internalisation par les récepteurs FhuA, FhuE et FoxA est dépendante du complexe TonB-ExbB-ExbD, à l'exception des ferrioxamines B et E (41, 42, 197, 271, 307). L'internalisation des ferrioxamines B et E semble dépendre du récepteur FoxA, mais le mécanisme leur permettant de traverser la membrane externe sans l'aide de TonB demeure indéterminé (197). Les gènes codant pour ces trois récepteurs, *fhuA*, *fhuE* et *foxA*, sont régulés par le répresseur Fur chez *S. Typhimurium* (349). En plus d'exprimer ces différents récepteurs, *Salmonella* possède un système de transport de type ABC qui est commun pour tous les sidérophores de type hydroxamate. Ce système est codé par les trois gènes *fhuCDB* de l'opéron *fhuACDB*, où *fhu* signifie *ferric hydroxamate uptake* (183). FhuD est une protéine périplasmique de type PBP qui lie le sidérophore et qui le transporte jusqu'à la perméase cytoplasmique formée de la protéine hydrophobe FhuB (64). FhuC est une protéine ayant un domaine pouvant lier l'ATP et qui est associée à la protéine FhuB dans le cytoplasme. FhuC reconnaît et hydrolyse l'ATP dans le cytoplasme, ce qui fournit l'énergie nécessaire pour le passage du sidérophore dans le canal formé par FhuB jusqu'au cytoplasme. Ce système de transport ABC permet donc l'internalisation des différents sidérophores hydroxamates reconnus par les récepteurs FhuA, FhuE et FoxA, et permet aussi le transport de l'aérobactine reconnue par le récepteur IutA chez les bactéries qui la produisent. Une fois dans le cytoplasme, le fer ferrique  $Fe^{3+}$  contenu dans les complexes ferri-sidérophores est réduit en  $Fe^{2+}$  par des réductases, ce qui a pour effet

de diminuer son affinité pour les sidérophores (229). Il a été démontré chez *E. coli* que la protéine FhuF est une réductase spécifique pour les sidérophores hydroxamates coprogène, ferrichrome et ferrioxamine B (224). L'utilisation de sidérophores produits par d'autres organismes est un avantage surtout pour les bactéries présentes dans l'environnement, mais pour *Salmonella*, le fait de pouvoir utiliser des sidérophores qui ne sont pas retrouvés chez son hôte ne lui procure pas vraiment d'avantage. Il est toutefois possible que *Salmonella* bénéficie de ces récepteurs pour incorporer des sidérophores xénogènes dans l'intestin ou dans l'environnement.

### **Rôle des systèmes d'acquisition du fer avec sidérophores dans la virulence**

Lors d'une infection, *Salmonella* doit être en mesure d'acquérir le fer qui est séquestré par l'hôte et une des façons d'y parvenir est l'utilisation de sidérophores. Ce type de système est important pour la croissance de cette bactérie et plusieurs études ont tenté de déterminer le rôle des deux sidérophores de *Salmonella*, l'entérobactine et les salmochélines, dans la virulence de cette bactérie. Il est pratiquement impossible de déterminer le rôle spécifique de l'entérobactine chez *Salmonella*, car les différents mutants des systèmes de synthèse, d'exportation et d'importation sont également affectés au niveau de la production des salmochélines. C'est pourquoi les rôles dans la virulence attribués à l'entérobactine sont souvent dus aux deux sidérophores. Un grand nombre d'études ont utilisé des mutants *ent* qui ne synthétisent plus l'entérobactine ni les salmochélines. Ces sidérophores sont importants pour la croissance de *Salmonella* dans le sérum murin et humain (32, 125, 374, 382). Par contre, le rôle de ces sidérophores dans la virulence de *Salmonella* est contradictoire selon les différentes études. D'une part, plusieurs études montrent qu'un mutant *ent* est atténué dans la virulence de *S. Typhimurium* (2, 74, 382) et de *S. Typhi* (125, 135) dans des modèles de macrophages *in vitro* et de souris. Une étude récente met en évidence le rôle des sidérophores catécholates comme antioxydants chez *S. Typhimurium*, où un mutant *entC* est atténué chez des macrophages murins traités à l'IFN- $\gamma$  aux temps précoces d'infection, où le stress oxydatif est produit par les cellules (2). D'autre part, des études montrent qu'un mutant *ent* de *S. Typhimurium* n'est pas atténué dans les différentes infections de souris (32, 350). D'autres expériences ont été réalisées avec un mutant *tonB* chez lequel aucun sidérophore ne peut être

internalisé excepté les ferrioxamines B et E. Certaines études montrent que l'acquisition du fer par les sidérophores via TonB peut être importante dans la virulence (135, 227) tandis qu'une autre étude montre que TonB n'est pas requis pour l'infection (40). Une étude montre qu'un mutant *tonB* est atténué lors d'une infection de souris par voie d'infection intragastrique, mais qu'il ne l'est pas lors de l'infection par voie intrapéritonéale (350). De plus, des études utilisant des mutants des récepteurs FepA, IroN et CirA ont montré que l'entérobactine et les salmochélines ne sont pas requises dans la virulence de *S. Typhimurium* chez les souris et de *S. Enteritidis* chez les poulets, puisque le double mutant *fepA/iroN* n'est pas atténué (280, 374). Par contre, les produits de dégradation de ces sidérophores (DHBS, SX) sont importants, car le triple mutant *fepA/iroN/cirA* est atténué lors de ces infections (280, 374). Le même triple mutant n'est toutefois pas atténué lors de l'infection gastro-intestinale de porcs (29). L'hydrolyse de l'entérobactine semble être importante pour la virulence de *S. Typhimurium*, car un mutant *fes* est grandement atténué dans une infection de souris (227). Une mutation du gène *entS* n'a pas d'effet dans la pathogenèse de *S. Typhimurium* lors de l'infection de souris, mais un mutant *iroC* et un double mutant *entS/iroC* présentent une réduction de la virulence, ce qui signifie que la sécrétion des sidérophores joue un rôle dans la virulence, et que les salmochélines sont requises pour l'infection systémique (74).

La caractérisation de l'importance des salmochélines est réalisée plus facilement, car les mutations du locus *iroA* affectent peu l'entérobactine. Toutefois, le rôle des salmochélines dans la virulence de *Salmonella* est également controversé. Une des premières études sur le locus *iroA* a démontré qu'un mutant *iroN* de *S. Choleraesuis* n'est pas atténué dans l'infection de souris (380), des résultats similaires à ceux réalisés avec le mutant *fepA/iroN* de *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* (280, 374). Un mutant *iroBC* incapable de synthétiser ni d'exporter les salmochélines n'est pas atténué dans l'infection de souris selon une étude (280), mais une étude subséquente prouve le contraire puisque les mutants *iroB* et *iroC* sont atténués (74). Les résultats sur le rôle des salmochélines dans la virulence sont peu reproductibles entre les différentes études. Toutefois, le rôle de ce sidérophore dans la résistance au lipocalin 2 démontre que le fait de posséder les salmochélines confère un avantage à *Salmonella* lors de l'infection (112, 284). Cet avantage a été démontré par un test de compétition où la souche sauvage de *S. Typhimurium* est retrouvée sept fois plus que le mutant *iroN* dans l'intestin de

souris, un effet observé seulement chez les souris possédant le gène *Lcn2* codant pour le lipocalin 2 (284).

Tous les sidérophores sont reconnus par des récepteurs situés dans la membrane externe de la bactérie. Les protéines de la membrane externe sont souvent des antigènes immunogéniques et les protéines de la membrane externe régulées par le fer sont appelées IROMPs (*iron-regulated outer membrane proteins*). Plusieurs études ont démontré que les IROMPs de *Salmonella* peuvent être immunogènes et conférer une protection immunitaire contre cette bactérie (61, 107, 185, 322, 323, 374).

Pour résumer, l'importance des systèmes d'acquisition du fer avec sidérophores dans la virulence de *Salmonella* varie beaucoup selon les études. Les différences concernant les résultats de certains mutants peuvent être dues à plusieurs facteurs, dont le type de souris ou de cellules utilisées. En effet, les souris et les cellules utilisées peuvent être sensibles (Nramp-) ou résistantes (Nramp+) à l'infection par *Salmonella* (319), ce qui peut faire varier le phénotype observé lors de l'infection des différents mutants.

#### **1.2.2.2. Acquisition du fer sidérophore-indépendante**

*Salmonella* peut acquérir le fer par différents moyens qui ne dépendent pas de l'utilisation de sidérophores. Cependant, plusieurs systèmes d'acquisition du fer présents chez certaines bactéries pathogènes sont absents de *Salmonella*. Chez l'hôte, le fer est majoritairement retrouvé en association avec des molécules comme la transferrine, la lactoferrine et l'hème (hémoglobine). *Salmonella* ne possède aucun des systèmes pour acquérir directement ces molécules de l'hôte liées au fer. *Salmonella* est aussi incapable d'acquérir le fer via le citrate. L'acquisition du citrate ferrique (*ferric dicitrate*) par le système Fec est très bien caractérisée chez *E. coli*.

En revanche, les  $\alpha$ -cétoacides ( $\alpha$ -*kétoacides*) et les  $\alpha$ -hydroxyacides (produits réduits des  $\alpha$ -cétoacides) peuvent être des sources de fer qui favorisent la croissance de *Salmonella* en conditions de carence en fer (196). Les  $\alpha$ -cétoacides sont des métabolites primaires (exemple : acide pyruvique) produits durant différentes réactions métaboliques (dégradation d'acides aminés, intermédiaires du cycle de l'acide citrique, transamination et désamination) et qui sont

sécrétées par toutes les sortes de cellules (eucaryotes et procaryotes). De prime abord, les  $\alpha$ -cétoacides ont des caractéristiques qui ressemblent aux sidérophores, puisque ce sont des petites molécules sécrétées dans le milieu extracellulaire qui peuvent former des complexes avec le fer et subvenir à la croissance de différentes bactéries en conditions de carence en fer. C'est le cas chez *Salmonella*, car celle-ci réussit à croître sur un milieu où les  $\alpha$ -cétoacides sont la seule source de fer, mais la croissance est plus faible que lorsque la bactérie est complémentée par des sidérophores. Cela démontre que les  $\alpha$ -cétoacides sont moins efficaces que les sidérophores pour approvisionner *Salmonella* en fer (196). De plus, les complexes ferri- $\alpha$ -cétoacides sont internalisés par un processus dépendant de TonB, suggérant que leur entrée dans les bactéries se fait via un récepteur dépendant de TonB (TBDT), qui reste inconnu à ce jour (196). Ce qui différencie les  $\alpha$ -cétoacides des sidérophores conventionnels, c'est que ces derniers sont produits et sécrétés dans le but d'acquérir le fer, tandis que les  $\alpha$ -cétoacides ne sont que des produits du métabolisme. Par contre, il a été démontré chez *S. Typhimurium* que la sécrétion de ces molécules est augmentée en conditions de carence en fer et chez un mutant *fur* (292). Il n'est pas encore clair comment la production de  $\alpha$ -cétoacides est régulée par le fer et par Fur, mais celui-ci est un régulateur ayant un impact sur différents aspects de la physiologie cellulaire, donc il pourrait être impliqué dans la régulation de la production de divers métabolites primaires (37, 292, 347, 349). Par ailleurs, aucun rôle dans la virulence de *Salmonella* n'a encore été associé aux  $\alpha$ -cétoacides.

Également, lorsqu'elle se trouve en conditions d'anaérobie et de pH acide, *Salmonella* peut obtenir le fer sous son état réduit, le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En conditions d'anaérobie, le fer ferreux est beaucoup plus stable et soluble que la forme ferrique, ce qui permet son transport sans l'aide de complexe avec des molécules chélatrices (152). Il existe différents systèmes d'importation du fer ferreux chez *Salmonella*, le système Feo, le système Sit et le transporteur MntH. Il est présumé que le  $\text{Fe}^{2+}$  extracellulaire diffuse librement jusqu'au périplasme par des porines (52). Son transport dans le périplasme ne semble pas nécessiter une liaison avec une protéine, et son transport à travers la membrane cytoplasmique se fait via l'action de transporteurs spécifiques pour le fer (Feo) ou non spécifiques. *Salmonella* possède plusieurs transporteurs pour des métaux divalents (Sit, MntH, ZupT, PspA, MgtAB, MgtE, CorA) (52, 186, 190, 271), et il est possible que certains de ces systèmes transportent le  $\text{Fe}^{2+}$  en plus des

autres métaux. Les systèmes Sit et MntH ont été démontrés comme pouvant internaliser le fer ferreux chez cette bactérie (52, 190). L'internalisation de fer ferreux par les transporteurs Feo, Sit et MntH est indépendante du complexe TonB-ExbB-ExbD (52, 271).

Le système de transport Feo (*Ferrous iron transport*) est commun à toutes les entérobactéries (152, 271). Ce système est composé des protéines FeoA, FeoB et FeoC codées par les trois gènes de l'opéron *feoABC* (52). FeoB est une grande protéine située dans la membrane cytoplasmique et agit en tant que perméase pour l'importation du  $Fe^{2+}$ . Cette protéine possède un domaine C-terminal transmembranaire qui forme deux « portails » (*gate motifs*) constituant la perméase, et un domaine N-terminal cytoplasmique ayant une homologie avec les protéines G eucaryotes (52, 151). Effectivement, FeoB renferme des motifs de liaison du GTP dans son domaine cytoplasmique. FeoB possède donc une activité GTPase et cette activité est requise pour le transport du  $Fe^{2+}$  (216). FeoA est une petite protéine située dans le cytoplasme et la structure de FeoA est similaire au domaine SH3 de la protéine DtxR, un domaine impliqué dans les interactions protéine-protéine (52). Sa fonction précise reste à déterminer, mais il a été démontré que FeoA lie FeoB *in vivo* et que cette interaction est importante pour le transport du fer ferreux (192). FeoC est une petite protéine située dans le cytoplasme et sa fonction n'a été démontrée que très récemment chez *S. Typhimurium* (193). FeoC interagit directement avec le domaine cytoplasmique de FeoB, ce qui a pour effet de protéger cette dernière de la protéase FtsH (193). L'expression des gènes *feoABC* est régulée par les niveaux de fer et d'oxygène. La région du promoteur contient des séquences de liaison pour les régulateurs Fur et Fnr, régulant respectivement les gènes d'acquisition du fer et de la respiration anaérobie (52, 184). Le système Feo est donc exprimé et produit lorsque le niveau de fer est faible où la transcription des gènes n'est plus réprimée par Fur, et en conditions d'anaérobie où la transcription des gènes est induite par Fnr. Ce système est également régulé lorsque la bactérie se trouve dans des conditions acides. Effectivement, en conditions de pH acides, le système à deux composantes PhoP/PhoQ est activé et stimule la production de RtsA. Le promoteur de *feoABC* contient une séquence de liaison pour ce régulateur qui active la transcription des gènes *feoABC* (63).

Le système de transport Sit a été identifié chez *Salmonella* et il est présent chez la majorité des sérovars de *S. enterica*, chez les espèces de *Shigella* et chez certaines souches de

*E. coli* pathogènes (271, 299, 392). Chez *Salmonella*, les gènes *sitABCD* sont retrouvés sous la forme d'un opéron dans le SPI-1 (392). Ces quatre gènes codent pour des protéines ayant les caractéristiques d'un système de transport de type ABC (392). SitA est une protéine périplasmique de type PBP, SitB est une protéine liant l'ATP qui agit en tant qu'ATPase, et SitC et SitD sont deux protéines situées dans la membrane cytoplasmique qui forment la perméase du système ABC (271, 392). Le système Sit peut transporter le fer ferreux, et il a été démontré qu'il peut également transporter le manganèse (189). Puisque la concentration en fer requise pour être transportée par le système Sit est plus élevée que le niveau physiologique de fer libre ( $\text{Fe}^{2+}$ ), il a été suggéré que Sit transporte le manganèse plutôt que le fer dans les systèmes biologiques (189). L'expression des gènes *sitABCD* est régulée par les niveaux de fer et de manganèse. La région du promoteur contient des séquences de liaison pour les régulateurs Fur et MntR, régulant respectivement les gènes d'acquisition du fer et du manganèse (174, 180, 392). La transcription des gènes *sitABCD* est donc réprimée par Fur en présence de fer et réprimée par MntR en présence de manganèse.

Les transporteurs de type Nramp (*natural resistance-associated macrophage protein*) sont retrouvés chez les cellules eucaryotes et agissent comme des transporteurs membranaires de métaux divalents comme le  $\text{Mn}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$  (114). Le transporteur MntH est un homologue bactérien de la protéine eucaryote Nramp1. Contrairement aux systèmes Feo et Sit qui nécessitent de l'énergie via le GTP ou l'ATP, le transport des ions divalents par MntH (*H<sup>+</sup>-coupled manganese transport*) est stimulé par les protons (190, 214). Contrairement au système Sit qui transporte le  $\text{Mn}^{2+}$  en condition légèrement alcaline, le transport par MntH est plus efficace en milieu acide comme le système Feo (188). Malgré ces différences, le système MntH partage plusieurs caractéristiques du système Sit. Effectivement, MntH peut transporter le  $\text{Fe}^{2+}$ , mais il transporte préférentiellement le  $\text{Mn}^{2+}$  (190, 214). Le promoteur du gène *mntH* possède également des séquences de liaisons pour les régulateurs Fur et MntR, signifiant que ce transporteur est actif lorsqu'il y a peu de fer et de manganèse, où les régulateurs sont inactifs (174, 188, 190, 270). Le gène *mntH* est également régulé positivement par le peroxyde d'hydrogène, et un mutant *mntH* est plus sensible au  $\text{H}_2\text{O}_2$  (188, 190). Un site de liaison pour le régulateur OxyR se trouve d'ailleurs dans le promoteur de *mntH* (188, 190). Donc, quand la bactérie se trouve en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , OxyR induit l'expression de ce transporteur.

## **Rôle des systèmes d'acquisition du Fe<sup>2+</sup> dans la virulence**

Chez l'hôte, *Salmonella* se procure du fer par tous les moyens en sa possession. Lorsqu'elle est dans des milieux acides et anaérobiques, elle peut acquérir le fer ferreux Fe<sup>2+</sup> directement par ses systèmes Feo, Sit et MntH. Ces systèmes, bien que redondants, jouent tous un rôle dans la virulence de cette bactérie, mais encore une fois leur importance est quelque peu divergente selon les études. Selon une étude, le mutant *feoB* de *S. Typhimurium* est atténué dans une infection de l'intestin de souris en présence de la souche sauvage, mais le mutant seul n'est pas atténué dans l'infection de ces souris par voie orale ou intrapéritonéale (350). Par contre, lorsqu'inoculé par voie intraveineuse, ce mutant est atténué chez les souris, démontrant que le système de transport Feo est important dans la virulence (40). Le système de transport du Fe<sup>2+</sup> et Mn<sup>2+</sup> SitABCD est requis pour la virulence de *Salmonella*. Effectivement, hormis la première étude caractérisant ce système de transport qui démontrait que Sit n'est pas impliqué dans la virulence (392), trois études subséquentes ont montré que des mutants *sit* sont atténués lors d'infection de macrophages *in vitro* et de souris (40, 180, 385). Pour le système de transport de métaux divalents MntH, c'est sensiblement la même histoire. La première étude caractérisant ce système de transport montrait que le mutant *mntH* était aussi virulent que la souche sauvage (190), mais trois autres études ont prouvé que le transporteur MntH est important pour la virulence de *S. Typhimurium* lors d'infections de souris (40, 186, 385). Puisque tous ces systèmes sont impliqués dans la virulence de *Salmonella* individuellement, ce n'est donc pas surprenant qu'un triple mutant *feoB/mntH/sitABCD* soit avirulent lors d'une infection de souris (40).

### **1.2.3. Détoxification et stockage du fer**

#### **1.2.3.1. Stress oxydatif**

Le fer est un métal essentiel pour le métabolisme et la croissance des microorganismes, mais il peut être toxique lorsqu'il est en présence d'oxygène en participant à la formation de ROS (*reactive oxygen species*) qui sont nuisibles pour la cellule. Lorsque le fer se retrouve dans la bactérie, il est réduit en Fe<sup>2+</sup> par des réductases, et en présence d'oxygène, le fer ferreux catalyse différentes réactions menant à la production de radicaux oxygénés. Le Fe<sup>2+</sup>

peut être oxydé par l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ), ce qui réduit cet oxygène en anion superoxide ( $O_2^-$ ). Les ROS sont produits lors de la respiration aérobie, et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) peut être formé par différentes réactions, entre autre par la dismutation du superoxide (103). Le superoxide et le peroxyde d'hydrogène sont des ROS qui sont modérément réactifs physiologiquement, mais qui peuvent toutefois être toxiques pour différents constituants de la cellule, comme l'ADN et les protéines (13). Néanmoins, le fer interagit avec ces ROS dans des réactions qui génèrent les radicaux hydroxyles, le ROS le plus dangereux. L'interaction du  $Fe^{2+}$  avec le  $H_2O_2$  entraîne la réaction de Fenton :  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO\bullet$ . Le fer peut également catalyser la réaction Haber-Weiss :  $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + HO\bullet$ . Ces réactions produisent le radical hydroxyle ( $HO\bullet$ ) qui est le ROS le plus réactif et le plus toxique pour la cellule. Les radicaux hydroxyles peuvent causer des dommages aux différents composants cellulaires tels que l'ADN, les membranes lipidiques et les protéines (103).

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour se protéger contre le stress oxydatif. Un de ces mécanismes est l'utilisation d'enzymes impliqués dans la détoxification de certains ROS. Certaines bactéries possèdent l'enzyme superoxide dismutase (SOD), qui transforme le superoxide ( $O_2^-$ ) en oxygène moléculaire ( $O_2$ ) et en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). *Salmonella* possède quatre enzymes SOD. Le premier enzyme, codé par *sodA*, contient du manganèse comme cofacteur (MnSOD) et le deuxième, codé par *sodB*, contient du fer comme cofacteur (FeSOD). Contrairement à ces deux enzymes SOD qui sont cytoplasmiques, *Salmonella* contient également deux autres SOD situés dans le périplasme (102). Ces enzymes, codés par *sodCI* et *sodCII*, contiennent deux cofacteurs, le cuivre et le zinc (Cu,Zn-SOD). Les bactéries possèdent également l'enzyme catalase qui transforme le peroxyde d'hydrogène ( $2 H_2O_2$ ) en oxygène ( $O_2$ ) et en eau ( $2 H_2O$ ). Les catalases sont des hydroperoxydases et *Salmonella* en possède trois, KatG (HPI), KatE (HPII) et KatN (158, 297). En plus des catalases, il existe une seconde classe d'enzyme capable d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, les peroxyrédoxines qui transforment le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $2 H_2O$ ) (168). *Salmonella* en possède également trois, AhpC, TsaA et Tpx (168).

*Salmonella* possède également un transporteur de la famille MFS nommé IceT (*iron citrate efflux transporter*) qui exporte le fer via le citrate en situation de stress (121). Ce transporteur est codé par le gène anciennement appelé *mdtD* et est induit par l'oxyde nitrique

(NO) ainsi que par une perturbation de l'homéostasie du fer. Son expression cause une diminution du niveau de fer intracellulaire et un arrêt de la croissance, et confère une résistance au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, au NO et à divers antibiotiques. IceT joue donc un rôle dans la résistance au stress oxydatif de cette bactérie.

### 1.2.3.2. Stockage

En plus de se protéger contre le stress oxydatif en utilisant les enzymes décrites plus haut, les bactéries évitent d'avoir un contenu en fer libre intracellulaire trop élevé afin de prévenir la formation de ROS. Le fer intracellulaire est stocké par des protéines appelées ferritines. Il existe trois types de ferritines, la ferritine classique FtnA, la bactérioferritine Bfr et la ferritine Dps. Ces protéines sont essentielles pour l'homéostasie du fer intracellulaire et sont retrouvées dans les trois domaines de la vie. Le stockage du fer par ces protéines a deux principales conséquences pour la cellule. Premièrement, la diminution du fer libre réduit la formation de ROS et diminue le stress oxydatif, ce qui protège la cellule des dommages liés à l'oxygène. Deuxièmement, le stockage du fer par les ferritines constitue une bonne réserve lorsque la disponibilité du fer extracellulaire devient limitée.

La ferritine classique, FtnA, est retrouvée chez les bactéries et les eucaryotes. Elle est composée de 24 sous-unités identiques assemblées de façon à former une protéine sphérique qui entoure une cavité centrale agissant en tant que réservoir de fer (13). Cette protéine peut lier environ 2500 atomes de fer (13, 320). Chez tous les types de ferritines, le fer n'est pas stocké sous sa forme ferreuse, mais sous sa forme ferrique. Effectivement, le Fe<sup>2+</sup> entre en contact avec la ferritine, est oxydé en Fe<sup>3+</sup> et est ensuite stocké dans la cavité centrale de la protéine (60). Lorsque les bactéries ont besoin de cette réserve en fer, le Fe<sup>3+</sup> est réduit en Fe<sup>2+</sup> afin d'être utilisé par le métabolisme. Dans le cas des ferritines et des bactérioferritines, l'oxydation du fer se fait à un site précis appelé centre ferroxidase, qui se trouve sur chacune des sous-unités (60). Le fer ferreux se lie sur ces sites où il est oxydé par l'oxygène (O<sub>2</sub>) avant d'être dirigé vers le centre de la protéine.

La bactérioferritine, Bfr, est retrouvée seulement chez les bactéries. Comme la ferritine classique, elle est composée de 24 sous-unités identiques et elle peut lier environ 2000 atomes

de fer (13, 320). Elle possède également le centre ferroxidase où a lieu l'oxydation du fer par l'oxygène. Contrairement à la ferritine classique, la bactérioferritine contient des molécules d'hème, mais leur rôle est inconnu. L'hème ne semble pas impliqué dans l'acquisition du fer, mais aurait un rôle dans la réduction et la relâche du fer de la cavité centrale (12, 13).

Finalement, la ferritine Dps (*DNA-binding protein from starved cells*) fait partie d'une famille de protéines exprimées chez des bactéries en état de famine et de stress oxydatif et qui s'associent de façon non-spécifique à l'ADN (8, 60, 388). L'expression de *dps* est activée par les facteurs de transcription RpoS et OxyR, et est inhibée par les protéines Fis et H-NS (388). Dps est composée de 12 sous-unités identiques et elle peut lier environ 500 atomes de fer, mais elle ne possède pas le centre ferroxidase des deux autres ferritines (13). La liaison et l'oxydation du  $Fe^{2+}$  s'effectue entre les différentes sous-unités sur un site ferroxidase putatif (320, 390). L'oxydation est effectuée par le  $H_2O_2$  au lieu de l' $O_2$  (320, 390), ce qui permet de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et contribue à diminuer la production de radicaux hydroxyles. De plus, Dps protège l'ADN contre les dommages causés par les ROS. Effectivement, la liaison de Dps avec l'ADN la protège contre l'action du  $H_2O_2$  (390). Donc, par son interaction physique à l'ADN et la détoxification de l' $H_2O_2$  par l'oxydation du fer, Dps contribue à la protection des bactéries envers les effets nocifs du peroxyde d'hydrogène (320).

*Salmonella* possède quatre ferritines, soit les ferritines FtnA et FtnB, la bactérioferritine Bfr et la protéine Dps (358). Ces ferritines sont régulées par le fer et par Fur. Chez *S. Typhimurium*, FtnA et Bfr sont exprimés en conditions riches en fer et lorsque Fur est présent, tandis que FtnB est exprimé en conditions pauvres en fer et chez un mutant *fur* (358). La régulation de Dps reste ambiguë, car une étude montre que l'expression de *dps* est inhibée par le fer et par Fur, tandis qu'une autre étude démontre le contraire (358, 384). Contrairement à *E. coli* où FtnA est la principale ferritine stockant le fer, Bfr est la ferritine de *S. Typhimurium* qui stocke la majeure partie du fer (358). Les quatre ferritines sont également importantes pour protéger la cellule contre le stress oxydatif, puisque chaque mutant individuel est plus sensible à l'exposition au  $H_2O_2$  que la souche sauvage (358). FtnB est une ferritine atypique qui ne possède pas le centre ferroxidase des ferritines classiques. De plus, FtnB est impliqué dans la réparation des groupements fer-soufre. Les enzymes aconitases contiennent des groupements

fer-soufre [4Fe-4S] qui peuvent être endommagés par le stress oxydatif, où l'oxydation d'une molécule de fer par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibe l'activité des aconitases (358). Il a été démontré que FtnB est requis pour la réparation des groupements fer-soufre des aconitases chez *S. Typhimurium* (358).

### **Rôle des systèmes de stockage du fer dans la virulence**

*Salmonella* possède quatre ferritines (FtnA, FtnB, Bfr et Dps) qui sont impliquées dans le stockage du fer. Ces protéines protègent directement et indirectement la cellule du stress oxydatif en diminuant le niveau de fer libre intracellulaire qui promeut la formation de ROS. En particulier, Dps protège l'ADN contre les dommages causés par les ROS (390). Il a été démontré que plusieurs mutants de *Salmonella* sensibles au stress oxydatif ont un défaut de survie dans les macrophages (145). En effet, un mutant *dps* de *S. Typhimurium* présente un défaut de survie dans les macrophages et est atténué lors d'une infection de souris (145). Une autre étude a confirmé l'importance de Dps dans l'infection *in vivo*, démontrant que cette ferritine est importante pour la virulence et la colonisation systémique de *Salmonella* (358). Cette même étude a démontré que la ferritine FtnB possède elle aussi un rôle dans la pathogenèse, puisqu'un mutant *ftnB*, mais pas les mutants *ftnA* et *bfr*, est atténué lors d'infection de souris (358). Les ferritines Dps et FtnB sont donc requises dans l'infection de *Salmonella*, mais FtnA et Bfr sont dispensables.

#### **1.2.4. L'homéostasie du fer dans les relations hôte-pathogènes**

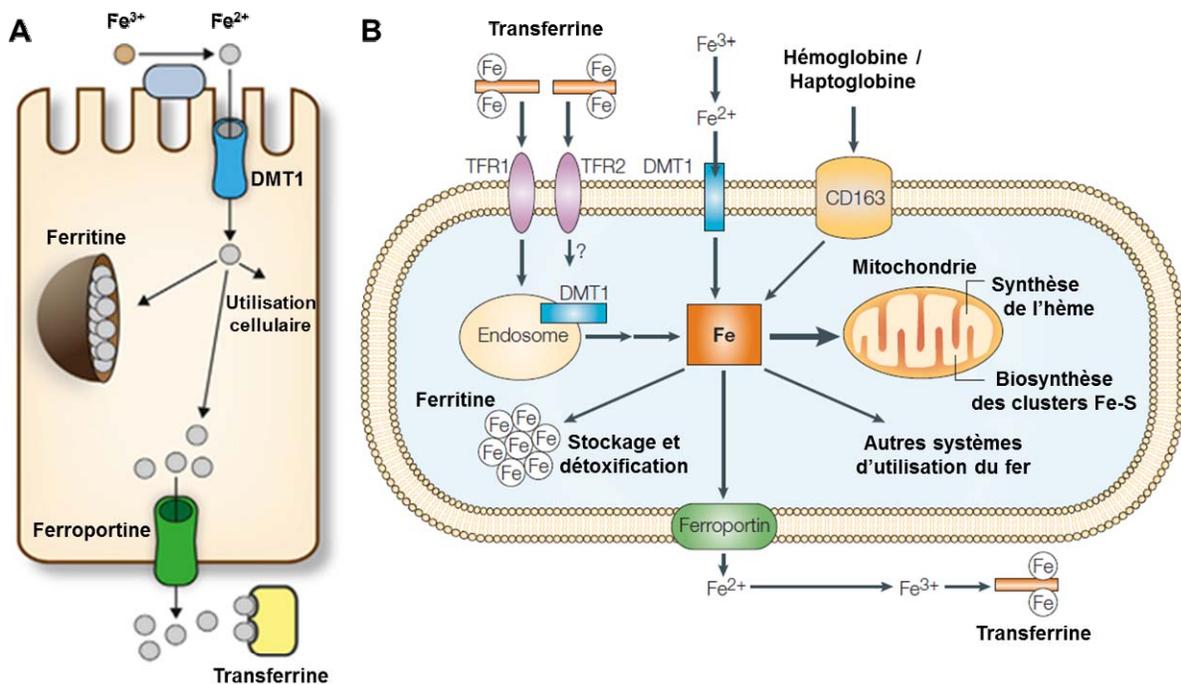
Le fer est un nutriment essentiel pour tous les organismes, incluant les mammifères et les bactéries pathogènes. Lorsqu'une bactérie pathogène infecte son hôte, il y a une compétition pour l'obtention de ce nutriment et chacun des protagonistes, l'hôte et la bactérie, utilisent différents mécanismes afin de prendre possession du fer. En absence d'infection, l'hôte possède plusieurs systèmes de transport et d'acquisition du fer qui lui permettent d'avoir accès et d'utiliser le fer pour son métabolisme. Suite à une infection par une bactérie pathogène, l'hôte déploie différentes stratégies afin de limiter le plus possible l'accès du fer aux bactéries, pour lesquelles l'utilisation de ce métal est nécessaire à leur multiplication et leur virulence. Les stratégies permettant de diminuer la disponibilité du fer, ou de tout autre nutriment, lors

d'infection constituent l'immunité nutritionnelle. Ces stratégies peuvent être générales lors de la majorité des infections ou spécialisées aux infections bactériennes intracellulaires. Dans ce cas, les cellules infectées par les bactéries utilisent des mécanismes spécifiques pour limiter leur accès au fer. À leur tour, les bactéries pathogènes ont développé différents mécanismes pour déjouer ou modifier les stratégies de l'hôte.

#### **1.2.4.1. Homéostasie du fer chez l'hôte**

Les propriétés du fer d'être peu soluble et toxique en présence d'oxygène sont vraies également à l'intérieur de l'hôte. Pour cette raison, le fer se trouve généralement complexé à différentes protéines, comme la transferrine, la lactoferrine, la ferritine et les protéines possédant des molécules d'hèmes (hémoglobine, haptoglobine et hémopexine) (53, 308). L'absorption du fer se fait dans les intestins au niveau des cellules entérocytes (Fig. 17). Le fer ferrique est réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  par des réductases et le fer ferreux est transporté dans les entérocytes par le transporteur DMT1 (*divalent metal transporter 1*), également appelé Nramp2 ou Slc11a2 (53, 114, 308). DMT1 transporte les métaux divalents selon le gradient de proton au niveau des membranes des entérocytes et des endosomes (114). L'exportation du fer hors des entérocytes se fait via la perméase ferroportine située au niveau de la membrane basolatérale (53, 308). Le fer ferreux est ensuite oxydé en fer ferrique et celui-ci se lie aux transferrines qui le transportent dans l'organisme (53, 308). Les complexes ferri-transferrines sont reconnus par les récepteurs de transferrine TFR sur les différentes cellules, et suite à leur entrée par endocytose, le fer est libéré, réduit et transporté dans le cytoplasme. Dans l'organisme, le fer est principalement retrouvé dans les molécules d'hémoglobines présentes dans les érythrocytes. Lorsque ces cellules entrent en sénescence, elles sont phagocytées par les macrophages qui récupèrent le fer des molécules d'hème (53, 244). L'hôte possède d'autres protéines pouvant lier l'hème et l'hémoglobine lorsqu'il y a hémolyse. L'hème peut être capturé par la protéine hémopexine et une protéine porteuse d'hème, Hcp1, et l'hémoglobine peut être capturée par l'haptoglobine (244). Les macrophages possèdent des récepteurs qui permettent l'entrée de l'hème et de l'hémoglobine par endocytose. Les macrophages peuvent également acquérir le fer via le transporteur DMT1. Le fer intracellulaire peut alors être utilisé dans la synthèse de l'hème, il peut être incorporé dans les

différents enzymes ou il peut être stocké par les ferritines (53). Dernièrement, un sidérophore a été découvert chez les mammifères (22, 88). Un gène homologue à *entA* a été identifié chez la souris et ce gène code pour un sidérophore catéchol de type 2,5-dihydroxybenzoate (2,5-DHB), un analogue du 2,3-dihydroxybenzoate (2,3-DHS) retrouvé dans l'entérobactine bactérienne (88). Il a été démontré que cette molécule lie le lipocalin 2, une molécule de l'hôte pouvant également lier l'entérobactine (22, 88). La présence de ce sidérophore semble être requise pour la synthèse d'hème (88). Les humains semblent donc utiliser des mécanismes impliqués dans l'homéostasie du fer qui sont analogues à ceux des bactéries.



**Figure 17. Homéostasie du fer chez l'hôte.** A) Le fer de l'intestin est absorbé par les entérocytes via le transporteur DMT1 et est exporté par la perméase ferroportine où le fer ferrique se lie à la transferrine présente dans le plasma qui le transporte dans l'organisme. B) Les cellules de l'hôte comme les macrophages acquièrent le fer en reconnaissant les complexes ferri-transferrine, l'hémoglobine ou les protéines associées à l'hème, et le fer ferreux. À l'intérieur des cellules, le fer peut être utilisé par différents systèmes d'utilisation du fer, peut être stocké dans les ferritines ou peut être exporté via la ferroportine. Figure adaptée de (53, 308).

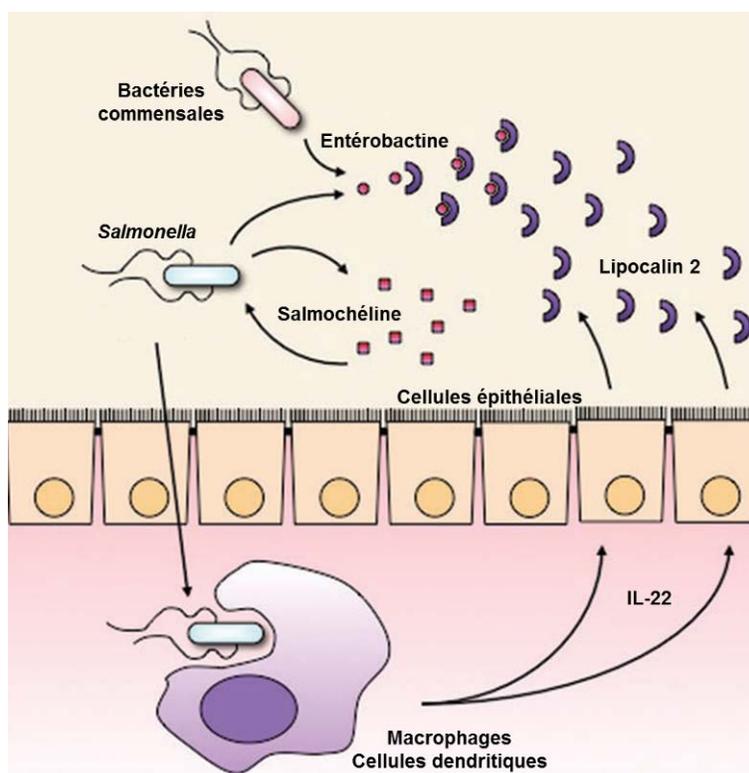
#### 1.2.4.2. Réponse de l'hôte lors d'infection par des bactéries pathogènes

##### Infections extracellulaires

L'infection par un pathogène déclenche une réponse immunitaire de l'hôte dans le but de se débarrasser du microbe inopportun. Une des stratégies adoptées est de limiter l'accès du fer aux bactéries pathogènes. Bien que la majorité de ces mécanismes existent dans ce but précis, des réactions de défense globales de l'hôte peuvent également nuire à l'acquisition du fer des bactéries. Effectivement, lorsqu'un individu fait de la fièvre, la température élevée inhibe la synthèse des sidérophores chez les bactéries pathogènes (378). Lors d'une infection, une diminution du fer dans le sérum est observée. Cette baisse, appelée hypoferrémie, est causée principalement par la diminution de l'absorption du fer dans les entérocytes via une inhibition des transporteurs DMT1 et ferroportines, et une diminution de la relâche de fer par les macrophages également via l'inhibition de la ferroportine (53). L'inhibition de la ferroportine est causée par le peptide antimicrobien hepcidine, produit par le foie et les macrophages en situations d'inflammation (129). L'hepcidine provoque l'internalisation et la destruction de l'exportateur ferroportine des entérocytes et des macrophages, ce qui a pour effet de diminuer le fer dans le sérum et d'augmenter le stockage du fer dans les cellules (129). D'ailleurs, un taux trop élevé d'hepcidine peut mener à une anémie (370). Le rôle des protéines liant le fer est également important afin de diminuer la disponibilité du fer aux agents pathogènes. Le nombre de ferritines est augmenté lors d'une infection, ce qui augmente le stockage du fer, et la lactoferrine se retrouve généralement aux sites de l'infection (53, 287). Ces protéines sont toutefois une source de fer pour les bactéries possédant des sidérophores.

L'hôte a également développé une stratégie qui permet de séquestrer les sidérophores produits par les bactéries pathogènes (Fig. 18). Le lipocalin 2, également appelé NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), 23p3, utérocalin ou sidérocalin, est une protéine produite par les cellules épithéliales, les neutrophiles et les macrophages en réponse à une infection (244, 321). Comme mentionné auparavant, le lipocalin 2 peut lier le sidérophore des mammifères, et il est impliqué dans différents processus biologiques (70, 321). Cette protéine est capable de lier certains sidérophores bactériens de type catécholate, comme l'entérobactine et la carboxymycobactine (112, 133, 165). La liaison du lipocalin 2 avec ces sidérophores

cause leur séquestration, ce qui limite la croissance des bactéries qui les utilisent. Le lipocalin 2 est donc une arme efficace du système immunitaire. En effet, des souris ne possédant plus cette protéine (*Lcn2<sup>-/-</sup>*) sont beaucoup plus sensibles à l'infection de bactéries pathogènes (33, 113, 244). Pour contrecarrer ce mécanisme de défense, certaines bactéries produisent des sidérophores qui ne sont pas reconnus par le lipocalin 2. C'est le cas des bactéries qui sécrètent des sidérophores de type hydroxamate, comme plusieurs souches d'*E. coli* pathogènes, puisque le lipocalin 2 ne reconnaît que les catécholates (165). C'est également le cas des bactéries qui produisent le sidérophore salmochéline, dont *Salmonella* (Fig. 18). Ce sidérophore est une version modifiée de l'entérobactine qui est glucosylée par l'enzyme IroB (153). Il a été démontré que le lipocalin 2 ne peut pas lier la salmochéline, et qu'une souche d'*E. coli* non-pathogène exprimant la salmochéline devient virulente lors d'infections de souris (112). Le fait de posséder la salmochéline résistante au lipocalin 2 confère un avantage à *S. Typhimurium* lors de l'infection de souris et de macaques (284). Le fait de posséder un sidérophore modifié qui n'est pas reconnu par le lipocalin 2 permet donc à *Salmonella* d'évader ce système de défense de l'hôte et lui confère un avantage comparativement aux bactéries du microbiote ou aux bactéries pathogènes qui ne possèdent pas la salmochéline.



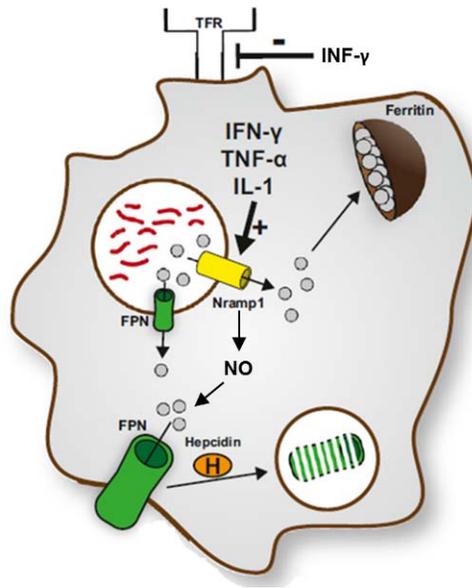
**Figure 18. La salmochéline procure un avantage à *Salmonella* contre le lipocalin 2.** Lors de l'infection, l'hôte produit le lipocalin 2 qui séquestre l'entérobactine produite par les bactéries commensales et pathogènes. *Salmonella* produit la salmochéline qui n'est pas reconnue par le lipocalin 2, ce qui lui confère un avantage en lui permettant d'obtenir le fer dans l'intestin. Figure adaptée de (282).

En plus de subir les effets de l'hôte qui limitent la disponibilité du fer, les bactéries pathogènes doivent parfois compétitionner contre d'autres bactéries (Fig. 18). Les entérobactéries telles que *Salmonella* infectent leur hôte dans l'intestin. Elles se retrouvent donc en présence de plusieurs espèces du microbiote et il peut arriver que différentes espèces pathogènes soient présentes en même temps. Toutes ces bactéries doivent obtenir le fer essentiel à leur multiplication et leur virulence, et certaines bactéries sont mieux équipées pour acquérir ce nutriment. Le nombre et la variété de systèmes d'acquisition du fer sont cruciaux pour gagner la compétition pour l'obtention du fer. Il a été démontré récemment qu'une bactérie probiotique cause une réduction de la colonisation intestinale de *S. Typhimurium* en compétitionnant pour le fer (85). En effet, la bactérie probiotique *E. coli* Nissle 1917 possède

plusieurs systèmes d'acquisition du fer, dont certains sidérophores hydroxamates qui ne sont pas séquestrés par le lipocalin 2. Donc, l'acquisition du fer par cette bactérie limite la disponibilité de ce nutriment, ce qui diminue la colonisation de *S. Typhimurium* et entraîne la résolution de l'infection.

### **Infections intracellulaires**

Lors d'une infection par une bactérie pathogène intracellulaire, l'hôte développe des réponses spécifiques pour les cellules infectées. C'est le cas des macrophages qui se retrouvent infectés par différentes bactéries, dont *Salmonella*. Ces réponses peuvent être contradictoires avec celles contre les bactéries extracellulaires. Les macrophages restreignent l'accessibilité du fer aux bactéries intracellulaires en limitant le niveau de fer intracellulaire et en favorisant son exportation à l'extérieur de la cellule. Les macrophages développent plusieurs mécanismes de défense visant à restreindre l'accessibilité du fer lors de l'infection par *Salmonella* (Fig. 19). Lors d'une telle infection, l'acquisition du fer est diminuée par la baisse du niveau du récepteur de la transferrine et l'exportation du fer est augmentée par la hausse du niveau de la ferroportine. Ces changements sont stimulés par l'IFN- $\gamma$  (241, 245). Un autre mécanisme utilisé par les macrophages est la synthèse d'oxyde nitrique (NO), qui est un radical toxique pour les bactéries. Il a été démontré que le NO augmente l'expression de la ferroportine, causant une diminution de l'acquisition du fer chez *S. Typhimurium* (243). Une augmentation de ferroportine cause d'ailleurs une inhibition de la croissance intracellulaire de *S. Typhimurium* (62). De plus, les macrophages infectés par cette bactérie produisent plus de lipocalin 2 qui séquestre l'entérobactine et exporte ainsi le fer hors de la cellule (241, 245). Ce mécanisme de défense cause une inhibition de la croissance de *S. Typhimurium* dans les macrophages, et il a été démontré que le transporteur Nramp1 est en partie responsable de la surproduction de lipocalin 2 (122). Malgré toutes ces réponses qui ont pour effet de diminuer le niveau global de fer intracellulaire, l'infection par *Salmonella* engendre l'augmentation de l'expression du récepteur DMT1 et par le fait même l'augmentation de l'acquisition du fer par cette voie indépendante de la transferrine (65, 241).



**Figure 19. Réponses antimicrobiennes par les macrophages pour diminuer l'accès au fer lors d'infection par *Salmonella*.** Lorsque *Salmonella* infecte les macrophages, ces cellules développent plusieurs mécanismes de défense visant à restreindre l'accessibilité du fer. L'IFN- $\gamma$  diminue le niveau du récepteur de la transferrine (TFR) et augmente le niveau de la ferroportine (FPN) et l'activité de la protéine Nramp1. Cette pompe exporte le fer hors de la SCV (*Salmonella containing vacuole*) et stimule la formation de NO, du lipocalin 2 et de cytokines pro-inflammatoires. Figure adaptée de (53).

Nramp1, aussi nommé Slc11a1 (*solute carrier family 11 member a1*), est un transporteur transmembranaire retrouvé dans les macrophages et les neutrophiles et il est recruté dans les membranes des phagosomes et des endosomes tardifs lors d'infections (Fig. 19) (114). Ce transporteur a un rôle central dans la susceptibilité de l'hôte lors d'infections par des pathogènes intracellulaires comme *Salmonella*, *Mycobacterium* et *Leishmania* (319). Il agit en tant que pompe à proton et à métaux divalents, particulièrement le  $\text{Fe}^{2+}$  et le  $\text{Mn}^{2+}$ . Il a été démontré qu'il peut agir en important le fer dans le phagosome et ainsi causer une augmentation de la production de radicaux hydroxyles (114, 203). Toutefois, cette fonction est controversée et le rôle de Nramp1 est plutôt d'exporter le fer hors des phagosomes dans le but de limiter l'accessibilité de ce nutriment aux pathogènes contenus dans ces compartiments (114). Lorsque *S. Typhimurium* se retrouve dans les phagosomes des macrophages, Nramp1 stimule la formation de NO, du lipocalin 2 et de cytokines pro-inflammatoires comme

l'interleukine (IL)-6, l'IL-12 et TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor-alpha*) (122, 242, 244). La restriction du fer et la production d'effecteurs pro-inflammatoires par Nramp1 limitent la croissance intracellulaire de *S. Typhimurium* (122, 242). De plus, Nramp1 est impliqué dans la maturation de la SCV (*Salmonella containing vacuole*) (76, 178). Dans les macrophages, *Salmonella* modifie la maturation du phagosome dans lequel elle se trouve et cela lui permet de résister aux effets antimicrobiens des macrophages, entre autre par l'inhibition de la fusion avec les lysosomes (286). L'expression de Nramp1 diminue l'habilité de *Salmonella* à modifier la maturation de sa vacuole, un effet lié à la limitation en fer des phagosomes exprimant Nramp1, et cela accentue la susceptibilité de cette bactérie aux effets antibactériens des lysosomes (76, 178). En revanche, les gènes du SPI-2 essentiels à la survie intracellulaire de *S. Typhimurium* sont induits par des conditions de carence en fer (386). Donc, lorsque *Salmonella* infecte des macrophages exprimant Nramp1 qui agit en diminuant le niveau de fer dans les phagosomes, les gènes du SPI-2 sont induits et cela permet à la bactérie de survivre et de se multiplier (386).

### **1.2.5. Régulation de l'homéostasie du fer**

Les bactéries se retrouvent dans une multitude d'environnements et, selon les conditions dans lesquelles elles se trouvent, les bactéries doivent transcrire les gènes appropriés pour leurs différentes fonctions. Les bactéries ont recours à différents systèmes qui leur permettent d'acquérir les nutriments nécessaires pour leur métabolisme lorsqu'ils sont peu disponibles, et lorsque le niveau de ces nutriments augmente, les bactéries n'ont plus besoins de ces systèmes d'acquisition. Elles doivent donc réguler l'expression des gènes et des protéines associés à ces systèmes afin qu'ils soient exprimés seulement dans les moments propices. Pour l'acquisition et le métabolisme du fer, les bactéries affrontent une difficulté supplémentaire car lorsque le fer se retrouve en quantité suffisante, il devient toxique. Les bactéries ont donc développé des systèmes de régulation pour garder des niveaux de fer appropriés, c'est-à-dire assez élevés pour subvenir aux fonctions essentielles et assez faibles afin ne pas être dommageable pour les composantes cellulaires. Plusieurs mécanismes régulant l'acquisition et le métabolisme du fer existent et le plus important est la protéine régulatrice Fur. Ce régulateur global réprime la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer et dans

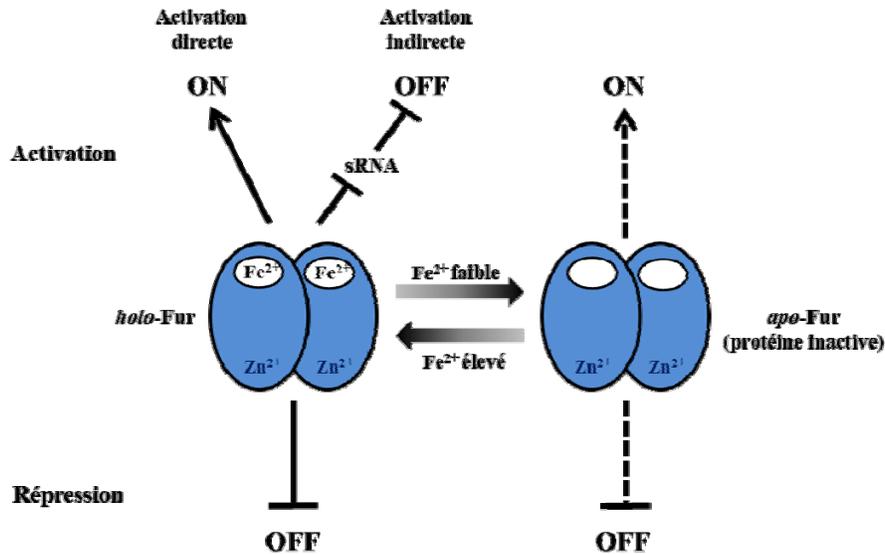
différents processus cellulaires, et certaines cibles sont régulées positivement (150). Il a été démontré qu'une majorité de ces gènes sont régulés de façon post-transcriptionnelle par le petit ARN non codant RyhB chez *E. coli* (220). *Salmonella* possède le régulateur Fur et deux ARN homologues à RyhB, RfrA et RfrB. Bien que Fur et RyhB soient les principaux acteurs régulant l'homéostasie du fer chez les entérobactéries, il existe d'autres systèmes de régulation qui participent directement ou indirectement à la régulation du fer, et leur présence varie selon les différentes bactéries.

### **1.2.5.1. La protéine Fur**

Lors d'une étude cherchant des mutants de *S. Typhimurium* exprimant constitutivement les différents systèmes d'acquisition du fer, un mutant a été identifié et le gène associé à cette mutation a été nommé *fur* pour *ferric uptake regulator* (97). Une étude subséquente a permis d'identifier le même gène chez *E. coli*, où le mutant *fur* exprimait aussi de manière constitutive les gènes généralement inhibés par un niveau suffisant de fer (147). Depuis cette découverte, plusieurs études ont été effectuées sur ce régulateur et ont permis d'élucider ses multiples facettes. Le gène *fur* code pour une protéine qui régule l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer, mais également plusieurs gènes impliqués dans différentes fonctions physiologiques. Le régulateur Fur est retrouvé chez un grand nombre de bactéries, incluant la majorité des bactéries à Gram négatif dont plusieurs sont pathogènes chez l'humain, plusieurs bactéries à Gram positif et même chez les cyanobactéries et des bactéries pathogènes chez les plantes (99). Cette protéine fait partie de la famille de régulateur de type Fur qui renferme environ 800 homologues chez les bactéries (207). Ce type de régulateur affecte l'expression des gènes en réponse à différents signaux (métaux, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hème) et inclus les protéines Fur (fer), Zur (zinc), Mur (manganèse), Nur (nickel), PerR (peroxyde d'hydrogène) et Irr (hème) (150, 207). Ces régulateurs agissent principalement en réprimant la transcription de leurs gènes cibles, mais dans de rares cas ils peuvent aussi activer la transcription (150, 207).

### **Propriétés et mécanismes d'action de Fur**

Le gène *fur* code pour une protéine de 17 kDa qui possède deux domaines. Le domaine C-terminal est important pour la dimérisation de la protéine et contient deux sites pouvant lier des métaux, tandis que le domaine N-terminal permet à Fur de lier l'ADN au niveau des promoteurs de ses différentes cibles (71, 150, 329). En effet, Fur est un homodimère qui peut lier des métaux divalents. Un des sites pouvant lier les métaux dans la protéine Fur de *E. coli* est occupé par un atome de  $Zn^{2+}$  et cette liaison joue un rôle structural plutôt que régulateur (9). La liaison du zinc à la protéine Fur est importante pour son affinité de liaison à l'ADN, mais elle n'est pas retrouvée chez toutes les bactéries (9, 13, 209). L'autre site est important pour l'état actif de la protéine et peut lier le  $Fe^{2+}$  qui agit comme cofacteur de ce régulateur (20). Il a été démontré que ce site peut lier d'autres métaux divalents comme le  $Mn^{2+}$  et le  $Co^{2+}$  mais seul le  $Fe^{2+}$  s'associe à Fur avec assez d'affinité pour activer ce régulateur dans les conditions physiologiques du cytoplasme (20, 231). Le  $Mn^{2+}$  est beaucoup plus soluble et stable que le  $Fe^{2+}$  en solution aérobie, c'est pourquoi beaucoup d'études *in vitro* ont utilisé le  $Mn^{2+}$  en tant que corépresseur (207). La liaison entre Fur et son cofacteur métallique accentue l'affinité de la protéine pour son site de liaison à l'ADN d'environ 1000 fois (13, 73). La protéine Fur est particulièrement abondante avec 5 000 à 10 000 molécules par cellule de *E. coli*, soit beaucoup plus élevé que plusieurs régulateurs connus (391).



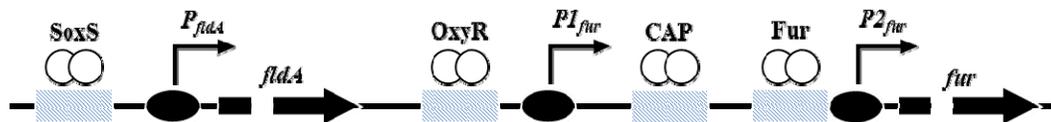
**Figure 20. Fonctions régulatrices de la protéine Fur.** Fur forme un dimère qui possède deux sites pouvant lier les métaux, un site structural liant le  $Zn^{2+}$  et un site régulateur liant le  $Fe^{2+}$ . En présence de fer ferreux, Fur est activé et agit principalement en inhibant la transcription des gènes cibles, mais peut aussi activer différents gènes directement ou indirectement via des petits ARN (*sRNA*). Lorsque la concentration en fer ferreux diminue, Fur devient inactif. Dans de rares occasions chez certaines bactéries, Fur peut réguler l'expression de gènes sous sa forme *apo*. Figure adaptée de (207).

Lorsque la concentration intracellulaire en fer ferreux est élevée, un atome de  $Fe^{2+}$  se lie sur chaque monomère de Fur, ce qui active cette protéine et cause un changement de conformation qui augmente son affinité de liaison à l'ADN (Fig. 20) (99). Le dimère Fur- $Fe^{2+}$  agit en tant que répresseur de la transcription, car ce complexe s'apparie à l'ADN dans la région du promoteur de différents gènes entre les sites -35 et -10. Cela bloque l'accès de l'ARN polymérase, inhibant ainsi la transcription des gènes en aval (69, 99, 207). Lorsque le fer devient rare, Fur se dissocie du  $Fe^{2+}$ , devient inactif et perd son affinité de liaison à l'ADN. Cela permet à l'ARN polymérase d'interagir avec les promoteurs. De cette façon, les gènes d'acquisition du fer sont exprimés (déréprimés) lorsque la concentration en fer est faible et que la bactérie nécessite leurs fonctions. Les sites de liaison à l'ADN de Fur correspondent à une séquence consensus appelée boîte Fur (*iron box* ou *Fur box*) et cette séquence forme un palindrome de 19 pb : 5'-GATAATGATAATCATTATC-3' (20, 99, 204). Cette séquence

peut également être vue comme une répétition de trois hexamères adjacents et imparfaits de 5'-GATAAT-3', ou de deux hexamères dans un sens, séparés d'une base et suivis d'un troisième hexamère de l'autre sens (98, 204). Dans certaines situations, la protéine Fur peut s'apparier à l'ADN même en absence d'un cofacteur métallique (207).

### Régulation du gène *fur*

L'expression du gène *fur* est régulée de différentes façons (Fig. 21). La séquence en amont de ce gène semble contenir deux régions promotrices. Un premier promoteur faible est situé près du gène et un deuxième promoteur plus fort est situé environ 100 pb en amont du premier promoteur (82). Le gène *fur* est faiblement autorégulé via une boîte Fur située dans la région du promoteur faible (81). De plus, l'expression de *fur* est sous le contrôle de la protéine activatrice des catabolites CAP (*catabolite-activator protein*) puisqu'un site de liaison pour cette protéine est retrouvé en amont du gène au niveau du promoteur faible (13, 81, 82). Des analyses *in silico* ont également prédit un site de liaison pour le régulateur MarA, une protéine impliquée dans la résistance aux antibiotiques (82).



**Figure 21. Région régulatrice du gène *fur*.** L'expression du gène *fur* est activée par SoxS qui se lie en amont du gène *fldA*, par OxyR qui se lie au niveau du promoteur fort ( $P1_{fur}$ ), par la protéine activatrice des métabolites (CAP) qui se lie au niveau du promoteur faible ( $P2_{fur}$ ) et est autorégulée négativement. Figure adaptée de (82).

Fur est aussi régulé par le stress oxydatif et la transcription du gène *fur* est induite par les régulateurs OxyR et SoxS (391). Un lien entre Fur et le stress oxydatif est logique, puisque la perte de la régulation de l'homéostasie du fer entraîne la production de ROS (343). OxyR est un régulateur qui est activé par le  $H_2O_2$  et qui agit comme activateur des gènes de réponse à ce stress oxydatif (18). Un site de liaison pour OxyR est présent au niveau du promoteur fort de *fur*, et Fur est donc induit par OxyR en présence de  $H_2O_2$  (391). En réponse à l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), la protéine SoxR est activée et induit la transcription de *soxS*. Des hauts taux

de SoxS activent les gènes importants pour la réponse adaptative au  $O_2^-$  (150). Chez *E. coli* et *Salmonella*, le gène *fur* se trouve directement en aval du gène *fldA*, codant pour une flavodoxine. SoxS s'apparie au niveau du promoteur de *fldA*, ce qui induit la transcription de ce gène et du gène *fur* (391). Fur est donc induit par le système SoxRS en présence de  $O_2^-$ .

### Régulon de Fur

Plusieurs études ont été effectuées dans le but d'identifier les gènes régulés par Fur, et ce chez de nombreuses bactéries. Quelques-unes de ces études ont permis de discerner les gènes régulés par ce régulateur chez *Salmonella* (28, 37, 119, 347, 349). Les caractéristiques de ce régulateur ont permis de développer différentes méthodes afin de déterminer le régulon de Fur. La première étude visant à déterminer les protéines régulées par Fur chez *Salmonella* consistait en une analyse protéomique à l'aide d'un gel d'électrophorèse acrylamide en deux dimensions des protéines différentiellement exprimées dans les conditions riche et pauvre en fer, ainsi que chez la souche sauvage et le mutant *fur* (119). Ensuite, trois études ont été faites chez *S. Typhimurium*, *S. Typhi* et *S. Choleraesuis* en utilisant la technique de titration du régulateur Fur appelée FURTA (*Fur titration assay*) (28, 349, 380). Cette technique consiste à intégrer un gène réprimé par Fur en amont du gène *lacZ* dans le génome d'une bactérie, et d'y introduire les gènes potentiellement régulés par Fur sur un plasmide multicopie (328). Si ces gènes contiennent une boîte Fur au niveau de leur promoteur, ils vont compétitionner pour l'appariement du régulateur avec la boîte Fur du gène intégré dans le chromosome. Cette compétition causera une titration de cette protéine et cela permettra l'expression du gène rapporteur qui sera mise en évidence par la couleur des colonies sur une gélose MacConkey. Une autre expérience transcriptomique à haut débit a été réalisée chez *S. Typhimurium* et consistait à identifier les gènes dont l'expression est affectée par le niveau de fer à l'aide d'une banque de promoteurs fusionnés aux gènes rapporteurs luminescents *lux* (37). L'analyse de ces différents gènes par la technique FURTA a permis d'identifier un grand nombre de gènes régulés par Fur et d'autres gènes régulés par le fer mais dont l'expression est indépendante de ce régulateur. Finalement, une étude transcriptomique par biopuces a permis de déterminer le régulon de Fur de *S. Typhimurium* en condition anaérobie par l'analyse de la souche sauvage et du mutant *fur* (347).

Ces différentes études ont permis d'identifier un grand nombre de gènes régulés par Fur chez *Salmonella*. Parmi ces gènes, plusieurs sont également régulés par ce régulateur chez d'autres espèces comme *E. coli*. Certaines cibles qui sont uniques aux salmonelles ou qui ne sont pas régulées chez d'autres espèces ont été identifiées. Ces expériences ont démontré que Fur régule l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer, comme la synthèse et le transport des sidérophores, le transport et le stockage du fer et plusieurs protéines contenant du fer (protéines redox, oxydoréductases et cytochromes) (262). Elles ont également démontré que Fur régule l'expression des gènes impliqués dans d'autres fonctions comme la motilité, le cycle de Krebs, la régulation, la respiration, la réponse au stress oxydatif et au stress acide ainsi que la virulence (262). Fur est donc un régulateur global de l'expression des gènes impliqués dans diverses fonctions. Les études ont également révélées que la majorité des gènes régulés par Fur sont réprimés, mais que certaines cibles sont positivement régulées (Fig. 20). Fur agit généralement lorsqu'il est complexé avec le  $Fe^{2+}$ , mais dans certaines situations et chez certaines bactéries, il peut être actif même en absence d'un cofacteur métallique (Fig. 20) (51, 207). Dans de rares cas seulement, Fur peut activer directement l'expression de gènes (51). Chez *E. coli*, le seul gène positivement régulé par Fur de façon directe est *ftnA* codant pour la principale ferritine de *E. coli* (246). Fur s'apparie à des séquences en amont du promoteur de *ftnA* et compétitionne avec la liaison de H-NS (*histone-like nucleoid-structuring protein*) qui agit en tant que répresseur de la transcription de *ftnA*. La liaison de Fur sur ces sites empêche donc la liaison de H-NS, permettant ainsi l'expression de *ftnA*. La régulation de *ftnA* par Fur de façon directe n'a pas encore été démontrée chez *Salmonella*. Chez *Salmonella*, Fur active directement la transcription du gène *hilD* (337). Fur s'apparie à une séquence riche en A-T appelée BoxA en amont du promoteur de *hilD* et cette liaison induit l'expression de ce gène (337). Le mécanisme par lequel certains gènes sont activés par Fur est longtemps demeuré incertain, jusqu'à la découverte du petit ARN régulateur non codant RyhB (220). Celui-ci est réprimé par Fur, et lorsque la concentration en fer diminue, RyhB est exprimé (220). Il a été démontré que l'activation de certains gènes par Fur est effectuée de façon indirecte, car ils sont inhibés par RyhB lorsque Fur est inactif (218, 220).

## Rôles de Fur

En tant que régulateur global, Fur possède différents rôles affectant divers aspects physiologiques de la bactérie. Son rôle le plus important est la régulation de l'homéostasie du fer. En régulant négativement les différents systèmes d'acquisition du fer et en activant, de façon directe ou indirecte, plusieurs gènes codant pour des protéines contenant ou utilisant le fer, Fur permet de garder un niveau de fer libre intracellulaire assez faible lorsque la bactérie en a suffisamment pour ses différentes fonctions. En plus, cela permet aux différentes protéines d'être exprimées seulement dans les conditions appropriées, évitant un déséquilibre dans le niveau de fer intracellulaire et évitant à la bactérie de dépenser inutilement de l'énergie à exprimer tous ces systèmes lorsqu'elle n'en a pas besoin.

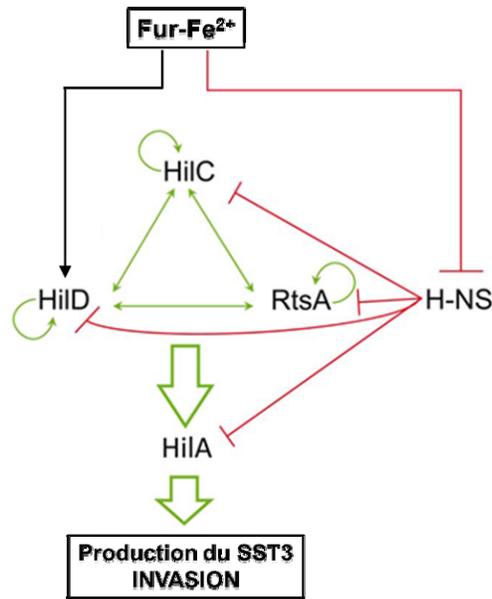
En plus de son rôle dans l'homéostasie du fer, Fur a un rôle dans la protection contre certains stress rencontrés par la bactérie lors de l'infection. Afin de survivre dans les environnements acides de son hôte, *Salmonella* déploie un système de tolérance à l'acidité appelé ATR et Fur est impliqué dans cette réponse au stress acide (19, 118). En conditions acides, *Salmonella* utilise son ATR où différents régulateurs, dont RpoS, Fur, PhoP/PhoQ et OmpR/EnvZ, induisent l'expression de gènes codant pour différentes protéines appelées ASP (*acid shock proteins*) (19, 300). Le régulateur Fur de *S. Typhimurium* induit l'expression de certains gènes impliqués dans l'ATR (119). Un mutant *fur* de *S. Typhimurium* est très sensible au stress acide et est incapable de déployer un ATR efficace due à la perte des ASP induites par ce régulateur (19, 117). Le rôle de Fur dans la résistance aux pH acides est indépendant de son rôle dans l'acquisition du fer, puisque l'ATR n'est pas affecté par le niveau de fer et qu'un mutant *fur* incapable de réguler les gènes d'acquisition du fer est tout de même capable de monter un ATR (144). Le mécanisme d'induction des gènes codant pour les ASP par Fur ainsi que l'identité de la majorité de ces protéines restent toujours indéterminés à ce jour.

Fur est également important pour la réponse au stress oxydatif. En présence d'oxygène, le fer devient toxique en favorisant la production de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton. Lorsque la concentration de fer augmente, Fur permet de réguler le niveau de fer intracellulaire afin de diminuer la production de ROS. En effet, en situation de stress oxydatif, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le O<sub>2</sub><sup>-</sup> activent le régulateur Fur via OxyR et SoxRS (391). Lorsque Fur est activé par ces stress et par le Fe<sup>2+</sup>, les systèmes d'acquisition du fer sont inhibés et il y a une augmentation de l'incorporation du fer dans différentes protéines, soit certaines protéines du

métabolisme, les protéines de stockage et la protéine Fur elle-même (69). Ces effets ont comme conséquence de diminuer le niveau de fer libre intracellulaire et de diminuer ainsi la toxicité liée au fer (343). De plus, Fur réprime l'expression de *sodA* et induit celle de *sodB*, les deux superoxydes dismutases cytoplasmiques impliquées dans l'élimination de l'anion superoxyde (343).

Le rôle de Fur est primordial pour assurer une bonne homéostasie du fer chez *Salmonella*, et il a été démontré qu'un défaut dans cette régulation augmente la susceptibilité des bactéries au stress oxydatif. En effet, un mutant *fur* est plus sensible au stress oxydatif et acide, deux stress rencontrés lors de l'infection. De plus, Fur est un régulateur global qui affecte l'expression de plusieurs gènes, dont certains sont directement ou indirectement impliqués dans la virulence. En grande partie à cause de ces effets, le régulateur Fur de *Salmonella* joue un rôle dans la pathogenèse de cette bactérie de multiples façons. Plusieurs études ont démontré que le mutant *fur* de *S. Typhimurium* est atténué ou même avirulent lors de l'infection de souris inoculées par voie orale ou intrapéritonéale (77, 130, 348, 358, 375). Dans une de ces expériences, Fur n'affectait pas la virulence lors de l'infection de souris par voie intrapéritonéale ni lors de l'infection de macrophages *in vitro*, mais était requis pour une infection de souris par voie orale et pour l'invasion de cellules épithéliales en culture (130). Une autre étude confirme l'importance de ce régulateur pour l'invasion de cellules épithéliales (375), signifiant que Fur jouerait plutôt un rôle dans les phases précoces de l'infection.

Le lien entre Fur et l'invasion cellulaire a été établi seulement récemment, où il a été démontré que Fur régule positivement les gènes du SPI-1 nécessaires à l'invasion des cellules par *Salmonella* (Fig. 22) (96). Les gènes du SPI-1 sont activés par la protéine HilA, elle-même sous l'influence des protéines HilC, HilD et RtsA (95). Fur active directement la transcription de *hilD* en se liant à une séquence de liaison en amont du promoteur (337), et inhibe directement la transcription de *hns*. La protéine H-NS inhibe la transcription de *hilA* (348). Donc, par ces régulations, Fur active indirectement HilA, ce qui a pour effet d'augmenter l'expression des différents composants nécessaires au SST3, un système important pour l'invasion cellulaire.

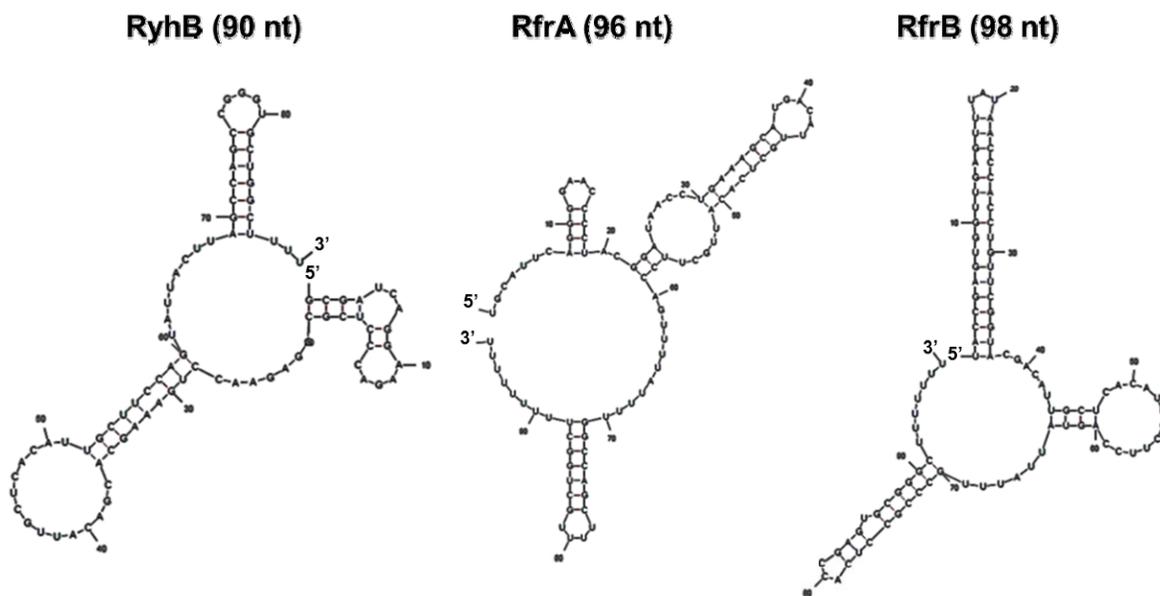


**Figure 22. Fur active les gènes du SPI-1 impliqués dans l'invasion.** Les gènes du SPI-1, incluant les gènes codant pour le SST3-1 nécessaire à l'invasion, sont régulés positivement par HilA qui est régulé par les protéines HilC, HilD et RtsA. Fur stimule l'invasion en activant directement l'expression de *hilD* et en inhibant l'expression de *hns*. HilD active l'expression de HilA tandis que H-NS l'inhibe. Figure adaptée de (337).

### 1.2.5.2. Le petit ARN RyhB

Le petit ARN régulateur non codant RyhB a été découvert chez la bactérie *E. coli* par deux recherches indépendantes visant à identifier les petits ARN régulateurs de cette bactérie (16, 368). La caractérisation de RyhB a permis de déterminer que ce petit ARN joue un rôle dans l'homéostasie du fer et qu'il est réprimé par Fur et par le fer (220). Effectivement, une séquence de liaison du régulateur Fur est située au niveau du promoteur de *ryhB* (220, 355). Lorsque le fer est abondant, Fur est activé et inhibe directement la transcription de *ryhB*. Inversement, lorsque le niveau de fer diminue, la répression de *ryhB* par Fur est levée, ce qui permet la transcription de ce petit ARN (258).

La transcription du gène *ryhB* produit un ARN de 90 nucléotides possédant une structure secondaire repliée en tiges-boucles et inclue la structure de terminaison de la transcription  $\rho$ -indépendante commune aux petits ARN non codants (tige-boucle suivie de plusieurs U) (Fig. 23) (138, 220). RyhB est un petit ARN qui agit en *trans*, c'est-à-dire qu'il régule des ARNm situés à différents emplacements du génome et possède une complémentarité limitée avec ses différentes cibles (369).



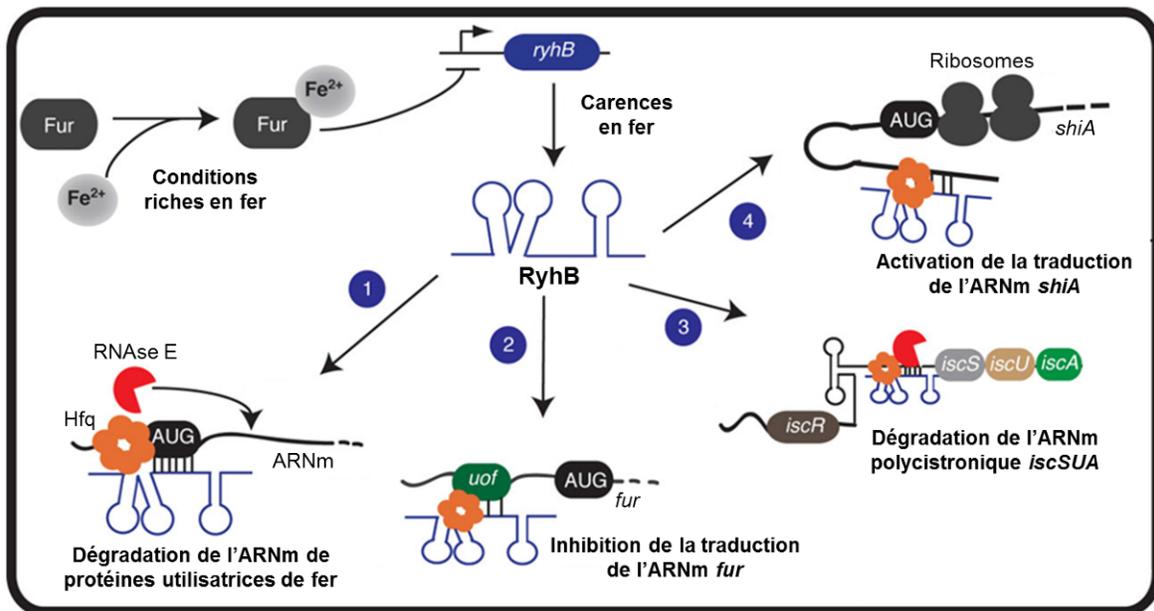
**Figure 23. Structures secondaires des petits ARN RyhB, RfrA et RfrB.** *E. coli* possède un petit ARN RyhB de 90 nt et *Salmonella* possède deux petits ARN, RfrA (96 nt) et RfrB (98 nt). Chaque ARN possède une structure secondaire repliée en tiges-boucles et une structure de terminaison de la transcription  $\rho$ -indépendante commune aux petits ARN non codants (tige-boucle suivie de plusieurs U). Figure obtenue à l'aide du programme informatique *Mfold*.

Lorsqu'il est exprimé en conditions de carence en fer, RyhB inhibe l'expression de plusieurs protéines par des mécanismes post-transcriptionnels (221). La caractérisation de ce petit ARN a confirmé que RyhB réprime l'expression de certains gènes connus comme étant activés indirectement par Fur (220). Les différents ARNm ciblés par RyhB codent pour des protéines associées avec le fer dont deux ferritines (*bfr* et *ftnA*), une superoxyde dismutase (*sodB*) et des enzymes du cycle de Krebs, soit une succinate déshydrogénase (*sdhCDAB*), une

aconitase (*acnA*) et une fumarase (*fumA*) (220). Dernièrement, il a été démontré que le gène *ftnA* codant pour une ferritine est induit directement par Fur et que RyhB n'est pas impliqué dans sa régulation (246). Une étude effectuée chez *E. coli* utilisant des biopuces a identifié 56 gènes compris dans 18 opérons dont les transcrits sont réprimés par RyhB et dont la majorité sont impliquées dans le métabolisme du fer (222). Les résultats montrent également que certains gènes sont activés lorsque RyhB est exprimé, signifiant que ce petit ARN peut aussi activer l'expression de certaines cibles de façon directe ou indirecte.

### **Mécanismes d'action de RyhB**

RyhB agit principalement en inhibant la traduction des différents ARNm, en diminuant la stabilité de ces transcrits et en favorisant leur dégradation (Fig. 24). Plusieurs études investiguant les mécanismes moléculaires de régulation par RyhB se sont concentrées sur la régulation de *sodB* (258). La régulation de cette superoxyde dismutase illustre bien le mécanisme d'action de RyhB. Ce petit ARN s'apparie de façon antisens avec des séquences complémentaires retrouvées dans certains ARNm cibles (220, 221). L'appariement se fait le plus souvent dans la région 5'UTR, ce qui bloque le RBS et inhibe la traduction (219, 221, 303). Cet appariement antisens entre RyhB et les ARNm est effectué à l'aide de la protéine Hfq (132, 220, 330).



**Figure 24. Mécanismes d'action du petit ARN RyhB.** 1) RyhB peut s'apparier dans la région 5'UTR à l'aide de Hfq et causer la dégradation de l'ARNm via la RNase E et inhiber la traduction. 2) RyhB inhibe indirectement la traduction du gène *fur* en se liant au niveau de la région *uof*. 3) RyhB peut réguler différemment des gènes organisés en opéron. RyhB s'apparie dans la région 5'UTR de *iscS*, causant l'inhibition de la traduction et la dégradation du transcrite *iscSUA*, mais une structure secondaire présente à la fin du premier gène de l'opéron (*iscR*) le protège de l'action de RyhB et lui permet d'être traduit. 4) RyhB peut également activer la traduction en s'appariant dans la région 5'UTR de *shiA* et en empêchant l'ARN de former une structure inhibitrice. Figure adaptée de (303).

Hfq est une protéine ayant été décrite préalablement comme un facteur hôte nécessaire pour la réplique du bactériophage à ARN Q $\beta$  (Hfq pour *host factor for phage Q $\beta$* ) et est reconnue depuis comme un régulateur important pouvant s'associer à l'ARN (120, 364). Hfq forme un hexamère ayant l'apparence d'un beigne qui est homologue aux protéines Sm retrouvées chez les eucaryotes. Comme ces protéines, Hfq s'associe aux séquences d'ARN riches en adénine (A) et uracile (U) (6, 233, 330, 364). Hfq s'associe aux ARNm et sert de chaperonne aux petits ARN en augmentant leur stabilité et en facilitant leur appariement aux ARNm (132, 330). La multimérisation de Hfq est stimulée par RelA, une protéine impliquée

dans la réponse stringente des bactéries. RelA favorise donc la liaison de Hfq avec les différents petits ARN, y compris RyhB (15).

Par conséquent, RyhB s'associe à Hfq qui lui sert de chaperonne et ce complexe se lie aux ARNm cibles. En se liant à ces ARNm, Hfq facilite l'appariement des séquences complémentaires entre les deux ARN (132). Cette liaison entraîne la dégradation de l'ARNm en recrutant le dégradosome à ARN, qui est un complexe de protéines formé d'une endoribonucléase (RNase E), d'une polynucléotide phosphorylase (PNPase), d'une hélicase à ARN (RhlB) et d'une émolase (80). La dégradation des ARNm et de RyhB peut également être effectuée par la RNase III (3). La RNase E est la composante principale du dégradosome, car elle contient des sites de liaisons pour toutes les protéines du dégradosome, pour l'ARN et pour Hfq (80). Rapidement après l'appariement entre le petit ARN et l'ARNm, la RNase E dégrade simultanément les deux types d'ARN (219). Il a été démontré que la liaison entre Hfq et la RNase E est importante pour cette dégradation (234). Lors de la régulation de *sodB* par RyhB, la dégradation de l'ARNm par la RNase E se fait sur un site de coupure au niveau de la région codante située loin du site d'appariement de RyhB (277). Un fait intéressant est que RyhB peut inhiber la traduction de *sodB* même en absence de dégradation (235). L'inhibition de la traduction n'est pas le signal responsable de la dégradation de l'ARNm, car celui-ci peut être dégradé lors de l'appariement avec RyhB même en absence de traduction (277). Ainsi, la régulation négative par RyhB se fait en deux étapes : RyhB réprime l'initiation de la traduction en bloquant l'accès des ribosomes, et ensuite il stimule la dégradation de l'ARNm par la RNase E (303).

RyhB peut également inhiber indirectement la traduction de certains gènes, et c'est par ce mécanisme que RyhB régule l'expression de son régulateur Fur (Fig. 24). En conditions riches en fer, Fur s'autorégule faiblement et cela permet un niveau basal d'expression. Quand le niveau de fer diminue, cette autorégulation est levée mais l'expression de *fur* reste stable (258). Cette observation est expliquée par le fait que *fur* est co-transcrit avec un petit cadre de lecture ouvert (ORF pour *open reading frame*) situé tout juste en amont de *fur* (357). Cet ORF, appelé *uof* pour *upstream of fur*, est la cible de RyhB qui s'apparie au niveau de cette région du transcrit. Cela a pour effet de diminuer la stabilité du transcrit bi-cistronique *uof-fur* et de bloquer la traduction de *uof*, diminuant ainsi celle de *fur* (258, 303, 357). Cette régulation ne

semble pas induire la dégradation du transcrit, mais dépend seulement de l'inhibition de la traduction de *uof* (303). La régulation de *fur* par RyhB prévient donc l'accumulation du régulateur Fur en conditions pauvres en fer. Cette étude démontrait pour la première fois la régulation de la traduction de façon indirecte par un petit ARN régulateur non codant (258, 357).

RyhB régule aussi l'expression de gènes regroupés en opéron, et généralement RyhB induit l'arrêt de la traduction et la dégradation de tout le transcrit. Ce mécanisme est utilisé lors de la régulation de l'opéron *sdhCDAB*, où RyhB s'apparie à une région située entre les gènes *sdhC* et *sdhD* (220). Cet appariement induit la dégradation de tout le transcrit, ce qui inhibe la production de la succinate déshydrogénase (220). Toutefois, l'expression des gènes d'un même opéron peut être différenciellement régulée (Fig. 24). RyhB s'apparie au niveau de la région 5'UTR du cistron *iscS* de l'ARNm polycistronique *iscRSUA* impliqué dans la synthèse des groupements Fe-S (87). Cet appariement induit la dégradation du transcrit en aval, *iscSUA*. Cependant, *iscR* est protégé de la dégradation par la présence d'une structure secondaire située dans la région 3' du transcrit (87). Ainsi, lorsque RyhB est exprimé, il inhibe l'expression des gènes *iscSUA* codant pour la machinerie nécessaire à la synthèse des groupements Fe-S, mais *iscR*, codant pour le répresseur des gènes *iscSUA*, est exprimé (258, 303). IscR nécessite un groupement Fe-S pour être actif, il est donc produit mais demeure sous la forme *apo*-IscR (303). Par ailleurs, il a été démontré que le régulateur IscR, sous sa forme *apo*, induit l'expression des gènes *suf* codant pour la machinerie nécessaire à la synthèse des groupements Fe-S lors de conditions de carence en fer ou de stress oxydatif (303, 383).

Malgré le fait que la majorité des cibles régulées par RyhB sont réprimées par ce petit ARN, certains gènes sont régulés positivement par RyhB (Fig. 24) (218, 222). En effet, RyhB stabilise l'ARNm de *shiA* et active sa traduction (278). Le gène *shiA* code pour une perméase du shikimate, un précurseur de la synthèse de l'entérobactine (278). Quand le fer est abondant, Fur inhibe *ryhB* et l'expression de *shiA* est inhibée. Cela est dû à la présence d'une structure secondaire inhibitrice située dans la région 5'UTR de *shiA* qui restreint l'accès du RBS et des premiers codons de traduction (278). Lorsque RyhB est exprimé, il s'apparie à une séquence située dans cette région et prévient la formation de la structure qui inhibe la traduction (278).

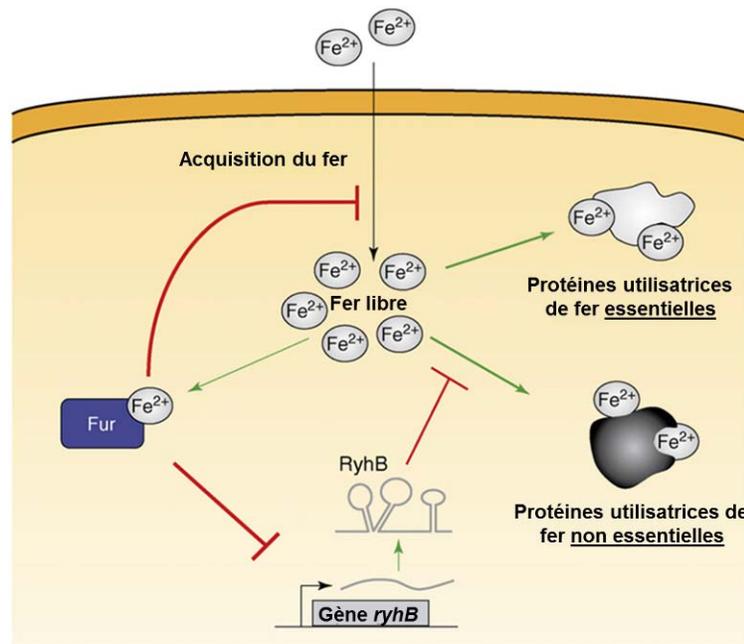
Ces interactions permettent la stabilisation de l'ARNm de *shiA* et l'activation de sa traduction, augmentant ainsi la production de la perméase et l'importation du shikimate (303).

### **Rôles de RyhB**

Le petit ARN RyhB est retrouvé chez plusieurs bactéries. La séquence de *ryhB* est plus ou moins homologue selon les espèces et certaines bactéries possèdent une deuxième copie de cette séquence. Plusieurs bactéries pathogènes possèdent une copie de *ryhB*, dont *Vibrio* et *Shigella*, tandis que d'autres en possèdent deux copies comme *Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia* et *Photobacterium* (139, 220, 258, 303). De plus, certaines bactéries possèdent un ou plusieurs petits ARN impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer qui ne partagent pas d'homologie avec RyhB. *Neisseria*, *Bacillus*, *Azotobacter* et certaines cyanobactéries possèdent un tel régulateur, tandis que *Pseudomonas* possède deux petits ARN qui ne sont pas homologues à RyhB, PrrF1 et PrrF2 (258, 373). Ces petits ARN ont tous un rôle dans la régulation de l'homéostasie du fer. Selon les bactéries, ils possèdent d'autres rôles, notamment dans le métabolisme, la respiration, la réponse au stress et la virulence. La majorité des études ayant été effectuées chez *E. coli*, plusieurs rôles ont été attribués à RyhB chez cette bactérie.

Le principal rôle de RyhB est de réguler l'homéostasie du fer. Lorsque le niveau de fer intracellulaire baisse, la répression de RyhB par Fur est levée et RyhB est exprimé. Celui-ci cible différents ARNm auxquels il s'apparie et le résultat de cet appariement est le plus souvent une inhibition de la traduction et une dégradation des ARNm. Une grande partie des cibles de RyhB codent pour des protéines qui contiennent et utilisent du fer, donc quand elles sont inhibées par ce petit ARN, cela cause une augmentation du fer libre intracellulaire (221, 303). En effet, une souche exprimant RyhB subit une augmentation de 50 % de son contenu en fer libre intracellulaire, et un mutant *ryhB* contient trois fois moins de fer intracellulaire que la souche sauvage (179, 303). Cette augmentation de fer libre serait due à l'acquisition de fer plutôt qu'au fer déjà présent dans la bactérie (179, 303). La majorité des cibles de RyhB associées au fer sont importantes pour le métabolisme du fer, mais elles ne sont pas essentielles pour la survie de la bactérie (221, 303). Donc, en situation de carence en fer, RyhB prévient l'expression de ces protéines non-essentiels afin que le peu de fer nouvellement acquis soit accessibles pour les protéines essentielles à la survie de la bactérie (Fig. 25) (179,

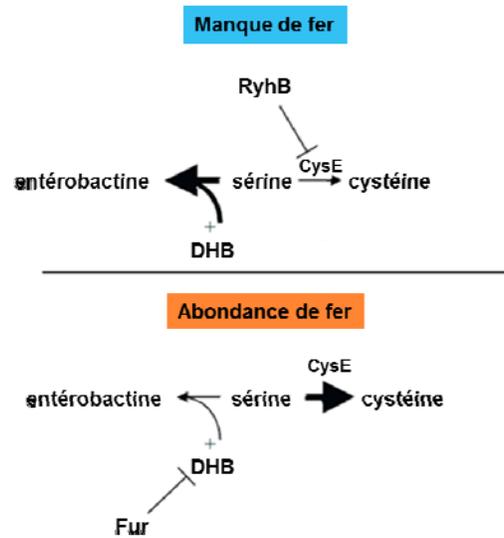
221). En d'autres mots, RyhB engendre une économie de fer (*Fe sparing*) pour les systèmes qui requièrent du fer et qui sont indispensables à la bactérie. RyhB inhibe aussi indirectement des gènes régulés par Fur, et ceci est expliqué par le fait que l'augmentation du fer causée par RyhB atteint un niveau suffisamment élevé pour activer Fur, provoquant la répression de ces gènes par ce régulateur (179, 295). En résumé, RyhB inhibe des protéines qui ne sont pas indispensables lors de conditions pauvres en fer et qui sont plutôt utiles lorsqu'il y a du fer (ferritine, superoxyde dismutase, synthèse des groupements Fe-S). Lorsque le fer diminue, ces protéines séquestrent inutilement le fer, donc leur répression par RyhB permet d'épargner le fer pour qu'il soit incorporé dans certaines enzymes essentielles (ribonucléotide réductase, dishydroxyacide déshydratase) (221).



**Figure 25. Régulation de l'homéostasie du fer par Fur et RyhB.** En présence de fer, Fur inactive l'expression des gènes d'acquisition du fer et l'expression de *ryhB*. En carence de fer, RyhB inhibe l'expression de gènes codant pour des protéines utilisatrices de fer non essentielles, ce qui engendre une économie de fer (*Fe sparing*) pour les systèmes qui requièrent du fer et qui sont indispensables à la bactérie. Figure adaptée de (221).

Pendant environ 30 ans, Fur a été considéré comme le régulateur majeur de l'expression des systèmes d'acquisition du fer. Dernièrement, le rôle du petit ARN RyhB a été établi dans

la régulation de l'entérobactine chez *E. coli*, où il a été démontré que RyhB était requis pour la production de ce sidérophore (302). Un mutant *ryhB* produit moins d'entérobactine que la souche sauvage en conditions pauvres en fer et cette régulation est réalisée de deux façons (302). Premièrement, RyhB est requis pour l'expression de l'opéron *entCEBAH* impliqué dans la synthèse de l'entérobactine. Le mécanisme de cette régulation reste cependant irrésolu (303). Deuxièmement, RyhB est à l'origine d'une plus grande disponibilité de la sérine, une composante de l'entérobactine, via l'inhibition de *cysE* qui code pour une sérine acétyltransférase qui utilise la sérine comme substrat pour la synthèse de la cystéine (Fig. 26) (302). RyhB s'apparie dans la région 5'UTR de l'ARNm *cysE* et inhibe sa traduction. Ainsi, en conditions riches en fer, CysE est exprimé et utilise la sérine pour synthétiser la cystéine. Quand le niveau de fer diminue, RyhB réprime *cysE*, diminuant ainsi l'utilisation de la sérine pour la synthèse de la cystéine. La sérine est donc plus disponible pour être incorporée dans l'entérobactine. Par surcroît, l'induction de la perméase du shikimate par l'activation de la traduction de *shiA* par RyhB permet à la bactérie d'acquérir cette molécule et d'augmenter ainsi la production des sidérophores (278, 295). En effet, le shikimate est un précurseur du chorismate, une molécule utilisée comme substrat par l'enzyme EntC dans la première étape de synthèse de l'entérobactine. Le rôle de RyhB dans la production des sidérophores est également retrouvé chez la bactérie *Vibrio parahaemolyticus*. Tout récemment, il a été démontré que RyhB stimule la production du sidérophore vibrioferrine de cette bactérie en augmentant la stabilité de l'opéron impliqué dans la synthèse de ce sidérophore, *pvsOp*, en s'appariant dans la région 5'UTR du polycistron (334).



**Figure 26. RyhB stimule la production de l'entérobactine via l'inhibition de *cysE*.** En condition d'abondance de fer, la sérine est utilisée pour la synthèse de la cystéine à l'aide de l'enzyme CysE. En carence de fer, RyhB inhibe l'expression du gène *cysE* et la sérine devient plus disponible pour la synthèse de l'entérobactine. Figure adaptée de (302).

La régulation de plusieurs gènes par RyhB affecte le métabolisme de la bactérie. En effet, RyhB inhibe l'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs, dont une succinate déshydrogénase (*sdhCDAB*), une fumarate réductase (*frdABCD*), une fumarase (*fumA*) et deux aconitases (*acnA* et *acnB*) (220, 222, 295). Tous ces enzymes contiennent du fer, et les autres enzymes du cycle ne contenant pas de fer ne sont pas régulés par RyhB (220). L'impact de RyhB sur le métabolisme du cycle de Krebs est démontré par l'incapacité d'une souche surexprimant RyhB de croître sur des milieux minimaux contenant seulement du succinate ou du fumarate comme source de carbone (220). Également, RyhB affecte certains gènes codant pour des composants de la chaîne respiratoire, dont les gènes *nuo* et *fdo* (222, 295). Ainsi, en conditions de carence en fer, RyhB réprime plusieurs systèmes métaboliques utilisant le fer.

D'autre part, le petit ARN RyhB est impliqué dans la réponse au stress oxydatif. L'homéostasie du fer et la régulation du stress oxydatif sont étroitement liées à cause de la propriété du fer à causer la production de ROS. Une des premières cibles de RyhB découverte est le gène *sodB* codant pour la superoxyde dismutase à fer (220). La régulation des deux SOD

cytoplasmiques, SodB (FeSOD) et SodA (MnSOD), est particulière car *sodA* est réprimé par Fur en conditions riches en fer alors que *sodB* est réprimé par RyhB en conditions de carence en fer (67, 220). Il y a donc toujours une SOD active peu importe le niveau de fer intracellulaire. De plus, RyhB inhibe l'expression du gène *msrB* codant pour une méthionine sulfoxyde réductase responsable de la réparation des dommages causés aux protéines par les ROS (39, 222). *E. coli* possède deux de ces enzymes, MsrA et MsrB. Il semble donc qu'en situation où le niveau de fer est faible, où il y a moins de production de ROS, MsrB n'est pas requis et MsrA suffit pour réparer les dommages liés au stress oxydatif (39). La répression de *msrB* par RyhB est singulière, car le petit ARN s'apparie sur deux régions différentes de l'ARNm dans le 5'UTR (39).

La séquence de *ryhB* est retrouvée chez plusieurs bactéries pathogènes en une ou deux copies et avec plus ou moins d'homologie selon les espèces. Puisque RyhB régule une panoplie de gènes par un appariement complémentaire avec les ARNm, RyhB peut affecter différentes cibles impliquées dans la virulence chez ces bactéries (258). Entre autres, RyhB est requis pour la résistance aux pH acides chez *Shigella flexneri*, un stress rencontré lors de l'infection (259). Toujours chez *Shigella*, RyhB inhibe l'expression de *virB* chez *S. dysenteriae*, un gène codant pour un activateur de la transcription de plusieurs gènes de virulence qui affecte notamment l'invasion des cellules et la motilité (4, 239). *Vibrio cholerae* possède également le petit ARN RyhB et celui-ci inhibe l'expression de plusieurs gènes liés à la virulence et affecte la motilité, la chimiotaxie et la formation de biofilms, mais n'est pas requis pour la colonisation de souris (79, 228). Chez *Klebsiella pneumoniae*, RyhB régule la synthèse de la capsule de polysaccharide, un composant pouvant jouer un rôle dans la virulence (171). Chez *Yersinia pestis*, la production de RyhB est activée lors de la croissance dans les poumons de souris, signifiant que ces petits ARN facilitent la progression de la pneumonie chez les souris (84).

### **RyhB chez *Salmonella***

Lorsque RyhB a été découvert chez *E. coli*, une comparaison de séquence a permis de déterminer la présence de deux petits ARN homologues à RyhB chez *Salmonella* (220). Un de ces homologues possède une grande homologie avec le gène *ryhB* de *E. coli* et se retrouve

entre les mêmes gènes *yhhX* et *yhhY*, tandis que le deuxième ARN possède une moins grande homologie et est situé dans un autre emplacement du génome (220). Puisque le terme « *ryh* » signifie un petit ARN ayant une fonction inconnue situé entre les centisomes 70 et 80 du chromosome, et que ce n'est pas le cas des deux homologues de *Salmonella*, ces petits ARN ont été nommés respectivement RfrA et RfrB (*RNA for Fur response*) (96). RfrA, également nommé RyhB ou RyhB1, est un ARN de 96 nucléotides et est l'orthologue de RyhB, tandis que RfrB, aussi nommé IsrE ou RyhB2, est un ARN de 98 nucléotides et est le paralogue de RyhB (194, 261, 263). RfrB a été identifié dans une étude visant à déterminer les petits ARN régulateurs présents dans les îlots génétiques de *S. Typhimurium* et est donc unique aux salmonelles (263). RfrA et RfrB partagent plusieurs similarités comme c'est le cas chez la majorité des homologues de RyhB, c'est-à-dire qu'ils possèdent un site de liaison du régulateur Fur au niveau de leur promoteur, une structure secondaire similaire et une séquence conservée au niveau des nucléotides 37 à 69 (Fig. 23) (263).

Il n'existe pas beaucoup d'informations concernant RfrA et RfrB et toutes les expériences publiées jusqu'à maintenant se sont limitées à l'étude de ces deux ARN régulateurs chez le sérovar Typhimurium. Une étude réalisée avec ce sérovar a évalué les conditions d'expression des deux petits ARN (263). Bien que l'expression de RfrA et RfrB soit régulée par le niveau de fer via le répresseur Fur, RfrB est principalement exprimé en phase stationnaire via RpoS et RfrA est plus exprimé que RfrB en phase exponentielle, en carence de fer et en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces deux petits ARN sont donc différenciellement régulés (263).

Des analyses récentes démontrant les cibles régulées par RfrA et RfrB chez *S. Typhimurium* montrent que ces petits ARN régulent un certain nombre de gènes régulés par RyhB chez *E. coli*, mais un grand nombre de cibles sont nouvelles (194, 195). De plus, bien que plusieurs gènes soient régulés par les deux petits ARN, beaucoup sont régulés seulement par RfrA ou RfrB (194, 195). Ils sont notamment impliqués dans la régulation de *sodB*, comme chez *E. coli*, et cette régulation est redondante puisque chaque petit ARN inhibe la traduction de *sodB* (96, 194). RfrA et RfrB régulent également l'expression des régulateurs de la respiration du nitrate *narP* et *narL*, où les petits ARN induisent l'expression de *narL* et inhibent celle de *narP* (338).

Le rôle de ces deux petits ARN dans la virulence de *Salmonella* n'est pas très caractérisé. RfrA et RfrB sont exprimés à l'intérieur de certains types de cellules eucaryotes, comme les macrophages et les fibroblastes, signifiant un rôle potentiel dans l'infection (261, 263). D'ailleurs, RfrA et RfrB contribuent à restreindre la croissance de *S. Typhimurium* dans les fibroblastes (261). Également, ces petits ARN ont un rôle dans la protection face aux stress acide et oxydatif ainsi que dans l'effet bactéricide de certains antibiotiques chez *S. Typhimurium* (194). Finalement, RfrB, mais pas RfrA, régule trois gènes de motilité et semble inhiber la motilité de type *swimming* chez *S. Typhimurium* (195). Ces résultats semblent démontrer un rôle de ces deux petits ARN régulateurs dans la virulence de *Salmonella*, mais leur rôle dans l'infection n'est pas déterminé.

Pour résumer, RfrA et RfrB sont différentiellement exprimés selon les différentes conditions rencontrées et ils démontrent des rôles dans la régulation de la physiologie et de la virulence de *S. Typhimurium* qui sont généralement communs, mais parfois distincts.

### **1.2.5.3. Autres systèmes de régulation de l'homéostasie du fer**

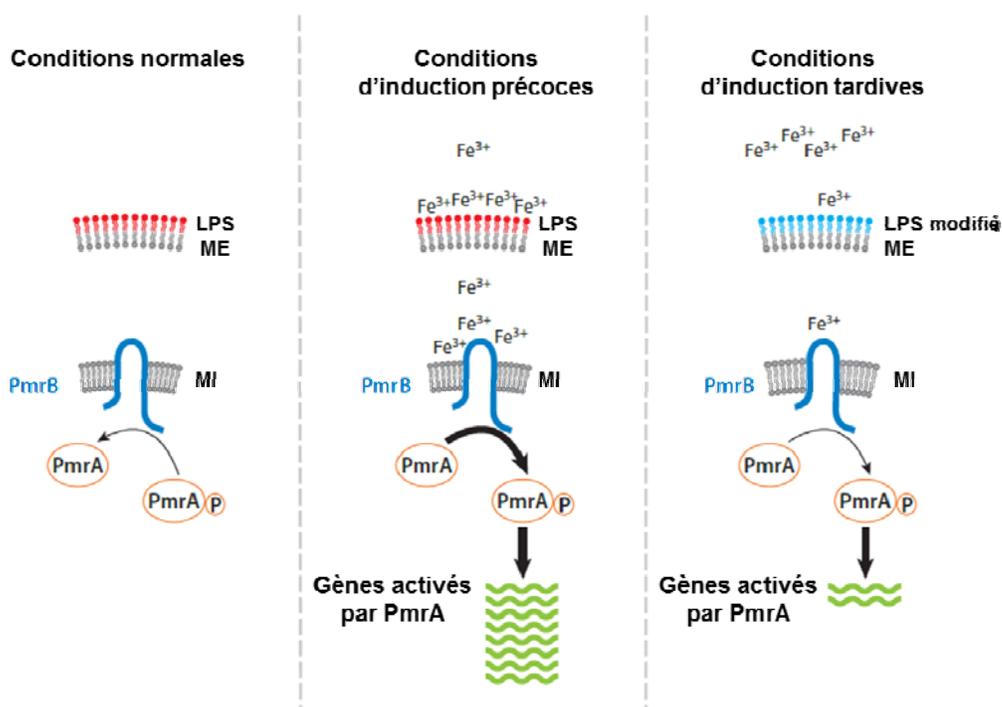
Le régulateur Fur et les petits ARN RfrA/RfrB sont les principaux acteurs de la régulation de l'homéostasie du fer chez *Salmonella*. Toutefois il existe d'autres systèmes qui affectent cette homéostasie chez *Salmonella* et chez d'autres bactéries. Ces régulateurs peuvent agir globalement en affectant plusieurs gènes et avoir un impact sur différents aspects de l'homéostasie du fer ou peuvent avoir des rôles plus limités en affectant des aspects spécifiques de cette homéostasie.

Chez les bactéries à Gram positif possédant un taux élevé de G-C, comme *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Streptomyces*, la protéine DtxR ou IdeR agit comme un régulateur global de l'homéostasie du fer (13, 150). DtxR (*diphtheria toxin regulator*) est une protéine qui réprime l'expression du gène *tox* codant pour la toxine diphtérique en conditions riches en fer (310). En plus de cette fonction, DtxR régule plusieurs gènes liés à l'homéostasie du fer d'une façon très similaire au régulateur Fur. Bien que les séquences de ces deux régulateurs ne partagent aucune homologie, plusieurs similarités existent autant pour la structure que la régulation chez DtxR et Fur (13, 150). Chacun possède un domaine de liaison

à l'ADN ainsi qu'un domaine permettant la dimérisation et la liaison à des métaux. Le dimère DtxR est donc activé par le  $\text{Fe}^{2+}$  et réprime différents gènes en liant l'ADN au niveau d'une séquence conservée de leur promoteur (13). Les cibles de ce régulateur possèdent les mêmes fonctions que celles régulées par Fur, telles que la synthèse des sidérophores, l'acquisition du fer et la réponse au stress oxydatif (13, 150).

Les bactéries et les organismes eucaryotes partagent certains systèmes de régulation. Chez les eucaryotes, l'homéostasie du fer est entre autres régulée par les protéines IRP1 et IRP2 (*iron regulatory proteins*) (13, 150). En présence de fer, la protéine IRP1 possède un centre [4Fe-4S] et agit comme une aconitase, une enzyme du cycle de Krebs. Lors de privation de fer ou de stress oxydatif, IRP1 perd son groupement [4Fe-4S] et son activité aconitase. La protéine *apo*-IRP1 agit plutôt en s'appariant sur des sites spécifiques appelés IRE (*iron responsive elements*) situés dans les régions 5'UTR ou 3'UTR d'ARNm codant pour des protéines liées au fer telles que les ferritines et le récepteur de la transferrine, et cette liaison régule leur traduction. Les aconitases sont également retrouvées chez les bactéries. *E. coli* et *Salmonella* possèdent deux aconitases, AcnA qui est homologue aux aconitases eucaryotes et AcnB qui est très peu homologue. Il a été démontré que les deux aconitases de *E. coli*, dans leur forme *apo* sans groupement [4Fe-4S], lient les régions 3'UTR de leur propre ARNm, ce qui les stabilise et augmente l'activité aconitase (13, 335). Pareillement, l'aconitase CitB de *Bacillus subtilis* s'associe *in vitro* aux IRE d'un ARNm codant pour une ferritine de lapin et s'associe également à deux gènes impliqués dans l'homéostasie du fer (7). Tout récemment, l'aconitase AcnA de *S. Typhimurium* a montré des capacités à lier des ARNm de ferritines eucaryotes contenant des IRE (23), démontrant un possible rôle dans la régulation de l'homéostasie du fer chez *Salmonella*. Il est intéressant de noter que les régulateurs Fur et RyhB sont impliqués dans la régulation de AcnA et AcnB, démontrant une relation entre les différents systèmes de régulation.

La protéine H-NS régule la transcription d'une multitude de gènes qui répondent aux stress environnementaux. Certains gènes d'acquisition et de stockage du fer sont régulés par cette protéine chez *E. coli* (371). Comme il a été décrit précédemment, H-NS inhibe la transcription du gène *ftnA* codant pour une ferritine, et Fur compétitionne aux mêmes sites de liaisons pour enlever l'inhibition créée par H-NS et ainsi activer la transcription de ce gène (246). Il a d'ailleurs été démontré que Fur inhibe l'expression de *hns*, démontrant encore une fois que différents systèmes de régulation du fer sont liés (348).



**Figure 27. Résistance au Fe<sup>3+</sup> par le système à deux composants PmrA/PmrB via la modification du LPS.** En conditions pauvres en Fe<sup>3+</sup> (conditions normales), la protéine senseur PmrB ne phosphoryle pas PmrA et il n'y a pas d'expression des gènes régulés par PmrA. Lorsque la bactérie rencontre des conditions riches en Fe<sup>3+</sup> (conditions d'induction précoces), le Fe<sup>3+</sup> s'associe au LPS et endommage la membrane externe. Dans le périplasme, le Fe<sup>3+</sup> s'associe et stimule le senseur PmrB, ce qui active le système à deux composants. PmrB phosphoryle PmrA, et la forme phosphorylée de PmrA active l'expression des gènes nécessaires à la résistance au Fe<sup>3+</sup> codant pour des enzymes impliqués dans la modification du LPS. Après un certain temps d'exposition au Fe<sup>3+</sup> (conditions d'induction tardives), le LPS

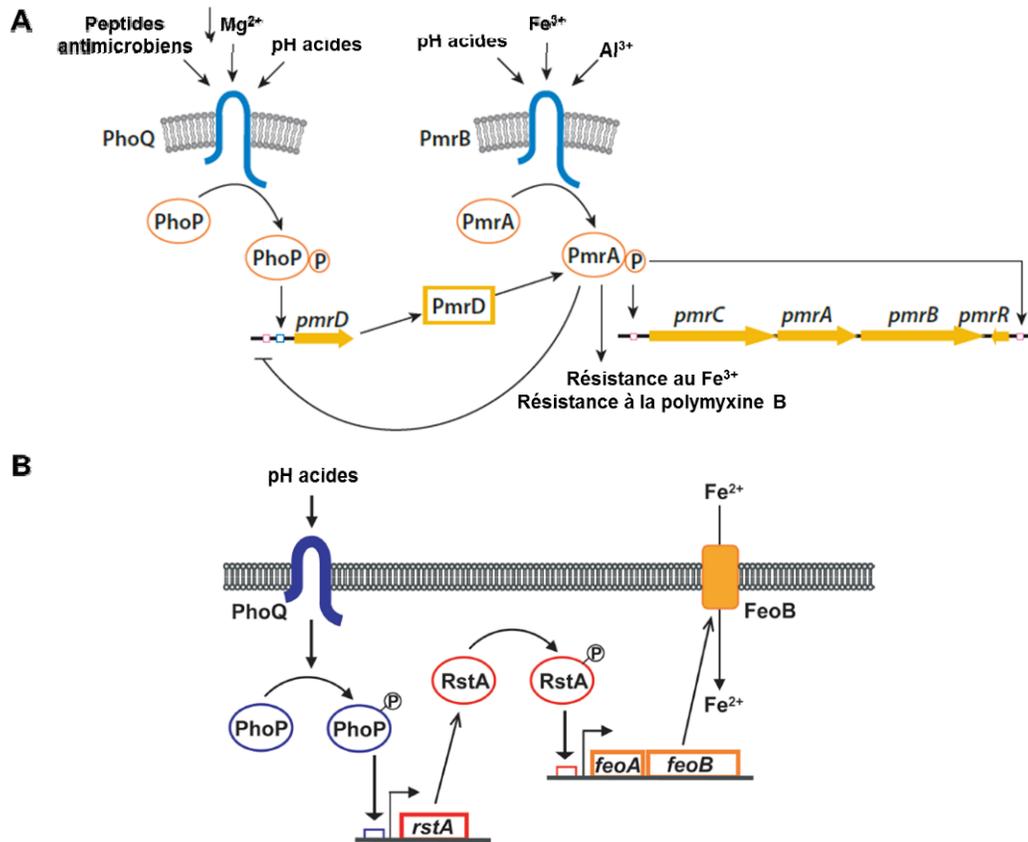
modifié diminue la charge négative de la membrane, ce qui rend la bactérie résistante à ce métal, et il y a une diminution de  $\text{Fe}^{3+}$  associé au LPS. Il y a donc moins de  $\text{Fe}^{3+}$  dans le périplasme associé à PmrB, ce qui diminue l'activation de PmrA et de ses gènes cibles. Figure adaptée de (57).

Les bactéries répondent aux différents changements de leurs environnements principalement par des systèmes à deux composantes (SDC). Le SDC PmrA/PmrB de *Salmonella* est activé par différents signaux environnementaux tels qu'un milieu acide et les métaux  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  (Fig. 27) (57, 379). La toxicité reliée au fer est essentiellement due à la combinaison du  $\text{Fe}^{2+}$  et de l'oxygène menant à la production de ROS. Il a été toutefois démontré que le  $\text{Fe}^{3+}$  peut également être toxique par des mécanismes indépendants de l'oxygène, et le SDC PmrA/PmrB protège la cellule contre les effets toxiques du  $\text{Fe}^{3+}$  (56). Le  $\text{Fe}^{3+}$  peut perméabiliser la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Un mutant *pmrA* ou *pmrB* est très sensible au  $\text{Fe}^{3+}$  et à la vancomycine, un antibiotique qui n'affecte pas les bactéries à Gram négatif habituellement (56). PmrB est situé dans la membrane interne et possède une région périplasmique pouvant lier le  $\text{Fe}^{3+}$  (57, 379). Lorsque PmrB lie le  $\text{Fe}^{3+}$ , il phosphoryle et active PmrA situé dans le cytoplasme et celui-ci s'apparie à l'ADN, régulant l'expression du régulon PmrA incluant différents gènes responsables de la résistance aux  $\text{Fe}^{3+}$  (143). Afin de prévenir la toxicité du  $\text{Fe}^{3+}$ , le système PmrA/PmrB stimule la production d'enzymes impliqués dans la modification du LPS, ce qui se traduit par une diminution de la charge négative générale de la surface bactérienne et diminue la liaison du  $\text{Fe}^{3+}$  (251). Les modifications du LPS par ce système rendent la bactérie plus résistante à ce métal ainsi qu'à la polymixine B et aux peptides antimicrobiens (251). Le système PmrA/PmrB permet donc à *Salmonella* de modifier la composition de sa membrane externe en réponse au fer extracellulaire (262).

RyhB n'est pas le seul petit ARN régulant l'homéostasie du fer, car les petits ARN OmrA/OmrB affectent l'acquisition du fer chez *E. coli*. Ces petits ARN étaient auparavant nommés RygA et RygB, mais puisqu'ils sont régulés par OmpR, ils se dénomment maintenant OmrA et OmrB pour *OmpR regulated sRNA* (141). Ces petits ARN sont exprimés en conditions d'osmolarité élevée et par les stress qui stimulent le SDC OmpR/EnvZ (264). Les séquences de ces deux petits ARN se retrouvent côte-à-côte dans le chromosome et sont très

homologues (264). Lorsqu'ils sont exprimés, OmrA/OmrB régulent de façon redondante l'expression de gènes codant pour différentes protéines de la membrane externe, incluant OmpT, le récepteur du citrate-ferrique FecA et les récepteurs de sidérophores FepA et CirA (141). OmrA/OmrB répriment l'expression de ces gènes en s'appariant dans la région 5'UTR de leur ARNm, provoquant l'arrêt de la traduction et la dégradation des transcrits (142, 264). Donc, dans des conditions d'osmolarité élevée, OmrA/OmrB répriment l'expression des récepteurs du fer et des sidérophores, diminuant ainsi le transport du fer à l'intérieur de la bactérie. Cette régulation suggère un lien entre l'osmolarité et l'acquisition du fer chez les bactéries, mais ce lien demeure méconnu.

PhoP/PhoQ est un SDC qui est activé par différents signaux comme les pH acides, une faible concentration de  $Mg^{2+}$  et des peptides antimicrobiens (57). Ce système de transduction de signaux affecte plusieurs gènes impliqués dans diverses fonctions et il affecte l'homéostasie du fer au moins de deux façons distinctes (Fig. 28). Premièrement, ce SDC stimule le système PmrA/PmrB impliqué dans la résistance au  $Fe^{3+}$  (57). En effet, lorsque la concentration en  $Mg^{2+}$  est faible, PhoQ phosphoryle PhoP et celui-ci active la transcription du gène *pmrD* (57). La protéine PmrD stabilise la forme phosphorylée de PmrA, permettant à ce régulateur d'activer la transcription des gènes codant pour les enzymes nécessaires à la modification du LPS (57). Donc, PhoP/PhoQ stimulent indirectement la résistance au  $Fe^{3+}$  via la stabilisation du système PmrA/PmrB. Deuxièmement, PhoP/PhoQ activent indirectement l'importation du fer via le système Feo. En effet, en conditions de pH acides, ce SDC est activé et active la transcription du gène *rstA* codant pour un régulateur de gènes impliqués dans la réponse au stress acide (63). Comme mentionné précédemment, RstA active la transcription de l'opéron *feo* codant pour le système de transport du fer ferreux (63). Le fer se trouve principalement dans sa forme réduite lors de conditions acides et donc, dans ces conditions, PhoP/PhoQ stimulent l'importation du  $Fe^{2+}$  via l'activation du système Feo.



**Figure 28. Le SDC PhoP/PhoQ stimule la résistance au  $Fe^{3+}$  et l'importation du  $Fe^{2+}$ .** A) Lorsque la concentration en  $Mg^{2+}$  est faible, le SDC PhoP/PhoQ stimule indirectement la résistance au  $Fe^{3+}$  en activant PmrD qui stabilise la forme phosphorylée de PmrA. B) En conditions de pH acides, PhoP/PhoQ activent indirectement l'importation du  $Fe^{2+}$  en activant RstA qui induit l'expression des gènes *feo*. Figure adaptée de (57, 63).

### 1.3. Problématique et objectifs

*Salmonella* est responsable d'un grand nombre d'infections chez les humains qui représentent un important problème de santé publique. Lorsque *Salmonella* infecte son hôte, elle utilise plusieurs facteurs qui affectent sa survie et sa virulence, et l'obtention de nutriments tels que le fer est cruciale pour l'établissement de l'infection. *Salmonella* compétitionne avec l'hôte pour l'acquisition de ce nutriment et utilise différents systèmes d'acquisition du fer qui sont exprimés seulement dans les environnements pauvres en fer. La régulation des différents systèmes reliés à l'homéostasie du fer est primordiale chez *Salmonella*, car elle assure que les niveaux de fer soient assez élevés pour sa survie et son métabolisme, et assez faibles pour éviter l'effet toxique du fer en présence d'oxygène. Chez *Salmonella*, la régulation de l'homéostasie du fer est principalement réalisée par la protéine Fur et les petits ARN non codants RfrA et RfrB. La majorité des informations concernant le rôle de ces régulateurs ont été obtenues par des études sur le sérovar Typhimurium, mais le rôle de ces régulateurs est très peu connu chez le sérovar Typhi. Des études préalables chez *S. Typhimurium* ont déterminé que ces régulateurs affectent l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans de multiples fonctions physiologiques, laissant présager qu'ils affectent divers aspects de cette bactérie. *S. Typhimurium* et *S. Typhi* causent des infections différentes chez l'homme et chacune possède environ 10 % de leur génome qui n'est pas retrouvé chez l'autre sérovar. Il arrive souvent que des régulateurs globaux présents chez des bactéries pathogènes apparentées affectent différemment leur physiologie et leur virulence.

L'hypothèse de cette étude est que la protéine régulatrice Fur et les petits ARN non codants RfrA et RfrB ont un rôle dans l'homéostasie du fer et la virulence de *Salmonella* et qu'ils ont une implication distincte entre les sérovars Typhimurium et Typhi.

Afin de vérifier cette hypothèse, trois objectifs ont été fixés :

- 1) déterminer le rôle de Fur, RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer et la virulence de *S. Typhi*;
- 2) vérifier si Fur affecte différemment l'homéostasie du fer et la virulence des sérovars Typhi et Typhimurium;

3) vérifier si Fur, RfrA et RfrB régulent des gènes qui sont spécifiques à *S. Typhi*.

Afin d'atteindre le premier objectif, l'inactivation des gènes *fur*, *rfrA* et *rfrB* a été effectuée chez *S. Typhi* et les différents mutants ont été testés dans plusieurs conditions. La croissance des différents mutants de régulation de *S. Typhi* a été évaluée dans différentes conditions de croissance riches et pauvres en fer, et la sensibilité au stress oxydatif (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de ces mutants a été déterminée. D'autre part, le rôle de Fur, RfrA et RfrB dans la régulation des sidérophores a été déterminé par différentes approches. La quantité de sidérophores produits a été observée suite à la croissance des différents mutants sur une gélose CAS (chrome azurole S), et l'expression de la salmochéline a été mesurée chez les différents mutants à l'aide d'une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron *iroBCDE* et le gène rapporteur *lacZ* dans différentes conditions riches et pauvres en fer. Également, le niveau d'expression des gènes *fur*, *rfrA* et *rfrB* a été mesuré par qRT-PCR chez la souche sauvage ainsi que chez les mutants *fur*, *rfrA*, *rfrB* et *rfrA/rfrB* dans différentes conditions *in vitro*. D'autre part, le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB dans l'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales par *S. Typhi* a été déterminé par l'infection des cellules INT-407, et le rôle de ces régulateurs dans l'entrée, la survie et la prolifération dans les macrophages a été déterminé par l'infection des macrophages THP-1 avec les différents mutants de *S. Typhi*. Les résultats concernant cette partie sont présentés dans le chapitre 2.

Pour répondre au deuxième objectif, la croissance du mutant *fur* a été évaluée dans différentes conditions de croissance riches et pauvres en fer chez *S. Typhi* et *S. Typhimurium* et la morphologie adoptée par ces mutants a été observée. Également, le niveau de motilité du mutant *fur* des deux sérovars a été déterminé par un test de *swimming* sur agar 0.3 %. De plus, le rôle de ce régulateur dans l'entrée, la survie et la prolifération dans les macrophages a été déterminé par l'infection des macrophages THP-1 avec le mutant *fur* de *S. Typhi* et de *S. Typhimurium*. Finalement, la quantité d'entérobactine et de salmochélines produites par la souche sauvage et le mutant *fur* de *S. Typhi* et *S. Typhimurium* cultivés dans un milieu dépourvu de fer a été mesurée par spectrométrie de masse. Les résultats concernant cette partie sont présentés dans le chapitre 3.

Pour répondre au troisième objectif, le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB dans la régulation de l'opéron fimbriaire *tcf* spécifique à *S. Typhi* a été déterminé. Pour ce faire, une analyse bio-informatique a été réalisée afin de déterminer si le promoteur du gène *tcfA* contient un site de liaison putatif pour le régulateur Fur. Ensuite, une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron *tcfABCD* et le gène rapporteur *lacZ* a permis de déterminer si le fer, la protéine Fur et les petits ARN RfrA et RfrB régulent l'expression de l'opéron fimbriaire. Le dosage  $\beta$ -galactosidase de cette fusion a donc été effectué chez les différents mutants de régulation en milieux riches et pauvres en fer. Les résultats concernant cette partie sont présentés dans le chapitre 4.

## Préface au Chapitre 2

Puisque très peu d'informations concernant le rôle des régulateurs de l'homéostasie du fer étaient connues chez *S. Typhi*, l'étude des régulateurs Fur, RfrA et RfrB a été effectuée chez ce sérovar humain spécifique. Le rôle de ces régulateurs dans l'homéostasie du fer et la résistance à différents stress a été déterminé dans un premier temps par l'analyse de l'effet de différentes mutations dans la sensibilité au peroxyde d'hydrogène et la croissance dans différentes conditions *in vitro*, et dans un deuxième temps par l'analyse de l'expression des sidérophores chez les différents mutants. Le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB dans la virulence de *S. Typhi* a ensuite été évalué lors de l'interaction avec des cellules intestinales et des macrophages humains. Cet article a été soumis à un processus de révision par les pairs et a été publié dans le journal « Microbiology ».

**Article 1 : Leclerc, J. M., Dozois, C. M. and F. Daigle. 2013. Role of *Salmonella enterica* serovar Typhi Fur regulator and small RNAs RfrA and RfrB in iron homeostasis and interaction with host cells. Microbiology **159**:591-602.**

### Contribution des auteurs :

Le projet a été élaboré par France Daigle avec Charles Dozois qui a partagé son expertise pour la planification expérimentale. Je suis le seul auteur ayant réalisé les diverses expérimentations. J'ai procédé à l'analyse des résultats, à la création des figures et des tableaux. France Daigle et moi avons écrit le manuscrit et tous les coauteurs ont participé à sa révision. Les fonds nécessaires au projet ont été fournis par France Daigle.

## CHAPITRE 2 – 1<sup>er</sup> Article

**Role of *Salmonella enterica* serovar Typhi Fur regulator and small RNAs RfrA and RfrB in iron homeostasis and interaction with host cells**

Jean-Mathieu Leclerc, Charles M. Dozois and France Daigle

RUNNING TITLE: Iron homeostasis in *S. Typhi*

CONTENTS CATEGORY: Microbial Pathogenicity

Abbreviations: SPI, *Salmonella* pathogenicity island; qPCR, quantitative PCR; T3SS, type three secretion system.

## SUMMARY

Iron is an essential element that can be toxic at higher concentrations. Therefore, its acquisition and storage require tight control. *Salmonella* encodes the global regulator Fur and the small regulatory non-coding RNAs (sRNAs) RfrA and RfrB, homologs of RyhB. The role of these iron homeostasis regulators was investigated in *Salmonella enterica* serovar Typhi. Strains containing either single or combined deletions of these regulators were obtained. The mutants were tested for growth in low and high iron conditions, resistance to oxidative stress, expression and production of siderophores and during interaction with host cells. The *fur* mutant showed a growth defect and was sensitive to hydrogen peroxide. The expression of the sRNAs was responsible for these defects. Siderophore expression by *S. Typhi* and both sRNAs were regulated by iron and by Fur. Fur contributed to invasion of epithelial cells, and was shown for the first time to play a role in phagocytosis and intracellular survival of *S. Typhi* in human macrophages. The sRNAs RfrA and RfrB were not required for interaction with epithelial cells, but both sRNAs were important for optimal intracellular replication in macrophages. In *S. Typhi*, Fur is a repressor of both sRNAs and loss of either RfrA or RfrB resulted in distinct phenotypes suggesting a non-redundant role for these regulatory RNAs.

## INTRODUCTION

Fur (ferric uptake regulator) is a regulatory protein that is active in the presence of iron (and other metals) and its principal function is to repress the transcription of genes implicated in iron acquisition and transport (Ernst *et al.*, 1978; Hantke, 2001). As such, in high iron concentrations, iron acquisition systems are inhibited by Fur, and excess iron is stored by the iron storage proteins (FtnA, FtnB, Bfr) (Andrews, 1998; Velayudhan *et al.*, 2007). Fur is well-characterized in *Escherichia coli* where it also represses the transcription of a small regulatory non-coding RNA (sRNA), RyhB (Masse & Gottesman, 2002). This sRNA is expressed in low iron conditions where the repression by Fur is inhibited (Masse & Gottesman, 2002). In general, RyhB targets are non-essential proteins that use iron for their function. By inhibiting the synthesis of these proteins, RyhB promotes availability of iron for essential iron-using proteins required for biological processes including respiration, the TCA cycle, oxygen transport, and DNA biosynthesis. Recently, it was shown that RyhB promotes synthesis of the siderophore enterobactin in *E. coli* K-12 (Salvail *et al.*, 2010).

*Salmonella enterica* is an important pathogen that causes diseases in animals and in humans. In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), Fur regulates systems implicated principally in iron acquisition, but also other genes involved in acid stress and adaptation, oxidative stress resistance and virulence. Indeed, Fur is important for the acid tolerance response (ATR) of *Salmonella* (Foster, 1991; Hall & Foster, 1996). Fur also plays a role in virulence of *S. Typhimurium*, as it is important for the establishment of a systemic infection in mice and some studies have showed that a *fur* mutant had a lower level of invasion in epithelial cells (Curtiss *et al.*, 2009; Garcia-del Portillo *et al.*, 1993; Riesenber-Wilmes *et al.*, 1996; Troxell *et al.*, 2011b; Velayudhan *et al.*, 2007). Recently, a link between Fur and the SPI-1 genes necessary for invasion has been demonstrated (Ellermeier & Slauch, 2008; Teixido *et al.*, 2011; Troxell *et al.*, 2011b). Many iron and *fur*-responsive elements were identified in *Salmonella* (Baumler *et al.*, 1996; Bjarnason *et al.*, 2003; Foster & Hall, 1992; Troxell *et al.*, 2011a; Tsolis *et al.*, 1995), but characterization of the regulators of iron homeostasis is missing.

Unlike *E. coli*, *Salmonella* possesses two sRNAs, RfrA (also called RyhB, RyhB-1) and RfrB (also called IsrE, RhyB-2), that are the ortholog and paralog of RyhB, respectively (Ellermeier & Slauch, 2008; Kim & Kwon, 2012; Ortega *et al.*, 2012; Padalon-Brauch *et al.*, 2008). *S. Typhi* *rfrA* and *rfrB* genes respectively share 81.1% and 70% identity with *E. coli* *ryhB* gene, and *rfrA* gene share 65.6% identity with *rfrB* gene. RfrB was identified in a study focused on the discovery of sRNAs present in genetic islands of *S. Typhimurium* (Padalon-Brauch *et al.*, 2008). This study showed that both sRNAs are regulated by iron and by Fur, but their expression differed considerably depending on the growth phase, the oxidative stress and iron levels in the medium, suggesting differences in their regulation (Padalon-Brauch *et al.*, 2008). RfrA and RfrB of *S. Typhimurium* are overexpressed in cultured murine macrophages (Padalon-Brauch *et al.*, 2008), but their role in virulence has not been reported. Recently, some targets regulated by these two sRNAs (RyhB-1 and RyhB-2) were identified in *S. Typhimurium* (Kim & Kwon, 2012). It was shown that both sRNAs are implicated in some cellular pathways, where differences in their functions showed that they do not act redundantly in most cases (Kim & Kwon, 2012). Also, RfrA and RfrB expression was shown to be induced inside fibroblast cells, and loss of these sRNAs increased intracellular bacterial growth (Ortega *et al.*, 2012). Since *Salmonella* possesses several virulence genes that are absent from *E. coli*, it is possible that Fur and sRNAs RfrA and RfrB regulate distinct genes that may contribute to virulence.

*Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) is a host-adapted serovar that is specific for humans and is the etiologic agent of typhoid fever. The crucial stages of infection by *S. Typhi* are the adherence and invasion of intestinal epithelial cells in Peyer's patches (M cells), and survival inside macrophages which leads to dissemination to the organs (liver, spleen and lymph nodes) and systemic infection. During the course of infection, *S. Typhi* encounters several environments and must use strategies to acquire iron for its growth and its multiplication. In this report, we investigated the importance of Fur and the sRNAs RfrA and RfrB of *S. Typhi* for growth, resistance to oxidative stress, and during interaction with host intestinal epithelial cells and macrophages.

## METHODS

### **Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions.**

Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Bacteria were routinely grown overnight with agitation in Luria–Bertani (LB) broth. For experiments depending on iron concentration, bacteria were grown overnight in M63 minimal medium (low iron) containing the following per liter: 5.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10.6 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , and 2.0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The pH was adjusted to 7.5 with KOH, and the medium was supplemented with 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 % casamino acids, 0.6 % (w/v) glucose, 40  $\mu\text{g}$  tryptophan  $\text{ml}^{-1}$  and 40  $\mu\text{g}$  cysteine  $\text{ml}^{-1}$ . The M63 minimal medium was inoculated with 1/100 dilution of an overnight culture grown in LB washed once in M63. High iron conditions were obtained by the addition of 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  to M63 medium. M63 medium was prepared in plastic bottles (polypropylene) to reduce trace contamination of iron and bacterial cultures were grown in disposable plastic tubes. When required, antibiotic was added at the following concentration: 50  $\mu\text{g}$  ampicillin  $\text{ml}^{-1}$ .

Growth curves of strains were assessed in low or high iron (M63 medium) in triplicate. Absorbance at 600 nm was measured each 30 minutes using a Bioscreen C Automated Microbiology Growth Curve Analysis System (Growth Curves USA).

### **Construction of *fur*, *rfrA* and *rfrB* mutant strains.**

Deletion of *fur*, *rfrA* or *rfrB* individually or in combination (*fur/rfrA*, *fur/rfrB*, *fur/rfrA/rfrB* and *rfrA/rfrB*) were generated by allelic exchange as described previously (Faucher *et al.*, 2009) using the overlap-extension PCR method (Basso *et al.*, 2002). Primers are listed in Table 2. Mutations were confirmed by PCR. We also confirmed that the deletion of each sRNA did not affect the expression of adjacent genes. Expression of genes adjacent to *rfrA* (STY4265 and STY4266) and *rfrB* (STY1846 and STY1848) was evaluated and confirmed by RT-PCR (data not shown). RNA was extracted from the wild-type and the *rfrA* or *rfrB* mutant strains grown in M63 medium, and reverse transcription of RNA in cDNA was done using Superscript II (Invitrogen). The PCR products were migrated in an 1.2 % agarose gel. Gene STY1848 was not expressed in the wild-type strain under any conditions tested.

### **Hydrogen peroxide sensitivity assay.**

Sensitivity of bacterial cultures to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was determined by using an agar overlay diffusion method on LB as described by Boyer *et al.* (Boyer *et al.*, 2002). Briefly, 100 µl of overnight cultures grown in LB broth was mixed with 3 ml molten top agar (0.5 % agar) and poured onto an LB agar plate. A filter paper disk (6-mm-diameter; Becton Dickinson) was placed in the centre of the plate and 10 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) was spotted onto the disk. The plates were incubated overnight at 37°C and the diameters of inhibition zones were measured. Results are expressed as the mean ± SEM of four experiments. The non-parametric Student's *t* test was used for statistical analysis.

### **CAS assays.**

Chrome azurol S (CAS) agar plates were used to determine production of siderophores (Schwyn & Neilands, 1987). Strains were grown overnight in LB with agitation at 37°C and 5 µl of each strain was spotted onto the CAS agar plates that were incubated at 37°C for 24 h.

### **qRT-PCR.**

RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) from bacteria grown in LB, in low and high iron conditions, and from infected cells (INT-407 or THP-1) at different times post-infection, as described previously (Faucher *et al.*, 2006). Primers used are listed in Table 2. qRT-PCR reactions were performed in a Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) by using the PerfeCTa SYBR Green SuperMix (Quanta Biosciences), according to the manufacturer's instructions. The transcriptional level of the different genes in each condition was normalized against 16S rRNA. For each condition, reverse transcription was done three times independently and a sample without Superscript II was used as a negative control. The relative amount of cDNA was calculated using the standard curve method. A standard curve was obtained from PCR on serially diluted genomic DNA as templates and was analyzed using Rotor-gene analysis software 6.0.

### **Transcriptional fusion and β-galactosidase assay.**

The *iroB* promoter region was amplified with *iroB* Fprom and *iroB* Rprom primers (Table 2). A 470 bp fragment digested with *Eco*RI and *Bam*HI was purified and ligated to pRS415 (Simons *et al.*, 1987), resulting in plasmid pSIF194. The *PiroB-lacZ* transcriptional fusion

construct include 438 bp upstream of *iroB* gene, and 32 bp after the start codon of the gene. This *PiroB-lacZ* construct was transformed into the different mutant strains of *S. Typhi* ISP1820 by electroporation. The expression of *iroB* was measured by  $\beta$ -galactosidase assays from cultures grown overnight (18 h) in low iron or high iron conditions.  $\beta$ -galactosidase activity was measured using *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as described previously (Miller, 1972). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three experiments done in triplicate. The non-parametric Student's *t* test was used for statistical analysis.

### **Interaction with epithelial cells.**

INT-407 (Henle) cells (ATCC CCL-6) were grown in minimal essential medium (Wisent) supplemented with 10 % (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Wisent) and 25 mM HEPES (Wisent). One day before infection, cells were seeded at  $2 \times 10^5$  cells per well in 24-well tissue-culture plates. One hour before infection, cells were washed with prewarmed PBS (pH 7.4), and fresh complete medium was added to each well. Bacteria were grown statically overnight in LB containing 0.3 M NaCl (SPI-1 inducing conditions) (Lee & Falkow, 1990) and added to each well at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 20:1. The 24-well plates were then centrifuged at  $800 \times g$  for 5 min to synchronize infection, incubated at 37 °C in 5% (v/v) CO<sub>2</sub> for 90 min and rinsed three times with PBS. Cells were either lysed by addition of 1 ml of 0.1 % (w/v) sodium deoxycholate in PBS (PBS-DOC) to evaluate the level of adherence or further incubated for 90 min with complete medium containing 100  $\mu$ g gentamicin ml<sup>-1</sup> (Wisent) to kill extracellular bacteria. Cells were then lysed as described above to determine the invasion level. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of at least three experiments done in duplicate. The non-parametric Student's *t* test was used for statistical analysis.

### **Infection of human cultured macrophages.**

The human monocyte cell line THP-1 (ATCC TIB-202) was maintained in RPMI 1640 (Wisent) containing 10 % (v/v) heat-inactivated FBS (Wisent), 1 mM sodium pyruvate (Wisent) and 1 % modified Eagle's medium (MEM) with non-essential amino acids (Wisent). A stock culture of these cells was maintained as monocyte-like, non-adherent cells at 37 °C in an atmosphere containing 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>. Macrophage infection was performed as described previously (Daigle *et al.*, 2001) unless specified. Briefly, bacteria were grown overnight

standing in LB, reaching usually an  $OD_{600}$  0.6. Bacteria were added to the cell monolayer at a m.o.i. of 10:1, and plates were centrifuged for 5 min at 800 g to synchronize bacterial uptake. After 20 min of incubation at 37 °C, extracellular bacteria were removed by washing cells three times with prewarmed PBS, and the infected monolayers were either lysed with PBS-DOC (T0) or incubated for 2 h with medium containing 100  $\mu\text{g}$  gentamicin  $\text{ml}^{-1}$  (Wisent) to kill extracellular bacteria, and then with 12  $\mu\text{g}$  gentamicin  $\text{ml}^{-1}$  for the remainder of the experiment. The number of surviving bacteria was determined as colony forming units (c.f.u.) by plating on LB agar. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of at least three experiments done in duplicate. The non-parametric Student's *t* test was used for statistical analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Growth of the mutant strains in high and low iron conditions.** To investigate if the deletion of the different genes encoding iron regulators *fur*, *rfrA* and *rfrB*, deleted singly or in combinations, affects the growth of *S. Typhi*, the growth kinetics of the mutant strains were tested in low (M63) or high iron conditions (M63 + 100  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>) (Fig. 1). The *fur* mutant exhibited a growth lag in logarithmic phase and overall decreased growth compared to the wild-type strain, either in low or high iron conditions (Fig. 1). The growth defect of the *fur* mutant was also observed on agar plates, where it formed smaller colonies than the wild-type (data not shown). The growth was restored to the wild-type level when the *fur* gene was introduced in trans on a low-copy plasmid (pWSK29*fur*) in the *fur* mutant. The growth defect observed in the *fur* mutant was not caused by an excess of iron, but by the expression of the sRNAs, as observed with the triple mutant (*fur/rfrA/rfrB*) that completely restored the growth of the *fur* mutant, either in low and high iron conditions. Indeed, the growth of the double mutant *fur/rfrB* was partially restored, while the growth of the double mutant *fur/rfrA* was similar to the wild-type strain. The presence of the sRNAs, mainly *rfrA*, seems to be responsible of the growth defect in the *fur* mutant. This also suggests a distinct role for each sRNA. Deletion of either *rfrA* or *rfrB* or both small RNA genes resulted in a growth curve similar to the wild-type strain, in either low or high iron conditions. These results are consistent with previous report in *S. Typhimurium* (Kim & Kwon, 2012). Overall, the growth profile of the mutants was similar between the high and low iron conditions except that the final growth level was lower in low iron conditions.

**Sensitivity of the mutant strains to oxidative stress.** We determined whether Fur and/or the sRNAs RfrA and/or RfrB contribute to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) resistance in *S. Typhi*, as deregulation of iron homeostasis was previously shown to increase sensitivity to various oxidative agents, including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in other bacteria (Andrews *et al.*, 2003; Touati *et al.*, 1995). The abilities of the wild-type, and the different mutant strains to resist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were compared (Fig. 2). The *fur* mutant was significantly more sensitive than the isogenic parental strain. Interestingly, the strains harboring deletion of *fur* and one of the sRNA (*fur/rfrA* and *fur/rfrB*) were also significantly more sensitive than the wild-type strain, but were less sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than the *fur* mutant. When both sRNAs were deleted in the *fur* mutant (*fur/rfrA/rfrB*), the

ability to resist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was restored to a level similar of the wild-type strain. The strains harboring deletion of either one or both of the sRNA tolerated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the same level as the wild-type strain (Fig. 2).

Once more, we demonstrated that the sRNAs RfrA and RfrB were responsible for sensitivity of the *fur* mutant to oxidative stress, because the double and triple mutants (*fur/rfrA*, *fur/rfrB* and *fur/rfrA/rfrB*) were less sensitive to hydrogen peroxide than the *fur* mutant. This may be due to the fact that in the *S. Typhi fur* mutant, both sRNAs RfrA and RfrB are expressed, which could lead to an increased level of free intracellular iron and an inhibition of different proteins required in response to oxidative stress, as observed in *E. coli* (Jacques *et al.*, 2006; Masse *et al.*, 2005). We could interpret the intermediate level of sensitivity of the double mutants (*fur/rfrA* and *fur/rfrB*) as both sRNA work additively, an observation that is reinforced by a regain in resistance of the *fur* mutant after loss of both of these sRNAs. In *S. Typhimurium*, similar results were shown, but only the *fur/ryhB-1 (fur/rfrA)* mutant showed significantly higher resistance compared to the *fur* mutant, but not the *fur/ryhB-2 (fur/rfrB)* and the triple mutant (Kim & Kwon, 2012). This suggests that some differences in the role of the sRNAs may exist between these two serovars.

**Siderophore production.** In order to assess the impact of deletion of the *fur*, *rfrA* and *rfrB* regulatory genes on siderophore production (enterobactin and/or salmochelin), strains were grown on CAS indicator plates (Fig. 3). All the strains lacking the *fur* gene produced more siderophore than the wild-type strain (WT < *fur* < *fur/rfrA*; *fur/rfrB* < *fur/rfrA/rfrB*). This suggests that expression of the sRNAs is deleterious for siderophore production. It is interesting to observe that siderophore production is different if one or both sRNAs were absent, suggesting again that the sRNAs are not redundant. Siderophores were produced at levels similar to the wild-type level when the *fur* mutant was complemented. Nevertheless, strains harboring one or both sRNAs deletions (*rfrA*, *rfrB* and *rfrA/rfrB*) were similar to the wild-type strain. This could be explained by the iron content of the CAS agar plates (10μM), that was high enough to activate Fur and to trigger Fur-mediated repression of the sRNAs. The highest production of siderophore observed in the triple mutant is consistent with results in *E. coli*, where in minimal medium containing 1 μM or more of iron, production of siderophore is

higher in the double *fur/ryhB* mutant than in the wild-type and the *fur* mutant strains (Salvail *et al.*, 2010).

**Salmochelin expression.** In high iron conditions, Fur is known to repress the transcription of genes encoding iron uptake systems and siderophores. To verify if the *S. Typhi* siderophore salmochelin was regulated by Fur and/or by the sRNA RfrA and RfrB, a transcriptional fusion between the *iroB* promoter, the first gene of the *iroBCDE* operon mediating production of salmochelin, and the *lacZ* reporter gene was constructed in plasmid pRS415 and introduced to the different mutant strains. Beta-galactosidase activity was measured for each strain grown overnight (18 h) in low or high iron conditions (Fig. 4). As expected, the transcription of *iroB* was 10-fold higher when grown in low iron conditions compared to growth in high iron conditions. The transcription of *iroB* was also 10-fold higher in all strains harboring a *fur* deletion compared to the wild-type strain, in high iron conditions. When grown in low iron, expression of *iroB* was higher in the *rfrA* mutant and in the double *fur/rfrA* mutant and significantly higher in the triple mutant compared to the *fur* mutant (Fig. 4). Interestingly, transcription of *iroB* was significantly lower in the *rfrB* mutant compared to wild-type and significantly different between the *rfrA* and the *rfrB* mutants. These results suggest that the sRNAs slightly affected the expression of *iroB*, with higher transcription in the *rfrA* mutant under low iron conditions, compared to the *rfrB* mutant. RfrB must play only a little role in the regulation of salmochelin production, and these data revealed another difference between the two sRNAs. These data showed that the transcription of *iroB* is regulated by iron and by Fur, and that each of the sRNAs had a distinct influence of the expression of *iroB*.

**Expression of iron regulator genes.** The transcription level of *fur*, *rfrA* and *rfrB* was measured by qRT-PCR from bacteria grown in different conditions and from bacteria harboring different deletions (*fur*, *rfrA*, *rfrB*, *rfrA/rfrB*) (Fig. 5). *fur* was significantly more expressed in high iron conditions and when one or both of the small RNAs were deleted (Fig. 5a), but *fur* expression depend on iron concentration in these mutants. Indeed, in high iron conditions, *fur* expression was increased in the *rfrA* and *rfrA/rfrB* mutants whereas it was expressed at a similar level to the wild-type strain in the *rfrB* mutant. By contrast, in low iron conditions, *fur* was higher in the in the *rfrB* mutant than in the *rfrA* and *rfrA/rfrB* mutants or the wild-type strain. Once more it is suggesting a different role for each sRNA. Thus, Fur

expression was always higher when a sRNA was deleted, an observation consistent with the role of *E. coli* RyhB to inhibit the translation of *fur* (Vecerek *et al.*, 2007). The highest expression of *fur* was observed during interaction with host cells (Fig. 5a). Overall, the expression of *fur* was lower than the expression of the housekeeping gene 16S.

The expression of *S. Typhi* sRNAs *rfrA* and *rfrB* was also evaluated (Fig. 5b and 5c). In contrast to *fur*, the sRNAs *rfrA* and *rfrB* were induced in low iron conditions, where the regulator Fur is inactive. *rfrA* was expressed similarly to the wild-type strain when *rfrB* was missing, but *rfrB* was slightly more expressed when *rfrA* was absent. Expression of each sRNA was also induced when *fur* was deleted, confirming the role of Fur as a repressor for both of these small RNAs. The promoter region of *rfrA* and *rfrB* are conserved between *S. Typhi* and *S. Typhimurium*, and each sRNA possesses a Fur box (Padalon-Brauch *et al.*, 2008). Expression of sRNAs during interaction with cells was higher than in high iron conditions for *rfrA* but similar for *rfrB*. Overall, *rfrB* was more expressed *in vitro* than *rfrA*, but their expression during cell interaction was similar.

**Interaction with epithelial cells.** The role of *S. Typhi* Fur and the sRNAs RfrA and RfrB during interaction with epithelial cells was evaluated. The *invA* mutant that impeded the invasive phenotype was used as a control (Galán & Curtiss, 1989). A slightly lower level of adhesion (90 min) of INT-407 cells was observed for the *fur* mutant or *fur* mutants lacking one of the two sRNAs (*fur/rfrA* and *fur/rfrB*), when compared to the wild-type strain (Fig. 6a). In contrast, invasion (180 min) was significantly reduced for all strains harboring a *fur* mutation (single or in combination) and for the *invA* mutant (Fig. 6a). Indeed, a two log decrease in invasion was observed for these mutants. Complementation of *fur* on a low-copy plasmid in the *fur* mutant completely restored the adherence phenotype to the wild-type level, but partially restored the phenotype of invasion. The invasion defect of the *fur* mutants was similar to the SPI-1 mutant *invA*. Implication of Fur in invasion of epithelial cells is known in *S. Typhimurium* (Garcia-del Portillo *et al.*, 1993; Riesenber-Wilmes *et al.*, 1996). Recently, Fur was shown to be involved in regulation of genes encoding regulators of the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1), a group of genes encoding all the machinery of a T3SS essential to the invasion of epithelial cells. Fur positively regulates HilA, the master regulator of SPI-1, via HilD (Ellermeier & Slauch, 2008; Teixido *et al.*, 2011) or via the repression of

the histone-like protein H-NS (Troxell *et al.*, 2011b). qPCR data confirm that *hilA* expression was lower in the *S. Typhi fur* mutant in SPI-1 inducing condition (data not shown). The invasion defect of the *fur* mutant could therefore be explained by the inhibition of the SPI-1 expression. It is interesting to observe that Fur seems to act earlier than the SPI-1 genes, because the *fur* mutant showed a slightly lower level of interaction with INT-407 cells at 90 min, contrarily to the SPI-1 mutant *invA* mutant. The varying growth rate of the *fur* mutants could also partially explained the invasion phenotype of these strains.

The strains lacking sRNAs showed a similar level of adhesion and invasion compared to the wild-type strain. The role of the sRNAs in interaction with epithelial cells did not reveal any significant implication of RfrA and RfrB in adhesion to and in invasion of these cells which correlated with previous data that shown that RfrA and RfrB were not implicated in the regulation of *hilA* in *S. Typhimurium* (Ellermeier & Slauch, 2008). Interestingly, when RfrA was expressed (*fur* and *fur/rfrB* mutants), the level of bacteria inside the cells (180 min) was significantly lower than when it was absent (*fur/rfrA* and *fur/rfrA/rfrB* mutants), showing differences in the implication of the sRNAs in the invasion of *S. Typhi* in epithelial cells.

**Interaction with macrophages.** In order to evaluate bacterial uptake, survival and proliferation within macrophages, THP-1 macrophages were infected with the wild-type strain and the isogenic mutants using a gentamicin protection assay. The number of bacteria present at different times was determined by viable counts. All mutants carrying a *fur* deletion (single or in combination with sRNAs) were significantly defective in uptake by macrophages compared to the wild-type strain (Fig. 6b). Unlike the wild-type strain, the number of bacteria decreased at 2 h post-infection in these mutants. They were still able to proliferate inside macrophages at 24 h post-infection, but they never reached the level of the wild-type strain. Complementation of *fur* on a low-copy plasmid in the *fur* mutant completely restored the uptake and survival in macrophages to the wild-type level. The fact that presence of Fur facilitates macrophage uptake is novel. The defect of phagocytosis is not linked to a lower expression of the SPI-1 genes in a *fur* mutant, as SPI-1 mutant had no uptake defect in macrophages. These observations suggest that Fur in *S. Typhi* is crucial for the survival and replication inside human macrophages. That could be explained by the numerous defects of the *fur* mutant, such as increased sensitivity to oxidative and acid stresses encountered inside

these cells, along with its *in vitro* growth defect. However, these defects were shown to be caused principally by the expression of the sRNAs RfrA and RfrB, since the triple mutant restored the phenotype of growth and resistance to hydrogen peroxide. However, since the triple mutant demonstrated the same intracellular phenotypes as the *fur* mutant, other factors than the poor resistance of different stress of the *fur* mutant are responsible for these defects in intracellular replication and survival. It was previously shown that a *S. Typhimurium fur* mutant did not have a survival defect in murine macrophages (Garcia-del Portillo *et al.*, 1993), so it is possible that Fur has different impact in virulence between these two serovars. However, Fur is required for the virulence of *S. Typhimurium* in mice (Curtiss *et al.*, 2009; Garcia-del Portillo *et al.*, 1993; Riesenber-Wilmes *et al.*, 1996; Troxell *et al.*, 2011b; Velayudhan *et al.*, 2007).

The deletion of sRNA *rfrA* or *rfrB* did not affect bacterial uptake, survival or replication, as the number of bacteria recovered at different times post-infection was similar to the wild-type strain (Fig. 6b). However, the deletion of both sRNAs (*rfrA/rfrB*) resulted in a significantly lower number of bacteria recovered at 24 h post-infection compared to the wild-type (Fig. 6b), suggesting a complementary role for intracellular replication. Interaction with macrophages also showed that the *fur/rfrB* mutant had a significantly lower level of replication after 24 h than the *fur/rfrA* and *fur/rfrA/rfrB* mutants. On one hand, both sRNAs have to be deleted to affect the survival level, and on the other hand, there is a difference between the two sRNAs for their impact on survival. These observations could be explained by the fact that both sRNAs are important for survival, but RfrB is perhaps more implicated than RfrA. In *S. Typhimurium*, RfrA and RfrB are expressed inside murine macrophages at 8 h post-infection and they are induced inside fibroblasts (Ortega *et al.*, 2012; Padalon-Brauch *et al.*, 2008). RfrA and RfrB were induced inside THP-1 macrophages at 24 h post-infection, and this is the first time that this intracellular macrophage expression is linked to the importance of these two sRNAs in intracellular replication.

To summarize, Fur represses expression of sRNAs RfrA and RfrB, a repression that is important for the optimal growth of *S. Typhi* and resistance to hydrogen peroxide. *S. Typhi* siderophore expression and production are under iron and Fur regulation, and the sRNAs have a minor role in this regulation. It is not known yet if they directly regulate expression of

*Salmonella* siderophores, or if variation in expression and production of siderophores in the double (*fur/rfrA* and *fur/rfrB*) and triple (*fur/rfrA/rfrB*) mutants were only due to the deregulation of iron homeostasis. *fur* is expressed under high iron conditions and its expression is repressed by RfrA and RfrB. Inversely, the sRNAs are expressed under low iron conditions and their expression is repressed by Fur. The highest expression of these iron regulators was obtained during interaction with host cells, which correlates with their role in virulence. Indeed, Fur is required for invasion of epithelial cells and for uptake and survival inside human macrophages. RfrA and RfrB are not implicated during epithelial cell infection, where only minor phenotypes were observed. Interestingly, both sRNAs are required for an optimal replication inside human macrophages. These results showed that the iron regulators are important for iron homeostasis of *S. Typhi*, but also for diverse functions including optimal growth, resistance to oxidative stress and interaction with host cells. Interestingly, sRNAs RfrA and RfrB share some characteristics and functions, but in most experiments specific mutants showed distinct phenotypes, suggesting a non-redundant role for these sRNAs.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was supported by the Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) grant number 251114-12. J.-M. L. was supported by a scholarship from the NSERC.

## REFERENCES

- Andrews, S. C. (1998). Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol* **40**, 281-351.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215-237.
- Basso, H., Rharbaoui, F., Staendner, L. H., Medina, E., García-Del Portillo, F. & Guzmán, C. A. (2002). Characterization of a novel intracellularly activated gene from *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* **70**, 5404-5411.
- Baumler, A. J., Tsolis, R. M., van der Velden, A. W., Stojiljkovic, I., Anic, S. & Heffron, F. (1996). Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Gene* **183**, 207-213.
- Bjarnason, J., Southward, C. M. & Surette, M. G. (2003). Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol* **185**, 4973-4982.
- Boyer, E., Bergevin, I., Malo, D., Gros, P. & Cellier, M. F. (2002). Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **70**, 6032-6042.
- Curtiss, R., 3rd, Wanda, S. Y., Gunn, B. M., Zhang, X., Tinge, S. A., Ananthnarayan, V., Mo, H., Wang, S. & Kong, W. (2009). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect Immun* **77**, 1071-1082.
- Daigle, F., Graham, J. & Curtiss, R. 3rd. (2001). Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol Microbiol* **41**, 1211-1222.
- Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2008). Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through Hild. *J Bacteriol* **190**, 476-486.
- Ernst, J. F., Bennett, R. L. & Rothfield, L. I. (1978). Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **135**, 928-934.
- Faucher, S., Forest, C., Béland, M. & Daigle, F. (2009). A novel PhoP-regulated locus encoding the cytolysin ClyA and the secreted invasin TaiA of *Salmonella enterica* serovar Typhi is involved in virulence. *Microbiology* **155**, 477-488.
- Faucher, S., Porwollik, S., Dozois, C., McClelland, M. & Daigle, F. (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.
- Foster, J. & Hall, H. (1992). Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J Bacteriol* **174**, 4317-4323.

- Foster, J. W. (1991).** *Salmonella* shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J Bacteriol* **173**, 6896-6902.
- Galán, J. & Curtiss, R. 3rd. (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.
- Garcia-del Portillo, F., Foster, J. W. & Finlay, B. B. (1993).** Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* **61**, 4489-4492.
- Hall, H. K. & Foster, J. W. (1996).** The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol* **178**, 5683-5691.
- Hantke, K. (2001).** Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 172-177.
- Jacques, J. F., Jang, S., Prevost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J. & Masse, E. (2006).** RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**, 1181-1190.
- Kaniga, K., Compton, M., Curtiss, R. 3rd. & Sundaram, P. (1998).** Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* **66**, 5599-5606.
- Kim, J. N. & Kwon, Y. M. (2012).** Genetic and phenotypic characterization of the RyhB regulon in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol Res*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.007>.
- Lee, C. A. & Falkow, S. (1990).** The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4304-4308.
- Masse, E. & Gottesman, S. (2002).** A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4620-4625.
- Masse, E., Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. (2005).** Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 6962-6971.
- Miller, J. H. (1972).** *Experiments in Molecular Genetics*. NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ortega, A., Gonzalo-Asensio, J. & Garcia-Del Portillo, F. (2012).** Dynamics of *Salmonella* small RNA expression in non-growing bacteria located inside eukaryotic cells. *RNA Biol* **9**, 469-488.
- Padalon-Brauch, G., Hershberg, R., Elgrably-Weiss, M., Baruch, K., Rosenshine, I., Margalit, H. & Altuvia, S. (2008).** Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res* **36**, 1913-1927.

- Riesenberg-Wilmes, M. R., Bearson, B., Foster, J. W. & Curtis, R., 3rd (1996).** Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**, 1085-1092.
- Salvail, H., Lanthier-Bourbonnais, P., Sobota, J. M., Caza, M., Benjamin, J. A., Mendieta, M. E., Lepine, F., Dozois, C. M., Imlay, J. & other authors (2010).** A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15223-15228.
- Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**, 47-56.
- Simons, R. W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987).** Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85-96.
- Teixido, L., Carrasco, B., Alonso, J. C., Barbe, J. & Campoy, S. (2011).** Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator *in vivo* and *in vitro*. *PloS One* **6**, e19711.
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L. & Despied, S. (1995).** Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta *fur* mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol* **177**, 2305-2314.
- Troxell, B., Fink, R. C., Porwollik, S., McClelland, M. & Hassan, H. M. (2011a).** The Fur regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: identification of new Fur targets. *BMC Microbiol* **11**, 236.
- Troxell, B., Sikes, M. L., Fink, R. C., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J. & Hassan, H. M. (2011b).** Fur negatively regulates *hns* and is required for the expression of Hila and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **193**, 497-505.
- Tsolis, R., Bäumler, A., Stojiljkovic, I. & Heffron, F. (1995).** Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J Bacteriol* **177**, 4628-4637.
- Vecerek, B., Moll, I. & Blasi, U. (2007).** Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *Embo J* **26**, 965-975.
- Velayudhan, J., Castor, M., Richardson, A., Main-Hester, K. L. & Fang, F. C. (2007).** The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Mol Microbiol* **63**, 1495-1507.
- Wang, R. F. & Kushner, S. R. (1991).** Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**, 195-199.

## TABLES AND FIGURES

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Characteristic	Source or reference
<b>Strains</b>		
<b><i>S. Typhi</i></b>		
ISP1820 / (WT)	Wild-type	R. Curtiss III, ASU
DEF147 / ( <i>invA</i> )	ISP1820 $\Delta$ <i>invA</i>	(Faucher <i>et al.</i> , 2009)
DEF490 / ( <i>fur</i> )	ISP1820 $\Delta$ <i>fur</i>	This study
DEF518 / ( <i>fur</i> (pWSK29 <i>fur</i> ))	DEF490 (pSIF150)	This study
DEF537 / ( <i>rfrA</i> )	ISP1820 $\Delta$ <i>rfrA</i>	This study
DEF539 / ( <i>fur/rfrA</i> )	ISP1820 $\Delta$ <i>fur</i> $\Delta$ <i>rfrA</i>	This study
DEF576 / ( <i>rfrB</i> )	ISP1820 $\Delta$ <i>rfrB</i>	This study
DEF577 / ( <i>rfrA/rfrB</i> )	ISP1820 $\Delta$ <i>rfrA</i> $\Delta$ <i>rfrB</i>	This study
DEF578 / ( <i>fur/rfrB</i> )	ISP1820 $\Delta$ <i>fur</i> $\Delta$ <i>rfrB</i>	This study
DEF579 / ( <i>fur/rfrA/rfrB</i> )	ISP1820 $\Delta$ <i>fur</i> $\Delta$ <i>rfrA</i> $\Delta$ <i>rfrB</i>	This study
DEF613 / (WT ( <i>PiroB</i> ))	ISP1820 (pSIF194)	This study
DEF614 / ( <i>rfrA</i> ( <i>PiroB</i> ))	DEF537 (pSIF194)	This study
DEF615 / ( <i>rfrB</i> ( <i>PiroB</i> ))	DEF576 (pSIF194)	This study
DEF616 / ( <i>rfrA/rfrB</i> ( <i>PiroB</i> ))	DEF577 (pSIF194)	This study
DEF617 / ( <i>fur</i> ( <i>PiroB</i> ))	DEF490 (pSIF194)	This study
DEF618 / ( <i>fur/rfrA</i> ( <i>PiroB</i> ))	DEF539 (pSIF194)	This study
DEF619 / ( <i>fur/rfrB</i> ( <i>PiroB</i> ))	DEF578 (pSIF194)	This study
DEF620 / ( <i>fur/rfrA/rfrB</i> ( <i>PiroB</i> ))	DEF579 (pSIF194)	This study
<b><i>E. coli</i></b>		
MGN-617	SM10 $\lambda$ pir <i>asd thi thr leu tonA lacY supE recA</i> RP4 2-Tc : :Mu[ $\lambda$ pir] <i>asdA4</i>	(Kaniga <i>et al.</i> , 1998)
<b>Plasmids</b>		
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K</i> , Cm <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	R. Curtiss III, ASU
pRS415	Multicopy vector with a promoterless reporter gene <i>lacZ</i> , Amp <sup>r</sup>	(Simons <i>et al.</i> , 1987)
pSIF072	pMEG-375 with flanking region of <i>invA</i> used for <i>invA</i> deletion	(Faucher <i>et al.</i> , 2009)
pSIF130	pMEG-375 with flanking region of <i>fur</i> used for <i>fur</i> deletion	This study

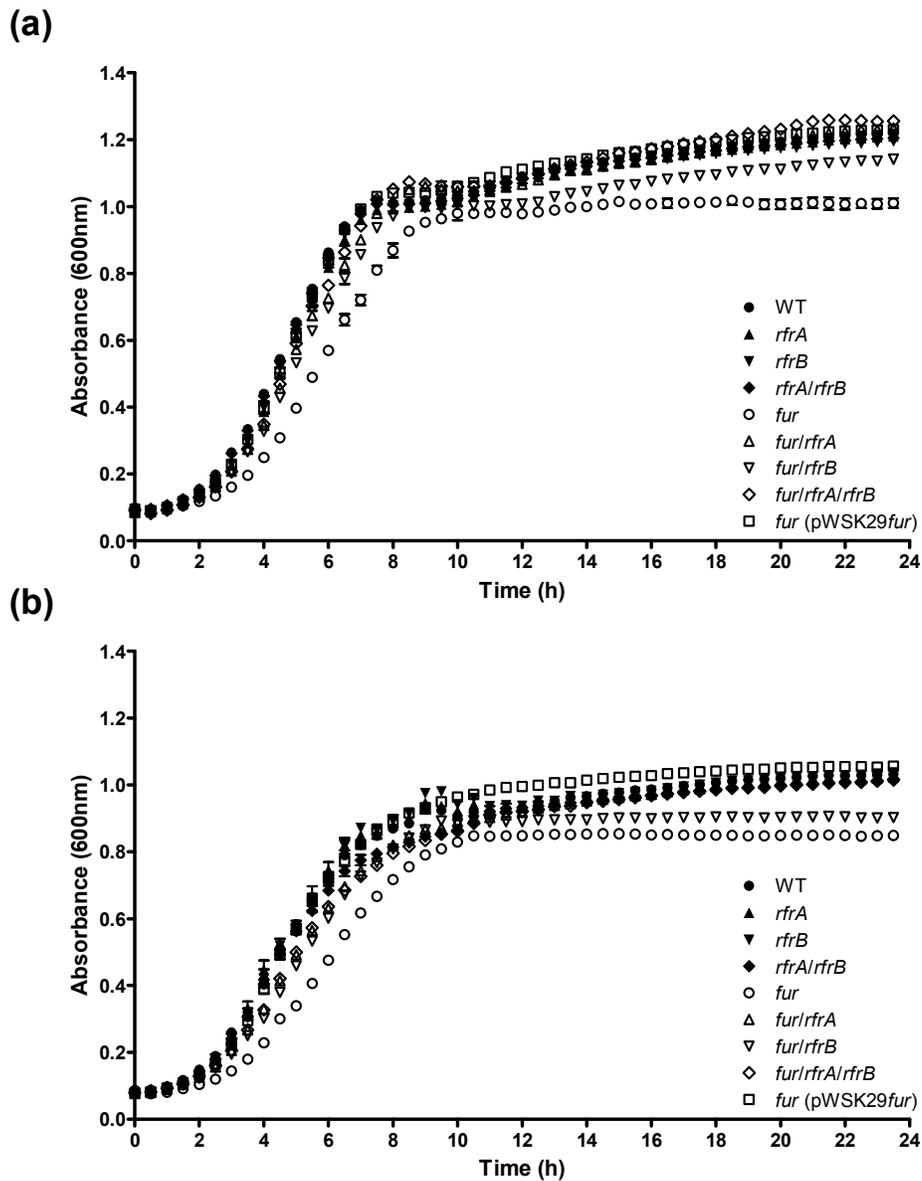
pSIF150	pWSK29 carrying a 1-kb fragment of <i>fur</i>	This study
pSIF154	pMEG-375 with flanking region of <i>rfrA</i> used for <i>rfrA</i> deletion	This study
pSIF191	pMEG-375 with flanking region of <i>rfrB</i> used for <i>rfrB</i> deletion	This study
pSIF194	pRS415 carrying a 470-bp fragment of the promoter region of <i>iroB</i>	This study
pWSK29	Low copy number cloning vector, Amp <sup>r</sup>	(Wang & Kushner, 1991)

**Table 2.** Primers used in this study

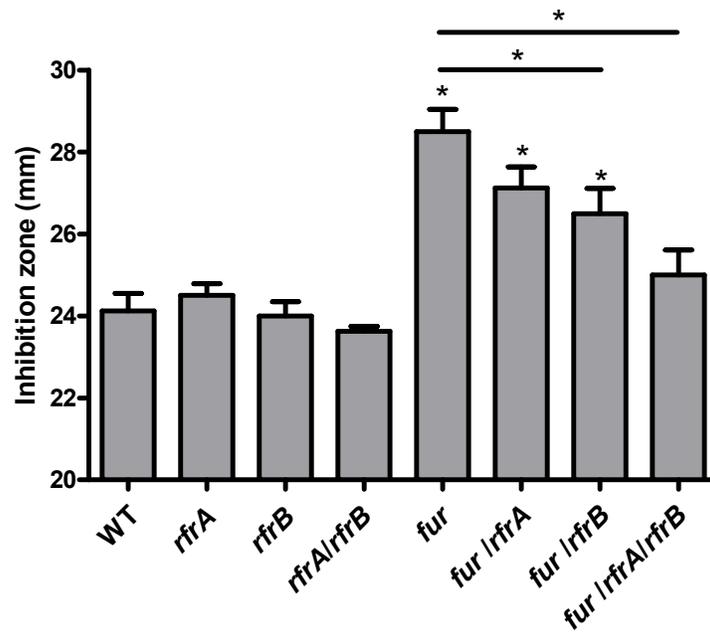
Primer	Sequence (5'–3')*
<i>rfrA</i> -F	CGGGATCCCGTTGGGTGACCTGAATAG
<i>rfrA</i> -Rover	GCTGAAACAGCGGTTGACGGAATTTTCT
<i>rfrA</i> -Fover	GTCAACCGCTGTTTCAGCCTGGCTTACT
<i>rfrA</i> -R	GCTCTAGAGCGACATGCCAGGTATCTT
<i>rfrB</i> -F	CGGGATCCATTGTGGCTGTTTACCGT
<i>rfrB</i> -Rover	TTGCCGTTATGCTATCTATCCCATATCG
<i>rfrB</i> -Fover	TAGATAGCATAACGGCAAATAAACCGCT
<i>rfrB</i> -R	GCTCTAGAGCTGGGGGTTTTCCATAGA
<i>fur</i> -F	CGGGATCCCGACATCCTCAACGCCTAA
<i>fur</i> -Rover	GTCATCGTGGCGGAATCTGTCCTGTTG
<i>fur</i> -Fover	AGATTCCGCCACGATGACGCGACTAAA
<i>fur</i> -R	GCTCTAGAGCCTGTGAATAAAAGGCCAG
<i>invA</i> -BF	CGGGATCCCCTACAAGCATGAAATGGCAGAAC
<i>invA</i> -BR	AGGACAAGACTTCAATCAAGATAAGACGGCTGG
<i>invA</i> -EF	TGATTGAAGTCTTGTCCCTTACGTCTGTCTG
<i>invA</i> -ER	GCTCTAGACGCCAGATCCATACATCATCG
<i>iroB</i> -Fprom	CGGAATTCATAGTCCAGGTTTCGCAGGTG
<i>iroB</i> -Rprom	CGGGATCCCTACAGTGGTGGACCGACAAA
Salm16s-F	CGGGGAGGAAGGTGTTGTG
Salm16s-R	CAGCCCGGGGATTCACATC
<i>rfrA</i> F qPCR	GGAACCCCTACGGATAAC
<i>rfrB</i> F qPCR	TACCGAGTGGTTGAGTTTATAAC
<i>rfrAB</i> R qPCR	CTGGAAGCAATGTGAGC
<i>fur</i> F qPCR	AACTGACGCAACAGCATCATCACG
<i>fur</i> R qPCR	TACCGTGTTCGCCGCAATTCAC
<i>hilA</i> F qPCR	AGTTGGAGGAGGCCTTACAAAGGA
<i>hilA</i> R qPCR	GTAATCCACAGCTTAGTGATCCCTGC
STY4265 F qPCR	CGTCGAGCGTATTGAGTTAACGGT
STY4265 R qPCR	ACGCGCGCCATAAAGTACGTATCA
STY4266 F (new)	ATTATTTTCGCTATTTGGCCGCCCCG
STY4266 R (new)	ATTGCGCTTCAAAGGTGTCATCCG
STY1846 F qPCR	AGATGGCGGCGGATTCTTTATGAC
STY1846 R qPCR	GACTGCAAAGCTGCCGAAGTTGAA
STY1848 F qPCR	TTTGCCGGGCTACGTAAGGAGATT

STY1848 R qPCR ATGGAGGAATATCGGCGACAACCA

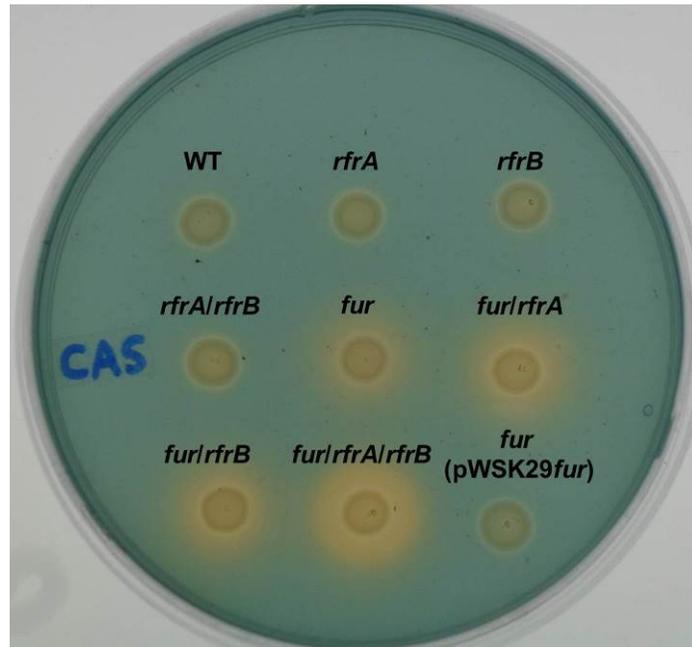
\*Restriction enzyme sites are underlined. Letters in italics denote overlapping sequences.



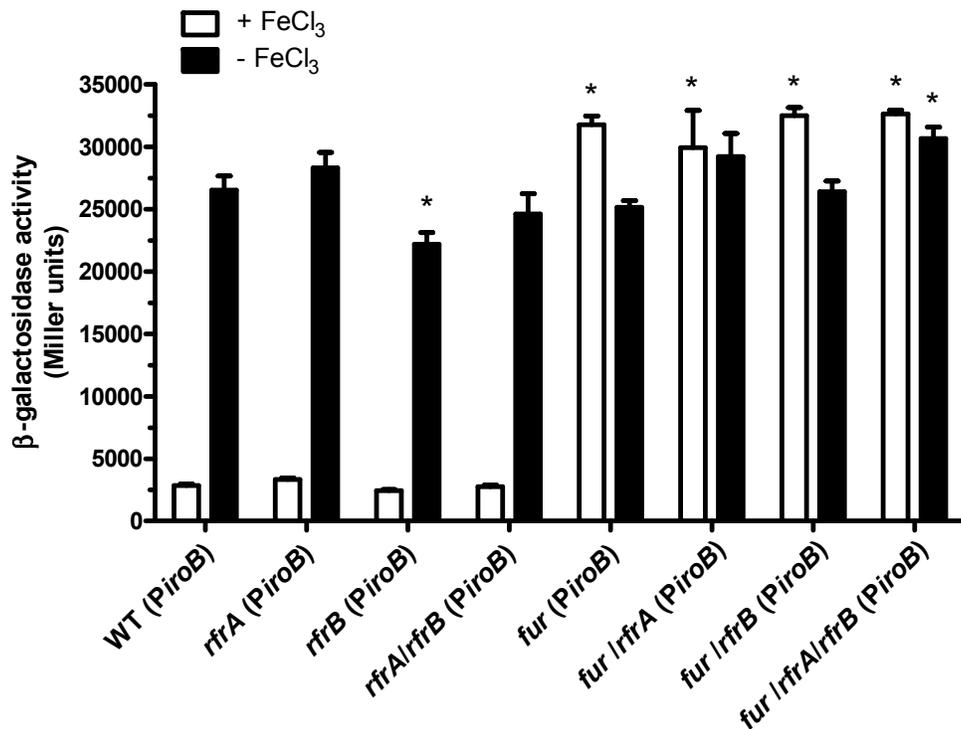
**Figure 1.** Growth curves of *S. Typhi* wild-type strain ISP1820, isogenic mutants and *fur* complemented strain in (a) high iron (M63 + 100  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>) and (b) low iron (M63) conditions. Absorbance at 600 nm was measured each 30 minutes using a Bioscreen C Automated Microbiology Growth Curve Analysis System. Growth curves of strains were assessed in triplicate and the results represent the means  $\pm$  SEM.



**Figure 2.** Sensitivity of wild-type strain ISP1820 and isogenic mutants to 30 % hydrogen peroxide was measured by the growth inhibition zone. The results represent the means  $\pm$  SEM of four experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) between the mutants and the wild-type strain or between different mutants of *S. Typhi* are indicated by asterisks.

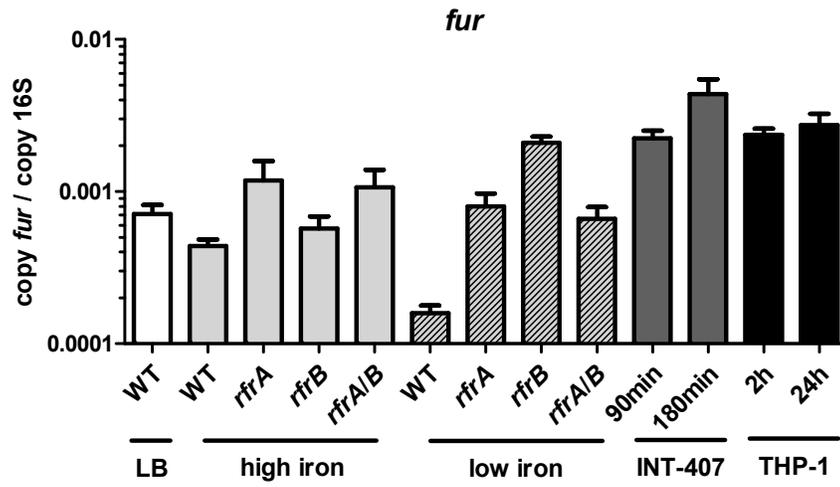


**Figure 3.** Siderophore production of *S. Typhi* ISP1820 wild-type strain, the isogenic mutants and *fur* complemented strain grown on CAS agar.

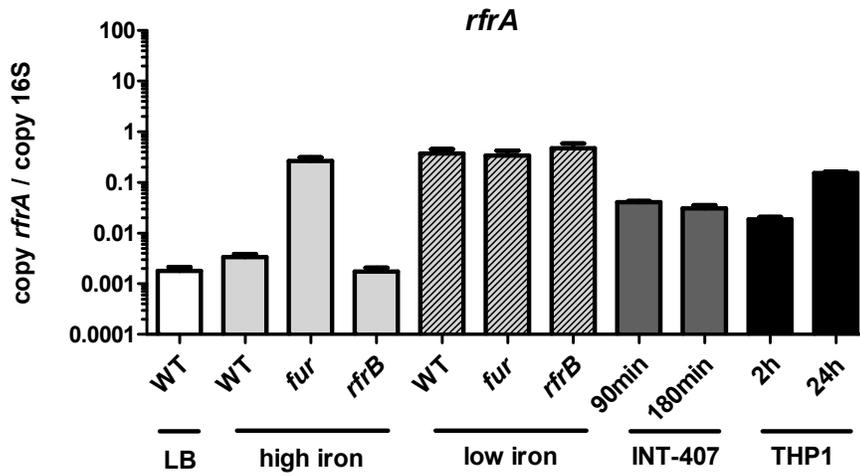


**Figure 4.** Salmochelin gene expression.  $\beta$ -galactosidase activity was expressed from the transcriptional fusion between *iroB* promoter and *lacZ* gene in *S. Typhi* (WT *PiroB*) and the isogenic mutants.  $\beta$ -galactosidase activity was measured in strains grown overnight (18 h) in high and low iron conditions. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three experiments done in triplicate. Significant differences ( $P < 0.05$ ) in  $\beta$ -galactosidase activity between the mutants and the wild-type strain of *S. Typhi* are indicated by asterisks.

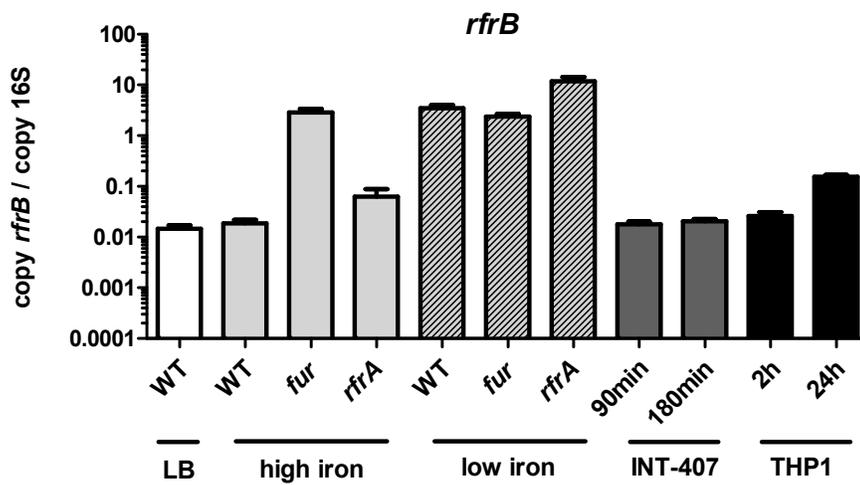
(a)



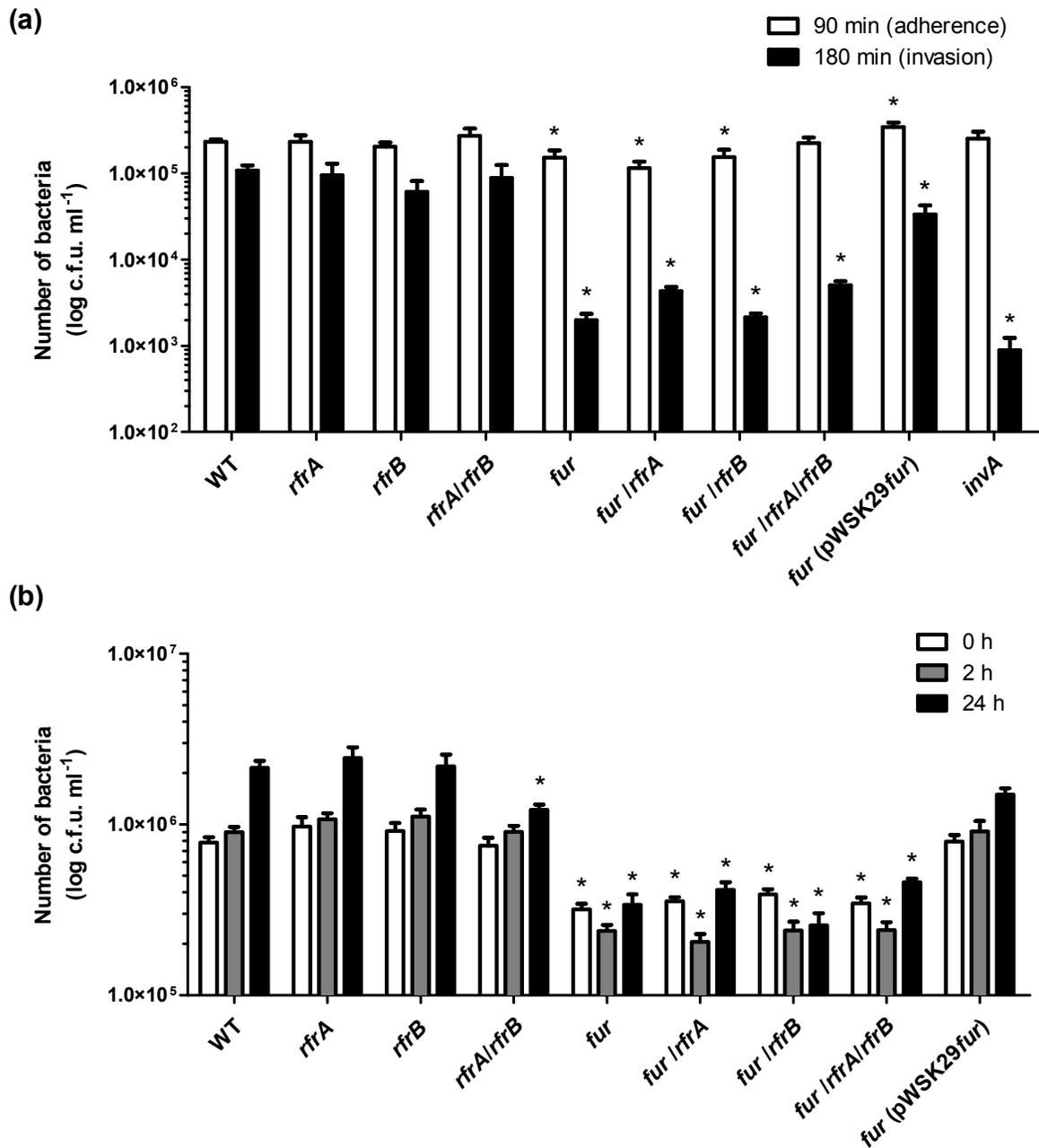
(b)



(c)



**Figure 5.** Expression of the regulatory genes *fur*, *rfrA* and *rfrB*. Real-Time qPCR of (a) *fur*, (b) *rfrA* and (c) *rfrB* genes were done on cDNA of wild-type and the different regulator mutants grown in different *in vitro* conditions (rich (LB) and minimal (high and low iron) medium) and during interaction with host cells (INT-407 and THP-1) at different times of infection. The transcriptional level of the different genes in each condition was normalized against 16S rRNA. The relative amount of cDNA was calculated using the standard curve method and the results are expressed as the rate of number of copy of the gene (*fur*, *rfrA* or *rfrB*) on the number of copy of 16S rRNA. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the experiments done in triplicate.



**Figure 6.** Role of the regulators Fur and RfrA/RfrB during interaction with human cells. Human cells were infected with *S. Typhi* wild-type strain, the isogenic mutants, *fur* complemented strain and the SPI-1 mutant *invA*. The number of bacteria (c.f.u. ml<sup>-1</sup>) associated with cells was determined upon (a) adherence (90 min) and invasion (180 min) with

INT-407 epithelial cells and upon (b) uptake (0 h) and during survival (2 h and 24 h) with THP-1 human macrophages. All assays were conducted in duplicate and repeated independently at least three times. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the replicate experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) between the mutants or the *fur* (pWSK29*fur*) complemented strains and the wild-type strain of *S. Typhi* are indicated by asterisks.

## Préface au Chapitre 3

La seconde étape de ce projet consistait à comparer l'effet d'une délétion du gène *fur* dans la physiologie et la virulence de *S. Typhi* et *S. Typhimurium* afin de vérifier si ce régulateur affecte différemment ces deux bactéries apparentées mais responsables de maladies différentes chez l'homme. Pour y parvenir, les phénotypes du mutant *fur* de chaque sérovar ont été déterminés à l'aide de diverses expériences permettant de comparer le rôle de ce régulateur dans l'homéostasie du fer et la virulence des sérovares Typhi et Typhimurium. La croissance, la morphologie, le niveau de motilité, l'interaction avec les macrophages humains ainsi que la production de sidérophores ont été évalués. Cet article sera soumis à un processus de révision par les pairs prochainement dans le but de le publier dans le journal « Microbiology ».

**Article 2 : Leclerc, J. M., Dozois, C. M. and F. Daigle.** Loss of the Fur regulator results in distinct phenotypes for *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi.

### Contribution des auteurs :

Le projet a été élaboré par France Daigle, Charles Dozois et moi-même. Je suis le seul auteur ayant réalisé les diverses expérimentations. En tant que premier auteur, j'ai contribué de façon majoritaire à l'analyse des résultats et à l'écriture du manuscrit, avec les commentaires de France Daigle et de Charles M. Dozois. Tous les coauteurs ont révisé le manuscrit. Les fonds nécessaires au projet ont été fournis par France Daigle.

## **CHAPITRE 3 – 2<sup>e</sup> article**

**Loss of the Fur regulator results in distinct phenotypes for *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi**

Jean-Mathieu Leclerc, Charles M. Dozois and France Daigle

RUNNING TITLE: Characterization of *Salmonella fur* mutants

## ABSTRACT

*Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi are two closely related bacteria that cause different types of infection in humans. The global regulator Fur, involved in the regulation of iron homeostasis, stress response and virulence, is present in both *S. Typhimurium* and *S. Typhi*, and we have investigated the role of Fur in these serovars. Deletion of the *fur* gene led to distinct phenotypes in these serovars. The *S. Typhi fur* mutant was defective for growth in iron-rich and iron-limiting conditions. Also, formation of filamentous cells by the *S. Typhi fur* mutant was observed. Conversely, the *S. Typhimurium fur* mutant had no growth or morphology defects when grown in iron-rich conditions, but exhibited a growth lag in iron-limiting conditions. Furthermore, Fur was required for optimal swimming motility in both serovars, but decreased motility of the *S. Typhi fur* mutant was more marked than for the *S. Typhimurium fur* mutant. Fur was also important for *S. Typhi* in interaction with human cultured macrophages. The mutant showed severe defects in uptake and survival within these cells. By contrast, loss of Fur had no effect on *S. Typhimurium* infection of macrophages. Finally, when Fur is inactivated, *S. Typhi* produced more siderophores than *S. Typhimurium* when grown to stationary phase in iron-free medium and both serovars produced more enterobactin than salmochelins. Globally, these results demonstrate that Fur differentially affects the physiology and the virulence phenotypes of the two serovars and is more critical for *S. Typhi* growth, morphology, motility and interaction with host cells than for *S. Typhimurium*.

## INTRODUCTION

*Salmonella enterica* is an important bacterial pathogen and is responsible for foodborne illness in humans and animals. The two major serovars that cause infections in humans are *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) and *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*). *S. Typhimurium* can infect a large spectrum of hosts and causes gastroenteritis, an infection localized in the intestine and associated with local inflammatory response that results in diarrhea (Haraga *et al.*, 2008). However, *S. Typhimurium* can cause systemic typhoid-like disease in susceptible mice (Tsolis *et al.*, 2011). *S. Typhi* is a host-restricted serovar that infects only humans, and causes a systemic infection called typhoid fever. *S. Typhi* infection leads to a lower level of intestinal inflammation than the infection by *S. Typhimurium* (Haraga *et al.*, 2008). *S. Typhi* is phagocytized by intestinal macrophages, survives inside these cells and disseminates in the host causing systemic infection (Haraga *et al.*, 2008). Differences in host range and pathogenic mechanisms of *S. Typhi* and *S. Typhimurium* are attributed to a unique repertoire of genes and differences in regulation of expression of conserved genes among these two serovars that may occur during the infectious process (reviewed in (Sabbagh *et al.*, 2010)).

During the course of the infection, *S. Typhimurium* and *S. Typhi* must compete with the host to obtain essential nutrients, such as iron. Inside the host, iron is sequestered by several proteins including transferrin, lactoferrin, heme-containing proteins (hemoglobin) and ferritins (Cassat & Skaar, 2013). In addition, the infected host responds to sequester iron from the bacteria (Nairz *et al.*, 2010). In turn, *Salmonella* use a number of acquisition systems, including small chelating molecules called siderophores, to obtain iron from the host. *S. Typhimurium* and *S. Typhi* harbor the same iron acquisition systems (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001), including the genes *ent* and *iro* encoding proteins required for the synthesis, export, import and hydrolysis of the siderophores enterobactin and salmochelins respectively. In addition, the ferrous iron transport systems Feo, Sit and MntH are found in both serovars.

As for most bacteria, iron is an essential element for *Salmonella*, but iron can be toxic under aerobic conditions. *Salmonella* have different regulatory systems that maintain cellular iron

homeostasis. The major iron homeostasis regulator is the Fur protein that represses the transcription of genes encoding iron acquisition systems by binding to a conserved sequence called the Fur box which is found in the promoter region of iron-regulated genes (Escobar *et al.*, 1999; Lee & Helmann, 2007). Fur is activated by  $\text{Fe}^{2+}$ , so in iron-rich conditions, iron acquisition systems are inhibited by this regulator, but when iron levels are low, these targets are expressed and allow iron acquisition from extracellular environments.

Like the majority of the *Enterobacteriaceae*, *S. Typhimurium* and *S. Typhi* possess the Fur protein and many reports have characterized the role of Fur in *S. Typhimurium*. Fur is a global regulator affecting the expression of many genes implicated in iron homeostasis, including the synthesis and transport of siderophores, transport and storage of iron and several iron-containing proteins (redox proteins, oxidoreductases and cytochromes). Fur also regulates the expression of genes implicated in other functions, including motility, the TCA cycle, respiration, oxidative and acid stress responses and virulence (Bjarnason *et al.*, 2003; Foster & Hall, 1992; Osman & Cavet, 2011; Troxell *et al.*, 2011a; Tsolis *et al.*, 1995). The role of Fur in *S. Typhi* is less well characterized. Identification of Fur-regulated genes in this serovar was determined using the Fur titration assay (FURTA) and led to the identification of the *iroBC* genes from the *iroA* locus (Bäumler *et al.*, 1996). In addition, an *in silico* analysis led to the identification of several Fur boxes containing genes potentially regulated by Fur (Panina *et al.*, 2001). Recently, Fur was shown to be required for the acid tolerance response (ATR) of *S. Typhi* in acidic pH conditions (Brenneman *et al.*, 2013) and we also reported that Fur was important for oxidative stress resistance and for the virulence of *S. Typhi* in epithelial cells and macrophages (Leclerc *et al.*, 2013).

The Fur regulator is highly conserved in *S. Typhimurium* and *S. Typhi*, as the *fur* genes share more than 99.5 % nucleotide identity predicted to encode identical proteins (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001). However, since these two *Salmonella* serovars cause markedly different infections and demonstrate a considerable degree of genomic variability, a global regulator such as Fur could specifically regulate unique genes from either serovar, or differentially regulate genes common to the two serovars. Also, since *S. Typhimurium* and *S. Typhi* have divergent lifestyles and infection processes, inactivation of the *fur* genes could result in distinct phenotypes for the two bacteria. In this study, we investigated the role of the

*S. Typhimurium* and *S. Typhi* Fur regulators in different physiological conditions by characterization of the *fur* mutants. We showed that *fur* mutants of both bacteria have distinct phenotypes in growth, morphology, motility, virulence and siderophore production. Globally, the *S. Typhi fur* mutant was more defective than the *S. Typhimurium fur* mutant in the different analyses, showing that the same regulator of two closely related bacteria differentially affects the bacterial physiological processes.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Bacterial strains and growth conditions**

*S. Typhimurium* (ATCC 14028s) and *S. Typhi* (ISP1820) were used throughout this study. Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Deletion of *fur* was generated by allelic exchange as described previously (Leclerc *et al.*, 2013) using the overlap-extension PCR method (Basso *et al.*, 2002). Primers are listed in Table 2. Mutations were confirmed by PCR. Bacteria were routinely grown overnight with agitation in Luria–Bertani (LB) broth, unless indicated otherwise. Iron-limiting conditions were created by the addition of 200  $\mu\text{M}$  2,2'-dipyridyl to LB medium. When required, antibiotic was added at the following concentration: 50  $\mu\text{g}$  ampicillin  $\text{ml}^{-1}$ . Growth curves of strains were assessed in iron-rich (LB) and iron-limiting (LB with 200  $\mu\text{M}$  2,2'-dipyridyl) conditions in triplicate. Absorbance at 600 nm was measured every 15 minutes using a Bioscreen C Automated Microbiology Growth Curve Analysis System (Growth Curves USA).

### **Microscopy**

Strains were grown overnight in LB medium, diluted 1:100 in LB and grown with agitation at 37°C to an  $\text{OD}_{600}$  ranging from 0.5 to 0.6 corresponding to the exponential growth phase. Aliquots of 1 ml of each culture were then washed once with 1X PBS, and bacteria were stained using the Gram staining method. Samples were analysed using a Nikon Eclipse E600 microscope and the pictures were taken at a magnification of 1000 X .

### **Motility assay**

Mutants were tested for their ability to swim in LB 0.3 % agar plates as previously described (Sabbagh *et al.*, 2012), with some modifications. Prior to inoculation, the plates were allowed to dry for 1 h under a sterile laminar flow hood at room temperature. Strains were grown overnight with agitation in LB at 37°C. Each mutant strain was tested along with the wild-type strain, 6  $\mu\text{L}$  of each bacterial culture was spotted into the agar of the same swimming plate. The plates were incubated at 37°C for 16 to 18 h for *S. Typhi* strains, and for 6 h for *S. Typhimurium* strains. Following incubation, the swimming zone diameter of each strain was

measured. Results represent the mean  $\pm$  SEM of at least seven independent experimental replicates and Student's two-tailed *t*-test was used for statistical analysis.

### **Analysis of siderophores from culture supernatants**

Strains were grown overnight in LB, washed once with iron-free RPMI medium (without serum) (Wisent), diluted 1:100 in 10 mL of iron-free RPMI and grown with agitation for 17 h at 37°C. Supernatants of the cultures were obtained following centrifugation of bacterial cells at 3 200 g for 10 min, and aliquots of 2 ml of supernatants were centrifuged at 15 000 g for 2 min. 1 ml aliquots of supernatants were then prepared in 5 % vol/vol formic acid, and 0.12 ng ml<sup>-1</sup> of 5,6,7,8-tetradeutero-3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline was added as an internal control (Lepine *et al.*, 2003). Each strain was cultured in triplicate and a sample of each culture supernatant was analysed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS).

### **Liquid chromatography/Mass spectrometry analyses**

Multiple reaction monitoring (MRM) analyses were performed using an Agilent HP 1100 HPLC (Agilent Canada, Mississauga, ON) coupled to a Micromass QuattroII spectrometer (Micromass Canada), and with a Waters 2795 Alliance HT coupled to a Micromass Quattro Premier XE spectrometer (Micromass MS Technologies) as described in (Caza *et al.*, 2008).

### **Infection of human cultured macrophages**

The human monocyte cell line THP-1 (ATCC TIB-202) was maintained in RPMI 1640 (Wisent) containing 10 % (v/v) heat-inactivated FBS (Wisent), 1 mM sodium pyruvate (Wisent) and 1 % modified Eagle's medium (MEM) with non-essential amino acids (Wisent). A stock culture of these cells was maintained as monocyte-like, non-adherent cells at 37°C in an atmosphere containing 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>. For macrophage infection, cells were seeded at 5x10<sup>5</sup> cells per well in 24-well tissue-culture dishes and were differentiated by the addition of 10<sup>-7</sup> M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma) for 48 h. Macrophage infection was performed as described previously (Daigle *et al.*, 2001) unless specified otherwise. Briefly, bacteria were grown overnight in LB without agitation (o/n standing) to an OD<sub>600</sub> of 0.6. Bacteria were added to the cell monolayer at an m.o.i. of 10:1, and culture plates were

centrifuged for 5 min at 800 g to synchronize bacterial uptake. After 20 min of incubation at 37°C, extracellular bacteria were removed by washing the cells three times with prewarmed PBS, and the infected monolayers were either lysed with PBS-DOC (0 h) or incubated for 2 h with medium containing 100 µg gentamicin ml<sup>-1</sup> (Wisent) to kill extracellular bacteria, and then with 12 µg gentamicin ml<sup>-1</sup> for the rest of the experiment. The number of bacteria associated with cells or surviving inside the cells was determined as colony forming units (c.f.u.) by plating on LB agar. Results are expressed as the mean ± SEM of at least three experiments done in duplicate. The non-parametric Student's *t* test was used for statistical analysis.

## RESULTS

### Growth of the *fur* mutants in iron-rich and iron-limiting conditions

Previous studies showed various phenotypes for *fur* mutants according to the conditions and the strains tested. The growth kinetics of the *fur* mutant strains of *S. Typhimurium* and *S. Typhi* were measured in iron-rich and iron-limiting conditions (Fig. 1). In iron-rich conditions (LB), the *S. Typhi fur* mutant exhibited a growth lag in the exponential phase and an overall decreased of growth compared to the wild-type strain (Fig. 1a). By contrast, the *S. Typhimurium fur* mutant exhibited no growth defect under these conditions (Fig. 1c). Bacterial growth was also investigated under iron-limiting conditions where the metal-chelating agent 2,2'-dipyridyl (200  $\mu$ M) was added to the LB medium. Overall, bacterial growth plateaued at a much earlier time point and at a lower OD<sub>600</sub> under these conditions even for the wild-type strains (Fig. 1b and 1d). Even if the growth of the *S. Typhi* wild-type strain was poor, the growth of the *fur* mutant was even worse and the culture did not reach the OD<sub>600</sub> of the wild-type culture after 20 h of incubation (Fig. 1b). Unlike for the iron-rich conditions, the *S. Typhimurium fur* mutant showed a growth defect in the iron-limiting conditions, particularly in the exponential growth phase, but eventually grew to an OD<sub>600</sub> similar to the wild type after 20 hrs (Fig. 1d). In all the conditions tested, bacterial growth was restored to the wild-type level when the *fur* gene was introduced on a low-copy plasmid (pWSK29*fur*) in the *fur* mutant (Fig. 1). We have previously shown that the delayed growth of the *S. Typhi fur* mutant in minimal medium was due to the expression of the sRNAs RfrA and RfrB (Leclerc, 2013). Thus, in order to determine if the delayed growth observed by the *fur* mutants in LB medium was due to these sRNAs, the growth of the triple mutants *fur/rfrA/rfrB* of *S. Typhi* and *S. Typhimurium* was measured in iron-rich and iron-limiting conditions. The deletion of *rfrA* and *rfrB* in the *fur* mutant restored the growth of the *S. Typhi fur* mutant in iron-rich and iron-limiting conditions and the growth of the *S. Typhimurium fur* mutant in iron-limiting conditions (Fig. 1). In iron-limiting conditions, the growth of the *fur/rfrA/rfrB* mutants was higher than the growth of the wild-type strains, especially in *S. Typhi*. Therefore, this suggests that the stress encountered by the addition of the chelating agent could be explained by the expression of the sRNAs in such iron-limiting conditions.

To investigate if the growth defect observed with the *S. Typhi fur* mutant was associated to morphological changes, microscopy was performed (Fig. 2). Bacteria grown in iron-rich conditions to exponential phase (OD<sub>600</sub> of 0.5-0.6) were stained using the Gram staining method. Observation of the stained bacteria revealed that the *S. Typhi fur* mutant formed long filamentous cells (Fig. 2b), unlike the wild-type strain that formed normal rod-shaped cells (Fig. 2a). This filamentous phenotype could explain the growth defect of the *fur* mutant (Fig. 1a). Filamentous cells were also observed for the *S. Typhi fur* mutant grown on LB agar plates, where this strain formed smaller colonies than the wild-type (data not shown). Since the *fur/rfrA/rfrB* mutant restored the growth of the *fur* mutant, the morphology of the triple mutant was also observed to determine if the deletion of the genes encoding the sRNAs would restore the morphology. The *S. Typhi fur/rfrA/rfrB* mutant formed filamentous cells, but the proportion of cells forming filaments was a little lower compared to the *fur* mutant (Fig. 2c). Complementation of the *S. Typhi fur* mutant with the plasmid pWSK29 expressing *fur* completely restored the morphology, where the cells no longer formed filaments (Fig. 2d). In addition, no morphological difference was observed between *S. Typhimurium* wild-type and *fur* mutant strains, where both strains formed normal rod-shaped cells (Fig. 2e and 2f). Collectively, these results showed that inactivation of the *fur* gene of *S. Typhi* leads to a more significant growth defect when compared to *S. Typhimurium*. This severe growth defect is linked with a filamentous phenotype in *S. Typhi fur* mutant cells, but filamentation can only explain partially the growth defect, because the *S. Typhi fur/rfrA/rfrB* mutant restored the growth but still formed filamentous cells.

### **Motility of the *fur* mutant strains**

Previous studies have shown that Fur regulates the expression of motility genes in *S. Typhimurium* (Bjarnason *et al.*, 2003; Campoy *et al.*, 2002; Troxell *et al.*, 2011a). Also, motility is associated with *Salmonella* virulence in eukaryotic cells (Liu *et al.*, 1988; Olsen *et al.*, 2013). However, the role of Fur in the regulation of motility of *Salmonella* has never been evaluated. The abilities of the *S. Typhimurium* and *S. Typhi fur* mutants to swim in soft agar were thus evaluated. In general, *S. Typhimurium* swam more rapidly than *S. Typhi*. Swimming zones were approximately the same size (25-30 mm) following incubation at 37°C for 6 h for *S. Typhimurium* and for 16-18 h for *S. Typhi*. Both *fur* mutants exhibited a significant

swimming defect when compared to the wild-type strains, but the defect was more pronounced in *S. Typhi* (Fig. 3). Indeed, *S. Typhi* and *S. Typhimurium fur* mutants swam about 50 % and 20 % less, respectively, when compared to their wild-type counterparts (Fig. 3). The swimming abilities of the *fur/rfrA/rfrB* mutants were also evaluated. The *S. Typhi fur/rfrA/rfrB* mutant exhibited a significant swimming defect comparable to the one observed for the *fur* mutant (Fig. 3). However, the *S. Typhimurium fur/rfrA/rfrB* mutant had no significant swimming defect. The *fur* complemented strains of both serovars restored the swimming phenotype to the wild-type level (Fig. 3). These results confirmed the importance of Fur for the swimming motility of *Salmonella*, with a greater impact found in *S. Typhi*.

### **Role of Fur in the interaction of *Salmonella* with human cultured macrophages**

Fur is important for the virulence of *Salmonella*. Previous studies have shown that the *S. Typhimurium fur* mutant has displayed an attenuated level of virulence in mice (Curtiss *et al.*, 2009; Garcia-del Portillo *et al.*, 1993; Riesenber-Wilmes *et al.*, 1996; Troxell *et al.*, 2011b; Velayudhan *et al.*, 2007). In addition, the *S. Typhi fur* mutant was shown to be less virulent in macrophages (Leclerc *et al.*, 2013). However, it is not clear if the *S. Typhimurium Fur* regulator is important for its interaction with macrophages. In order to evaluate bacterial uptake, survival and proliferation of *Salmonella* within macrophages, human THP-1 macrophages were infected with the wild-type strains and the isogenic mutants of both serovars using a gentamicin protection assay (Fig. 4). The number of bacteria present at different times was determined by viable count assays. The *S. Typhi fur* mutant was significantly impaired in uptake by macrophages, and in early (2 h) and late (24 h) survival within these cells when compared to the wild-type (Fig. 4a). Indeed, the wild-type strain was internalized twice as much as the *fur* mutant and unlike the *fur* mutant, the wild-type parent survived and multiplied inside macrophages. The *S. Typhi fur* mutant was unable to multiply inside these cells. However, the *S. Typhimurium fur* mutant was not attenuated at any time during macrophage infection (Fig. 4b). Even if slightly lower levels of the *fur* mutant bacterial cells were recovered at each time point when compared to the wild-type, these differences were not statistically significant. These results show an important difference in the role of the Fur regulator for these two serovars, where Fur has an important role for interaction of *S.*

Typhi with macrophages, whereas *S. Typhimurium* Fur is not needed for infection of these cells.

### **Siderophore production**

In *Salmonella*, Fur is known to regulate the expression of the genes necessary for the synthesis, export, import and hydrolysis of the siderophores enterobactin and salmochelins. In order to evaluate the siderophores production by *S. Typhimurium* and *S. Typhi*, as well as the role of Fur in its production, we investigated the effect of *fur* inactivation on siderophores synthesis. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) analyses were performed on culture supernatants to determine the quantities of siderophores secreted by the different strains grown in iron-free RPMI medium. The siderophores measured by these analyses included all the subtype molecules of enterobactin (cyclic enterobactin, (DHBS)<sub>3</sub>, (DHBS)<sub>2</sub> and DHBS) and salmochelin (TGE, linear TGE, DGE (S4), linear DGE, MGE, linear MGE, S5, S1 and SX). *S. Typhi* produced more siderophores than *S. Typhimurium* under these conditions (Fig. 5). Indeed, enterobactin and salmochelins levels were respectively about five-fold and two-fold higher for *S. Typhi* than for *S. Typhimurium*. Each strain produced more enterobactin than salmochelins. Enterobactin represented about 89 % and 81 % of the siderophores produced respectively by the *S. Typhi* wild-type and *fur* mutant strains, and about 82 % and 75 % of the siderophores produced respectively by the *S. Typhimurium* wild-type and *fur* mutant strains. Since the medium used in this analysis contained no added iron (RPMI without serum), there was no marked difference in siderophore production between the wild-type and *fur* mutant strains. The *S. Typhi fur* mutant produced a little less enterobactin than the wild-type, and the production of enterobactin remained constant in the *S. Typhimurium* wild-type and its *fur* mutant derivative (Fig. 5). Nevertheless, the *S. Typhimurium fur* mutant produced significantly more salmochelins than the wild-type (Fig. 5). The proportion of salmochelins produced by *Salmonella* increased in the *fur* mutants compared to the wild-type strains, from 11 % to 18 % for *S. Typhi* and from 18 % to 25 % for *S. Typhimurium*. Collectively, these results showed that, in iron-limiting conditions, *Salmonella* produces more enterobactin than salmochelins, and the proportion of secreted salmochelins increases in a *fur* mutant.

## DISCUSSION

Iron homeostasis is crucial in the maintenance of appropriate iron levels in the cell and to protect the bacteria from iron toxicity in the presence of oxygen. When iron homeostasis is deregulated in a *fur* mutant, free intracellular iron levels increase and this leads to reactive oxygen species (ROS) production, causing DNA damage (Touati, 2000). Indeed, the *fur* mutants from different bacteria were shown to be very sensitive to oxidative stress (Cornelis *et al.*, 2011; Touati, 2000). The stress encountered in the *fur* mutants can have different physiological effects on the cell. It was previously shown that the *fur* mutants of some bacteria had a growth defect, probably because of the iron-mediated oxidative damage, and in some bacteria, a deletion of *fur* is lethal (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999; Barton *et al.*, 1996; da Silva Neto *et al.*, 2009; Jacques *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2002; van Vliet *et al.*, 1998). In *Salmonella*, growth of the *fur* mutants was variable depending on the serovars. For *S. Typhi*, the growth of the *fur* mutant was defective in minimal medium (Leclerc *et al.*, 2013), and for *S. Typhimurium*, growth of the *fur* mutant was not affected in LB-MOPS-X medium (Troxell *et al.*, 2011a), but was defective in LB and minimal medium (Kim & Kwon, 2013a). Here, we showed that the growth of the *S. Typhi fur* mutant was impaired in iron-rich (LB) and iron-limiting (LB with 2,2'-dipyridyl) conditions (Fig. 1), confirming that Fur is important for the growth of *S. Typhi*. We also confirmed that the *S. Typhimurium fur* mutant has no growth defect under iron-rich medium, but this strain grew slower under iron-limiting conditions when compared to the wild-type strain. An increase in the free intracellular iron levels is encountered when the sRNAs RfrA and RfrB are no longer repressed by Fur, which could cause oxidative damage that will generate a growth defect in the *fur* mutants. Indeed, deletion of the genes coding for these two sRNAs in the *fur* mutant restored growth of the *S. Typhi fur* mutant under iron-rich and iron-limiting conditions, and the growth of the *S. Typhimurium fur* mutant under iron-limiting conditions (Fig. 1). The *S. Typhi fur* mutant seems to encounter higher levels of stress than the *S. Typhimurium fur* mutant, and this is indicated by our observations of the morphology of the *S. Typhi fur* mutant cells. When grown under iron-rich conditions in exponential phase, this strain formed filamentous cells, while the morphology of the *S. Typhimurium fur* mutant was normal (Fig. 2). It has been shown that *E. coli fur* mutants forms filaments, a phenotype associated with a bacterial protective response against the

oxidative DNA damage (Touati *et al.*, 1995). However, the *S. Typhi fur/rfrA/rfrB* mutant formed filaments, suggesting that this strain encountered oxidative DNA damage and that the filamentation of the *S. Typhi fur* mutant cells is not entirely due to the expression of the sRNAs RfrA and RfrB. This also suggests that the filamentation is not the only reason that explains the growth defect of the *fur* mutant.

Iron homeostasis is not the only role of Fur and this protein can also regulate the expression of genes involved in stress response and virulence. Previous studies have shown that, in *S. Typhimurium*, some genes involved in motility and chemotaxis are regulated by Fur and that this regulator positively regulates the *flhDC* genes encoding the positive regulator of flagella synthesis (Bjarnason *et al.*, 2003; Campoy *et al.*, 2002; Troxell *et al.*, 2011a). Moreover, it has been shown that RfrB (RyhB-2) suppresses three flagellar and motility genes and that expression of RfrB in a *fur* mutant inhibits the swimming of *S. Typhimurium* (Kim & Kwon, 2013b). Therefore, inhibition of swimming motility in the *fur* mutant of this serovar seems to be due to a combination of direct and indirect mechanisms. Here, we showed that the *S. Typhi* and *S. Typhimurium fur* mutant strains swam less than the wild-type strains, with a more important defect for *S. Typhi* (Fig. 3). Therefore, it is surprising that deletion of *fur* only led to a slight swimming decrease for *S. Typhimurium* in the current report. The *S. Typhimurium fur/rfrA/rfrB* mutant showed a swimming motility similar to the motility of the wild-type, suggesting that Fur-dependent swimming regulation does involve these sRNAs in *S. Typhimurium*. The defect observed for the *S. Typhi fur* mutant was not due to the expression of the sRNAs, because the *S. Typhi fur/rfrA/rfrB* mutant did not restore the swimming phenotype. This suggests that Fur-dependent swimming regulation does not involve these sRNAs in *S. Typhi*. Moreover, mutations inducing filamentous morphology have been shown to reduce swimming motility of *Salmonella* (Shippy *et al.*, 2011). Since the *fur* and the *fur/rfrA/rfrB* mutants of *S. Typhi* formed filaments and had a reduced motility phenotype, the relation between filamentation and motility is expected. Therefore, the motility defects of the *S. Typhi fur* mutant could be explained by a combined decreased expression of motility genes and the filamentation phenotype leading to inhibition of swimming.

Fur affects the virulence of *Salmonella* in many ways. This regulator is required for the virulence of *S. Typhimurium* in mice (Curtiss *et al.*, 2009; Garcia-del Portillo *et al.*, 1993;

Riesenberg-Wilmes *et al.*, 1996; Troxell *et al.*, 2011b; Velayudhan *et al.*, 2007), and is important for the invasion of epithelial cells via the activation of SPI-1 genes (Ellermeier & Slauch, 2008; Leclerc *et al.*, 2013; Teixido *et al.*, 2011; Troxell *et al.*, 2011b). However, the role of Fur in the interaction with macrophages is less characterized. When *Salmonella* infects macrophages, it faces the cellular antimicrobial defences including nutrient restriction, generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) and production of antimicrobial peptides (Vazquez-Torres & Fang, 2001). The *S. Typhi fur* mutant was more sensitive to stress than *S. Typhimurium* and exhibited a more marked decrease in *in vitro* growth and motility. This could explain the severe defect of the *S. Typhi fur* mutant for survival inside macrophages. The *S. Typhimurium fur* mutant could presumably survive inside macrophages because it was more resistant to the stress encountered within these cells. This may explain why Fur was not necessary for *S. Typhimurium* survival in human macrophages, a result in agreement with previous reports (Garcia-del Portillo *et al.*, 1993). Moreover, Fur can regulate specific virulence factors in each serovar and this might explain the observed differences in interaction with macrophages. Unlike the *S. Typhimurium fur* mutant, the *S. Typhi fur* mutant was less phagocytized than the wild-type strain. Previous reports have shown that a defect in SPI-dependant invasion does not result in a decreased phagocytosis by macrophages. The difference in uptake between the two serovars could potentially be explained by altered cellular morphology. It has been previously shown that filamentous *Salmonella* cells are defective in invasion of epithelial cells and in early interaction with macrophages (Humphrey *et al.*, 2011; Shippy *et al.*, 2011). Furthermore, it has been shown that the macrophage uptake defect can be attributed to mutations in flagellar or chemotaxis genes in *Salmonella* (Olsen *et al.*, 2013). As the *S. Typhi fur* mutant showed a worse swimming defect than the *S. Typhimurium fur* mutant, the loss of flagellar function coupled with an altered morphological shape may explain the difference between the macrophage uptake levels of these two serovars.

Fur is known to repress the expression of the catecholate siderophores enterobactin and salmochelins. The production of these siderophores have been investigated in different strains of *E. coli* and *S. Typhimurium in vitro* and during interaction with host cells (Caza *et al.*, 2011; Caza *et al.*, 2008; Crouch *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005), but to our

knowledge, this is the first study that compares the relative levels of siderophores produced by two different serovars of *Salmonella*. Under the conditions used (iron-free RPMI medium), *Fur* was inactive and the repression of enterobactin and salmochelins production was relieved, resulting in full siderophore production. Interestingly, the siderophore levels were higher in *S. Typhi* than in *S. Typhimurium* (Fig. 5). The stress of iron starvation could be more pronounced for *S. Typhi* under these growth conditions and may have led to higher levels of siderophores production compared to *S. Typhimurium*. It would be interesting to determine if the difference in the siderophore production between the two serovars is observed in other conditions, such as during interaction with host cells. Another interesting result from this study is that both serovars produce considerably more enterobactin than salmochelins, suggesting lower levels of IroB-mediated glucosylation of enterobactin into salmochelins, or lower levels of IroC-mediated export of salmochelin. This observation is in contrast with previous studies that showed that, in iron-poor M9 medium, the ratio of enterobactin and salmochelins secreted by *S. Typhimurium* is approximately the same (Crouch *et al.*, 2008). The difference between the two experimental results could be explained by the different media and conditions used. Since salmochelins are important for virulence of *Salmonella*, the prevention of its sequestration by the host defence protein lipocalin 2 and the predominance of enterobactin would not be beneficial to this bacterium, and the production of salmochelins is expected to increase in the host. Since the medium used was iron-poor, deletion of *fur* had a little impact on siderophore production. In the *fur* mutants of both serovars, the level and proportion of salmochelins increased, especially for the *S. Typhimurium fur* mutant that produced significantly more salmochelins than the wild-type. The difference in the levels of salmochelins produced by the *S. Typhi fur* mutant and the wild-type was not significant, and we previously showed that the transcription of *iroB* did not increase in the *S. Typhi fur* mutant in iron-limiting M63 medium (Leclerc *et al.*, 2013). Thus, the increased production of salmochelins observed in a *fur* mutant seems to be specific to *S. Typhimurium*. The increased production or secretion of salmochelins could be due to transcriptional or post-transcriptional mechanisms, such as an increased activity of IroB, where more enterobactin molecules would be transformed in salmochelins, or an increased secretion via the IroC exporter.

Globally, Fur differentially affected the physiology and the virulence of the serovars Typhi and Typhimurium. Fur was more important for *S. Typhi* during growth, morphology of the bacterial cells, motility and interaction with host cells. The *S. Typhi fur* mutant was more affected than the *S. Typhimurium fur* mutant in the different analyses, showing that the same regulator could have a distinct role for each of these *Salmonella* serovars.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This research was supported by a Discovery grant (251114-12) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). J.-M.L was supported by a postgraduate scholarship from NSERC.

## REFERENCES

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y. S., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., Harrison, P. M., Guest, J. R. & Andrews, S. C. (1999). Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J Bacteriol* **181**, 1415-1428.
- Barton, H. A., Johnson, Z., Cox, C. D., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (1996). Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol Microbiol* **21**, 1001-1017.
- Basso, H., Rharbaoui, F., Staendner, L. H., Medina, E., García-Del Portillo, F. & Guzmán, C. A. (2002). Characterization of a novel intracellularly activated gene from *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* **70**, 5404-5411.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., van der Velden, A. W., Stojiljkovic, I., Anic, S. & Heffron, F. (1996). Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Gene* **183**, 207-213.
- Bjarnason, J., Southward, C. M. & Surette, M. G. (2003). Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol* **185**, 4973-4982.
- Brenneman, K. E., Willingham, C., Kong, W., Curtiss, R., 3rd & Roland, K. L. (2013). Low-pH rescue of acid-sensitive *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains by a Rhamnose-regulated arginine decarboxylase system. *J Bacteriol* **195**, 3062-3072.
- Campoy, S., Jara, M., Busquets, N., de Rozas, A. M., Badiola, I. & Barbe, J. (2002). Intracellular cyclic AMP concentration is decreased in *Salmonella typhimurium fur* mutants. *Microbiology* **148**, 1039-1048.
- Cassat, J. E. & Skaar, E. P. (2013). Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* **13**, 509-519.
- Caza, M., Lepine, F. & Dozois, C. M. (2011). Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **80**, 266-282.
- Caza, M., Lepine, F., Milot, S. & Dozois, C. M. (2008). Specific roles of the *iroBCDEN* genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. *Infect Immun* **76**, 3539-3549.
- Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S. C. & Vinckx, T. (2011). Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* **3**, 540-549.
- Crouch, M. L., Castor, M., Karlinsey, J. E., Kalthorn, T. & Fang, F. C. (2008). Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential

- for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **67**, 971-983.
- Curtiss, R., 3rd, Wanda, S. Y., Gunn, B. M., Zhang, X., Tinge, S. A., Ananthnarayan, V., Mo, H., Wang, S. & Kong, W. (2009).** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect Immun* **77**, 1071-1082.
- da Silva Neto, J. F., Braz, V. S., Italiani, V. C. & Marques, M. V. (2009).** Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* **37**, 4812-4825.
- Daigle, F., Graham, J. & Curtiss, R. r. (2001).** Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol Microbiol* **41**, 1211-1222.
- Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2008).** Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through Hild. *J Bacteriol* **190**, 476-486.
- Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1999).** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**, 6223-6229.
- Foster, J. & Hall, H. (1992).** Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J Bacteriol* **174**, 4317-4323.
- Garcia-del Portillo, F., Foster, J. W. & Finlay, B. B. (1993).** Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* **61**, 4489-4492.
- Haraga, A., Ohlson, M. & Miller, S. (2008).** Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**, 53-66.
- Humphrey, S., Macvicar, T., Stevenson, A., Roberts, M., Humphrey, T. J. & Jepson, M. A. (2011).** SulA-induced filamentation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: effects on SPI-1 expression and epithelial infection. *J Appl Microbiol* **111**, 185-196.
- Jacques, J. F., Jang, S., Prevost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J. & Masse, E. (2006).** RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**, 1181-1190.
- Kaniga, K., Compton, M., Curtiss, R. r. & Sundaram, P. (1998).** Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* **66**, 5599-5606.
- Kim, J. N. & Kwon, Y. M. (2013a).** Genetic and phenotypic characterization of the RyhB regulon in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol Res* **168**, 41-49.
- Kim, J. N. & Kwon, Y. M. (2013b).** Identification of target transcripts regulated by small RNA RyhB homologs in *Salmonella*: RyhB-2 regulates motility phenotype. *Microbiol Res* **168**, 621-629.

- Leclerc, J. M., Dozois, C. M. & Daigle, F. (2013).** Role of the *Salmonella enterica* serovar Typhi Fur regulator and small RNAs RfrA and RfrB in iron homeostasis and interaction with host cells. *Microbiology* **159**, 591-602.
- Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2007).** Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**, 485-499.
- Lepine, F., Deziel, E., Milot, S. & Rahme, L. G. (2003).** A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Biochim Biophys Acta* **1622**, 36-41.
- Lin, H., Fischbach, M. A., Liu, D. R. & Walsh, C. T. (2005).** In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J Am Chem Soc* **127**, 11075-11084.
- Liu, S. L., Ezaki, T., Miura, H., Matsui, K. & Yabuuchi, E. (1988).** Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infect Immun* **56**, 1967-1973.
- McClelland, M., Sanderson, K., Spieth, J., Clifton, S., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M. & other authors (2001).** Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852-856.
- Nairz, M., Schroll, A., Sonnweber, T. & Weiss, G. (2010).** The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface. *Cell Microbiol* **12**, 1691-1702.
- Olsen, J. E., Hoegh-Andersen, K. H., Casadesus, J., Rosenkranzt, J., Chadfield, M. S. & Thomsen, L. E. (2013).** The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar *S. Typhimurium*. *BMC Microbiol* **13**, 67.
- Osman, D. & Cavet, J. S. (2011).** Metal sensing in *Salmonella*: implications for pathogenesis. *Adv Microb Physiol* **58**, 175-232.
- Panina, E. M., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2001).** Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **29**, 5195-5206.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K., Thomson, N., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S. & other authors (2001).** Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848-852.
- Riesenberg-Wilmes, M. R., Bearson, B., Foster, J. W. & Curtis, R., 3rd (1996).** Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**, 1085-1092.
- Rodriguez, G. M., Voskuil, M. I., Gold, B., Schoolnik, G. K. & Smith, I. (2002).** *ideR*, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect Immun* **70**, 3371-3381.

- Sabbagh, S., Forest, C., Lepage, C., Leclerc, J. & Daigle, F. (2010).** So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 1-13.
- Sabbagh, S. C., Lepage, C., McClelland, M. & Daigle, F. (2012).** Selection of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes involved during interaction with human macrophages by screening of a transposon mutant library. *PLoS One* **7**, e36643.
- Shippy, D. C., Eakley, N. M., Bochsler, P. N., Chopra, A. K. & Fadl, A. A. (2011).** Biological and virulence characteristics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium following deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene. *Microb Pathog* **50**, 303-313.
- Teixido, L., Carrasco, B., Alonso, J. C., Barbe, J. & Campoy, S. (2011).** Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator *in vivo* and *in vitro*. *PloS One* **6**, e19711.
- Touati, D. (2000).** Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**, 1-6.
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L. & Despied, S. (1995).** Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta *fur* mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol* **177**, 2305-2314.
- Troxell, B., Fink, R. C., Porwollik, S., McClelland, M. & Hassan, H. M. (2011a).** The Fur regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: identification of new Fur targets. *BMC Microbiol* **11**, 236.
- Troxell, B., Sikes, M. L., Fink, R. C., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J. & Hassan, H. M. (2011b).** Fur negatively regulates *hns* and is required for the expression of HilA and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **193**, 497-505.
- Tsolis, R., Bäumler, A., Stojiljkovic, I. & Heffron, F. (1995).** Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J Bacteriol* **177**, 4628-4637.
- Tsolis, R. M., Xavier, M. N., Santos, R. L. & Baumler, A. J. (2011).** How to become a top model: impact of animal experimentation on human *Salmonella* disease research. *Infect Immun* **79**, 1806-1814.
- van Vliet, A. H., Wooldridge, K. G. & Ketley, J. M. (1998).** Iron-responsive gene regulation in a *Campylobacter jejuni fur* mutant. *J Bacteriol* **180**, 5291-5298.
- Vazquez-Torres, A. & Fang, F. C. (2001).** Oxygen-dependent anti-*Salmonella* activity of macrophages. *Trends Microbiol* **9**, 29-33.
- Velayudhan, J., Castor, M., Richardson, A., Main-Hester, K. L. & Fang, F. C. (2007).** The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Mol Microbiol* **63**, 1495-1507.
- Wang, R. F. & Kushner, S. R. (1991).** Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**, 195-199.

**Zhu, M., Valdebenito, M., Winkelmann, G. & Hantke, K. (2005).** Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology* **151**, 2363-2372.

## TABLES AND FIGURES

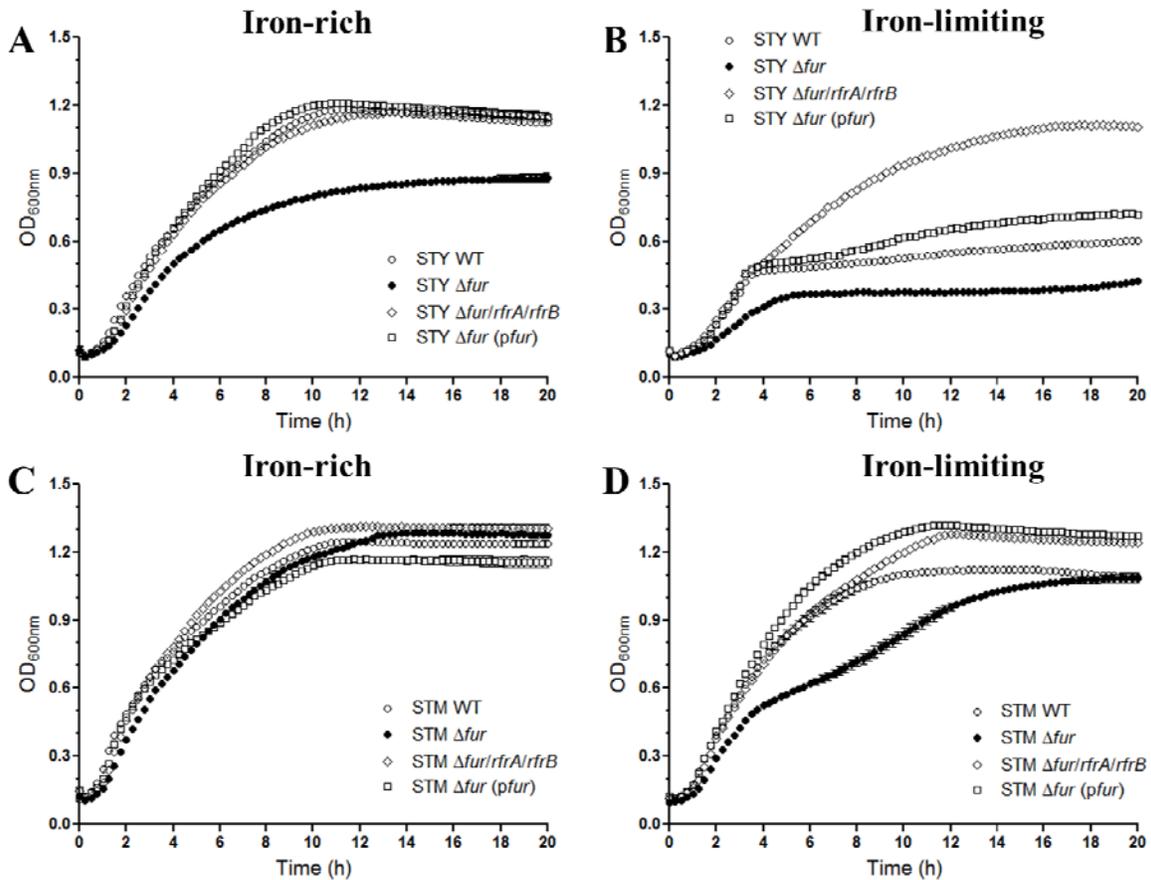
**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Characteristic	Source or reference
<b>Strains</b>		
<b><i>S. Typhi</i></b>		
STY WT	ISP1820 wild-type	R. Curtiss III, ASU
STY $\Delta fur$	ISP1820 $\Delta fur$	(Leclerc <i>et al.</i> , 2013)
STY $\Delta fur$ (pWSK29 <i>fur</i> )	ISP1820 $\Delta fur$ (pSIF150)	(Leclerc <i>et al.</i> , 2013)
<b><i>S. Typhimurium</i></b>		
STM WT	14028 wild-type	R. Curtiss III, ASU
STM $\Delta fur$	14028 $\Delta fur$	This study
STM $\Delta fur$ (pWSK29 <i>fur</i> )	14028 $\Delta fur$ (pSIF245)	This study
<b><i>E. coli</i></b>		
MGN-617	SM10 $\lambda_{pir}$ <i>asd thi thr leu tonA lacY supE recA</i> RP4 2-Tc : :Mu[ $\lambda_{pir}$ ] <i>asdA4</i>	(Kaniga <i>et al.</i> , 1998)
<b>Plasmids</b>		
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K</i> , Cm <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	R. Curtiss III, ASU
pSIF130	pMEG-375 with flanking region of <i>fur</i> used for <i>fur</i> deletion	(Leclerc <i>et al.</i> , 2013)
pSIF150	pWSK29 carrying a 1-kb fragment of ISP1820 <i>fur</i> gene	(Leclerc <i>et al.</i> , 2013)
pSIF245	pWSK29 carrying a 1-kb fragment of 14028 <i>fur</i> gene	This study
pWSK29	Low copy number cloning vector, Ap <sup>r</sup>	(Wang & Kushner, 1991)

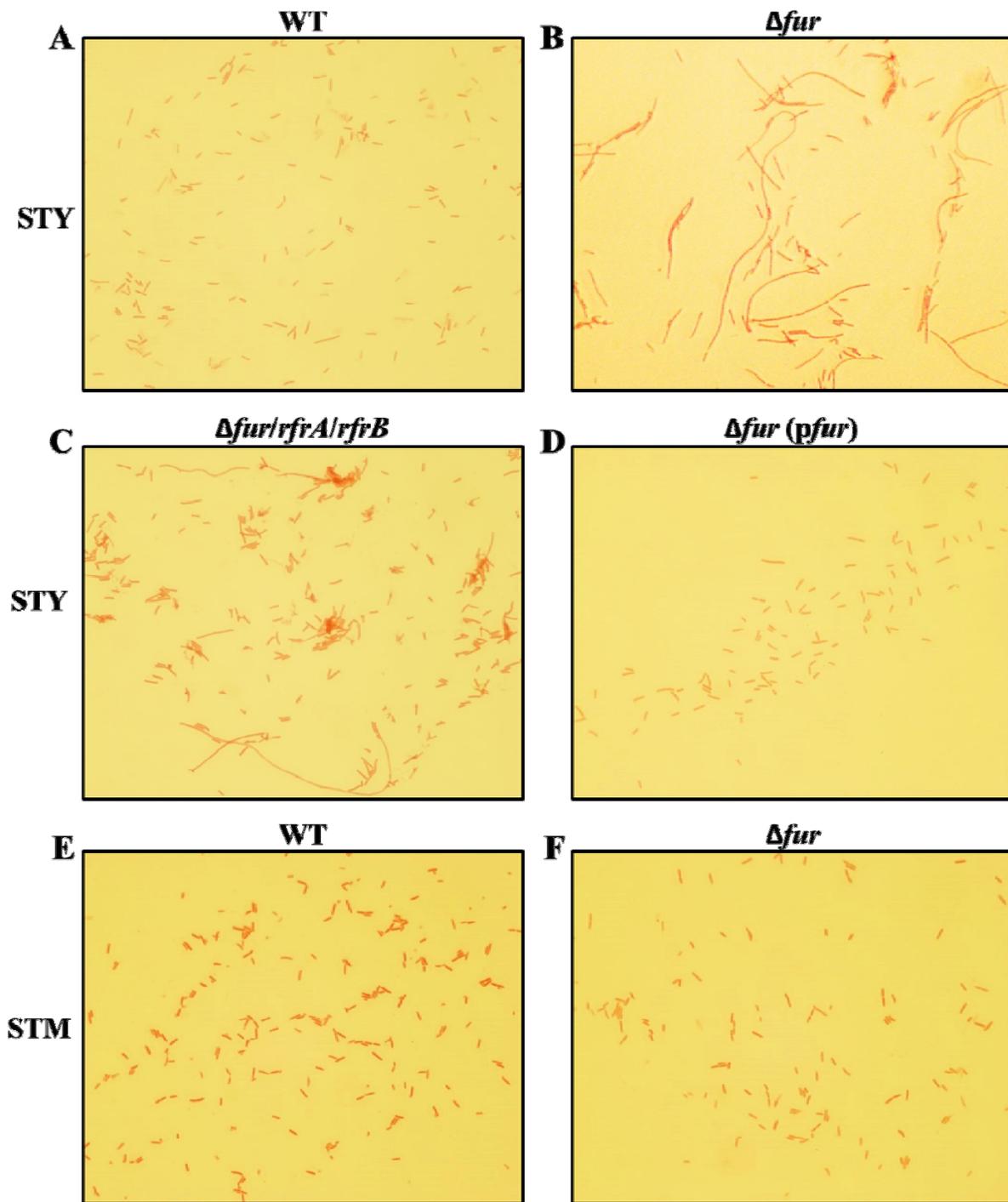
**Table 2.** Primers used in this study

<b>Primer</b>	<b>Sequence (5'-3')*</b>
<i>fur</i> -F	CGGGATCCCGACATCCTCAACGCCTAA
<i>fur</i> -Rover	GTCATCGTGGCGGAATCTGTCCTGTTG
<i>fur</i> -Fover	AGATTCCGCCACGATGACGCGACTAAA
<i>fur</i> -R	GCTCTAGAGCCTGTGAATAAAAGGCCAG

\*Restriction enzyme sites are underlined. Letters in italics denote overlapping sequences.

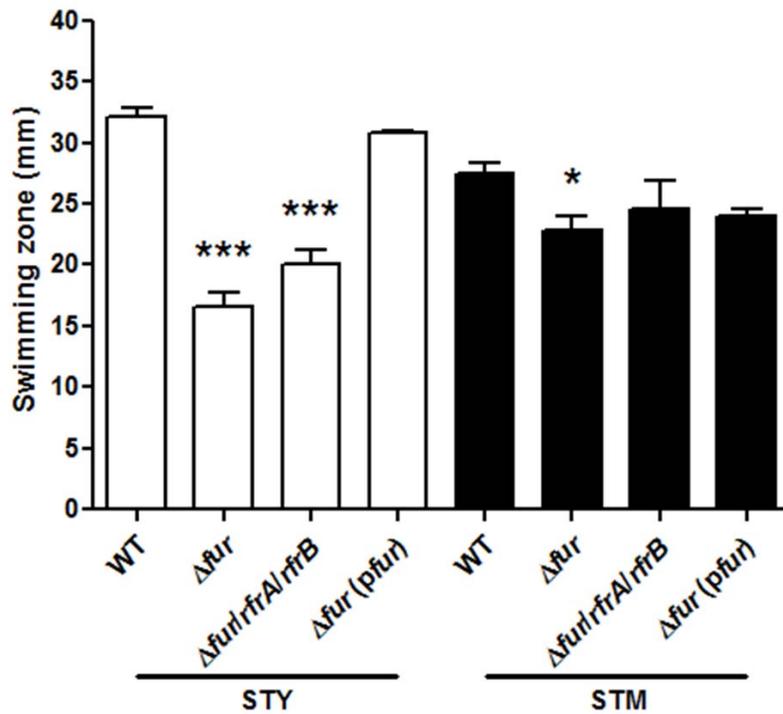


**Figure 1.** Growth curves of *S. Typhi* (STY) (a-b) and *S. Typhimurium* (STM) (c-d) wild-type strains, isogenic *fur* and *fur/rfrA/rfrB* mutants and *fur* complemented strains in iron-rich (LB) (a-c) and in iron-limiting (LB + 200  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl) (b-d) conditions. Absorbance at 600 nm was measured every 15 minutes using a Bioscreen C Automated Microbiology Growth Curve Analysis System. Growth curves of strains were assessed in triplicate and the results represent the means  $\pm$  SEM for each strain.

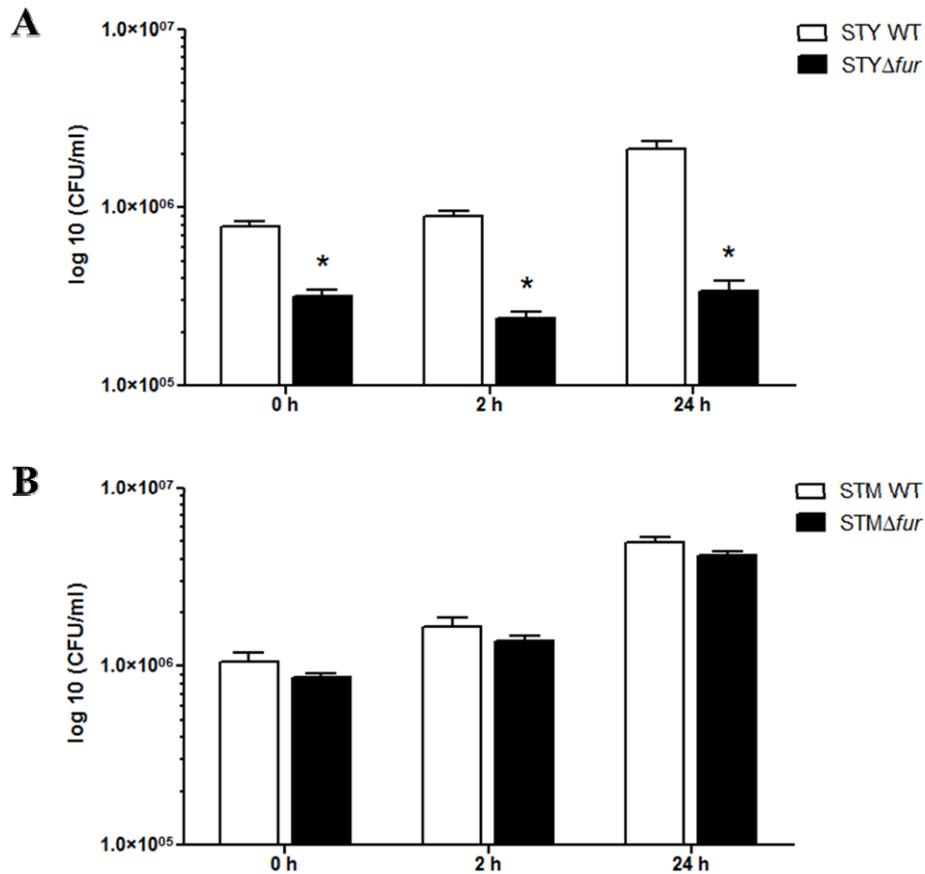


**Figure 2.** Morphology of *S. Typhi* (STY) wild-type strain (a), isogenic *fur* mutant (b), isogenic *fur/rfrA/rfrB* mutant (c) and *fur* complemented strain (d), and *S. Typhimurium* (STM) wild-type strain (e) and isogenic *fur* mutant (f) grown in iron-rich conditions (LB) with

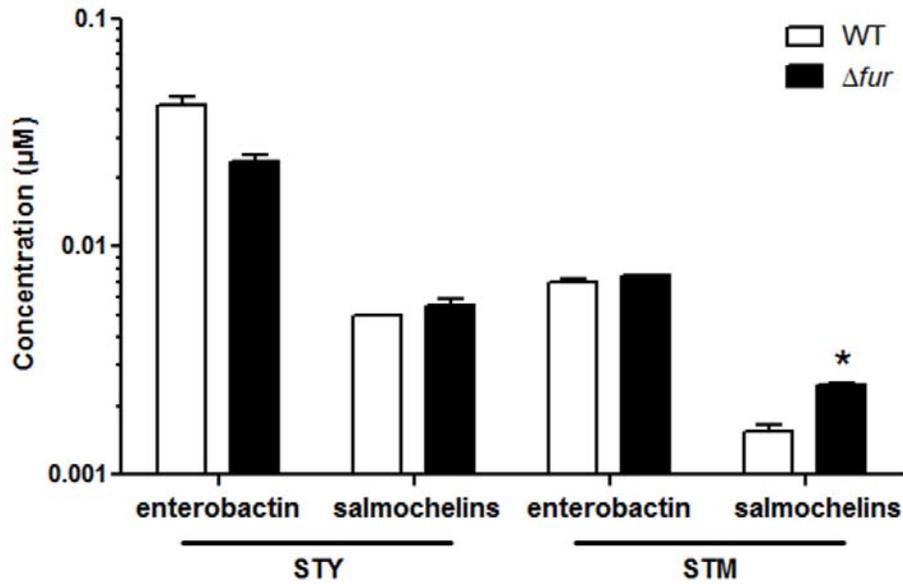
agitation at 37°C to an OD<sub>600</sub> ranging from 0.5 to 0.6 corresponding to the exponential growth phase. Bacteria were stained by Gram staining and the pictures were taken at a magnification of 1000 X using a Nikon Eclipse E600 microscope.



**Figure 3.** Swimming motility of *S. Typhi* (STY) and *S. Typhimurium* (STM) wild-type strains, isogenic *fur* and *fur/rfrA/rfrB* mutants and *fur* complemented strains. Strains were grown overnight with agitation in LB at 37 °C and 6  $\mu$ L of cultures were spotted on LB 0.3 % agar plates. Motility was measured after 6 h incubation for *S. Typhimurium* strains and after 16-18 h incubation for *S. Typhi* strains. Results represent the mean  $\pm$  SEM of at least two independent experimental replicates and the data reflect the swimming zone diameter of each strain. \*\*\* indicates significant difference ( $P < 0.0001$ ) between the mutant and the wild-type strains of *S. Typhi*. \* indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) between the mutant and the wild-type strains of *S. Typhimurium*.



**Figure 4.** Role of the *S. Typhi* and *S. Typhimurium* Fur regulators during interaction with human macrophages. THP-1 macrophages were infected with *S. Typhi* (STY) (a) and *S. Typhimurium* (STM) (b) wild-type strains and isogenic *fur* mutants. The number of bacteria (CFU/ml) associated with cells was determined after uptake (0 h) and during survival (2 h and 24 h) in macrophages. All assays were conducted in duplicate and repeated independently at least three times. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the replicate experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) between the mutants and the wild-type strains are indicated by asterisks.



**Figure 5.** Siderophore production by *S. Typhi* and *S. Typhimurium*. Concentrations of enterobactin and salmochelins were measured in culture supernatants of *S. Typhi* (STY) and *S. Typhimurium* (STM) wild-type strains and isogenic *fur* mutants grown in RPMI medium with no added iron. The amount of siderophore was normalized with the internal standard (5,6,7,8-tetradeutero-3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline). Results represent the mean  $\pm$  SEM of three analyses of biological replicates. Significant difference ( $P < 0.05$ ) between the *fur* mutant and the wild-type strain is indicated by an asterisk.

## Préface au Chapitre 4

La dernière partie du projet visait à déterminer si les régulateurs de l'homéostasie du fer Fur, RfrA et RfrB régulent des gènes spécifiques à *S. Typhi*. Lors de la caractérisation de l'opéron fimbriaire *tcf*, présent chez *S. Typhi* mais absent du génome de *S. Typhimurium*, l'identification d'un site de liaison putatif du régulateur Fur dans la région promotrice du gène *tcfA* a mené à l'analyse de la régulation de ce fimbriae par les régulateurs de l'homéostasie du fer. Cet article présente dans un premier temps la caractérisation du fimbriae Tcf lors de l'interaction avec les cellules de l'hôte et l'expression de l'opéron dans diverses conditions de croissance. Dans un deuxième temps, la régulation de l'expression de cet opéron par le fer, la protéine Fur et les petits ARN RfrA et RfrB a été évaluée à l'aide d'une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de *tcfA* et le gène rapporteur *lacZ*. Cet article sera soumis à un processus de révision par les pairs dans le but de le publier dans le journal « Journal of Bacteriology ».

**Article 3 : Leclerc, J. M., Dozois, C. M. and F. Daigle.** Fur regulates the Tcf fimbrial cluster of *Salmonella enterica* serovar Typhi.

### Contribution des auteurs :

Le projet a été élaboré par France Daigle et moi-même. Je suis le seul auteur ayant réalisé les diverses expérimentations. En tant que premier auteur, j'ai contribué de façon majoritaire à l'analyse des résultats et à l'écriture du manuscrit, avec les commentaires de France Daigle et de Charles M. Dozois. Tous les coauteurs ont révisé le manuscrit. Les fonds nécessaires au projet ont été fournis par France Daigle.

## **CHAPITRE 4 – 3<sup>e</sup> Article**

**Fur regulates the Tcf fimbrial cluster of *Salmonella enterica* serovar Typhi**

Jean-Mathieu Leclerc, Charles M. Dozois and France Daigle

RUNNING TITLE: Characterization of the *tcf* fimbrial cluster of *S. Typhi*

Keywords: *Salmonella*; fimbriae; Tcf; expression; pathogenesis; Fur

## ABSTRACT

The *Salmonella enterica* serovar Typhi genome contains a dozen putative fimbrial clusters. The Typhi colonization factor, Tcf fimbriae, is found only in some serovars, and is absent from the genome of the serovar Typhimurium. We hypothesized that the *tcfABCD* operon codes for functional fimbriae having a role in the pathogenicity of serovar Typhi since anti-TcfB antibodies were found in patients with typhoid. Therefore, we investigated the contribution of the fimbrial cluster *tcf* during the interaction with host cells as well as its expression and regulation. An isogenic mutant harboring a deletion of the *tcf* cluster in serovar Typhi did not demonstrate any defect in the adhesion or invasion of human epithelial cells, or in the phagocytosis or survival in macrophages when compared to the wild-type strain. However, introduction of the *tcfABCD* genes on a plasmid in a non-fimbriated *Escherichia coli* K-12 strain contributed to adherence to human epithelial cells. A transcriptional fusion between the promoter of the *tcfA* gene and the *lacZ* reporter gene revealed that *tcf* is transcribed, predominantly during the stationary growth phase in LB medium. The PCR amplification of the *tcfA* promoter region introduced two point mutations localized at positions -197 and -81 upstream the ATG start of *tcfA*. The presence of the two point mutations in the *tcfA* promoter region increased *tcf* expression. Site-directed mutagenesis was used to obtain constructs harbouring single point mutation (-197T/C or -81G/A) in the promoter region of *tcfA*. Surprisingly, when only one single point mutation was present, *tcf* expression decreased. Analysis of the promoter region identified putative binding sites for the global regulators RcsB, ArgR and Fur. *tcf* expression was measured in isogenic strains lacking these global regulators and the results showed that, under the conditions tested, *tcf* expression is repressed by Rcs and activated by Fur. Fur regulated this fimbrial cluster indirectly via the sRNAs RfrA and RfrB. *tcf* expression was also regulated by iron levels. Thus, we have identified Tcf as a functional fimbriae that can act as an adhesin in *E. coli* K-12 and is regulated by Fur.

## INTRODUCTION

Bacterial adhesion to host cells represents the initial and often critical step for pathogenesis. Adhesion is often mediated by fimbrial adhesins located mostly at the tip of fimbriae, structures found on the bacterial surface and involved in specific interactions with host cells. Little is known on the conditions of expression and the implication of each fimbrial adhesin. Usually, fimbriae are not constitutively expressed and are produced only under specific environmental conditions (Neidhardt *et al.*, 1996). It has been shown that carbon source, aliphatic amino acids, iron, temperature and electron acceptors other than oxygen can regulate fimbrial expression (Neidhardt *et al.*, 1996). Fimbrial expression can be controlled positively or negatively at the genetic level. Some regulatory mechanisms are unique to specific strains and some are shared by many bacteria (Clegg *et al.*, 2011). These mechanisms include invertible DNA elements, DNA methylation, cyclic di-GMP and DNA binding regulators (Clegg *et al.*, 2011).

*Salmonella enterica* isolates are classified into more than 2500 serovars. Some serovars can infect many hosts whereas some serovars display a narrow host range or are specific to only one host species. This is the case for *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), which has no known animal reservoir and is specific to humans, in which it causes the systemic disease typhoid fever. Interestingly, each serovar of *Salmonella* harbors a unique combination of fimbrial gene clusters, suggesting a putative role for fimbriae in host adaptation. Genome sequencing analysis has revealed 13 fimbrial clusters along with a type IVB pilus in the genome of *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001). Five fimbrial operons, *sef*, *sta*, *ste*, *stg*, and *tef*, and the type IV pilus are absent from the genome of serovar Typhimurium, a broad-host range serovar responsible for gastroenteritis in humans (Townsend *et al.*, 2001). Only a few of these fimbriae have been characterized so far.

*Salmonella enterica* harbors many pathogenicity islands (SPI) that are absent from the *E. coli* and some fimbrial clusters are found in these SPI (Porwollik & McClelland, 2003; Sabbagh *et al.*, 2010). SPI-6 contains several genes including the regulatory gene *sinR*, the adhesin/invasin gene *pagN* and the fimbrial gene cluster *saf*. *S. Typhi* specifically contains an additional 8 kb fragment clustered within SPI-6 at the *sinR-pagN* intergenic region that

contains the *tcf* fimbrial cluster (Folkesson *et al.*, 1999). The “Typhi colonizing factor” (Tcf) cluster consists of four genes, *tcfABCD*, which display sequence homology to genes within the *coo* operon encoding CS1 fimbriae from another human-adapted pathogen, enterotoxigenic *Escherichia coli* (Folkesson *et al.*, 1999). It was suggested that Tcf may be involved in host specificity. Tcf is absent from the genome of the closely related serovar Typhimurium and is found only in some serovars, many of which are restricted or adapted to one human or animal host. Indeed, several studies identified the *tcf* genes in a number of non-typhoidal *Salmonella* serovars with different host range (Bronowski & Winstanley, 2009; den Bakker *et al.*, 2011; Suez *et al.*, 2013; Townsend *et al.*, 2001). Like the *E. coli* CS1 fimbriae, Tcf belongs to the alternate chaperone/usher family of the  $\alpha$ -fimbrial clade, a group of fimbriae that contains many human-specific colonization factors (Nuccio & Bäumlner, 2007). The  $\alpha$ -fimbrial gene clusters, including *tcfABCD*, share the same organization in which a gene encoding the chaperone is followed by genes encoding the major subunit, the usher, and the tip adhesin (Nuccio & Bäumlner, 2007). Little is known about the role of Tcf in the pathogenicity of *S. Typhi*. It was shown that *tcfA* is expressed at high salt concentrations but Tcf did not seem to be used for adhesion or invasion of epithelial cells (Bishop *et al.*, 2008). Furthermore, antibodies against TcfB were detected in the blood of patients with typhoid fever (Harris *et al.*, 2006), suggesting that this fimbriae may play a role in the host specificity of *S. Typhi*. However, the regulatory mechanisms that control the expression of the *tcf* genes are still unknown.

In this study, we investigated the role of *tcf* during the interaction with host cells and characterized its expression and regulation. The absence of Tcf had little impact during the interaction of *S. Typhi* with cells but it may still act like an adhesin. The *tcf* genes were expressed in different growth conditions, with the highest levels in the stationary growth phase. Furthermore, *tcf* expression was regulated by Rcs and Fur, and Fur regulation of *tcf* seemed to be indirect via the sRNAs RfrA and RfrB.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Strains and plasmids used in this study are described in Table 1. Bacteria were routinely grown overnight with agitation in Luria-Bertani (LB) broth at 37 °C and on LB agar plates, except when indicated otherwise. When required, antibiotics or supplements were added at the following concentrations: 50 µg kanamycin ml<sup>-1</sup>, 50 µg ampicillin ml<sup>-1</sup>, 34 µg chloramphenicol ml<sup>-1</sup>, 50 µg diaminopimelic acid ml<sup>-1</sup> (DAP) and 40 µg X-gal ml<sup>-1</sup>. Iron-limiting conditions were created by the addition of 200 µM 2,2'-dipyridyl to LB medium. Transformation of bacterial strains was done by using the calcium/manganese based (CCMB) or electroporation methods as previously described (O'Callaghan & Charbit, 1990).

### Construction of isogenic deletion mutants of *S. Typhi*

A suicide vector was constructed for the deletion of the *tcf* fimbrial operon from *S. Typhi*. A 578 bp fragment of the 5' end of the *tcfA* gene from *S. Typhi* was generated by PCR using primers *tcfAFprom* and *tcfARover*, and a 226 bp fragment of the 3' end of the *tcfD* gene was generated by PCR using primers *tcfDFover* and *tcfDR*. These two fragments were joined by overlapping the sequences in a second PCR reaction using primers *tcfAFprom* and *tcfDR*. The resulting fragment harbouring an internal deletion of *tcf* was cloned into the *XbaI* and *NotI* sites of pMEG-375 to create pSIF098. Allelic replacement of the *tcf* region was done as described previously (Faucher *et al.*, 2009; Kaniga, 1991). The isogenic *tcf* mutant strain harbors a complete deletion of the *tcf* region which was confirmed by PCR (data not shown). A similar approach was used to create isogenic *argR* and *rcsDBC* deletion mutants as well as the mutants for the genes *fur*, *rfrA* and *rfrB*, which were previously described (Leclerc *et al.*, 2013). All the primers used for these constructions are described in Table 2.

### Cloning of the *tcf* fimbrial cluster

The *tcf* operon was amplified from genomic DNA of the *S. Typhi* strain ISP1820 using the Elongase enzyme mixture (Invitrogen) with primers *tcfAFprom* and *tcfDR* (Table 2). The 5.8 kb PCR product was purified and cloned into low-copy-number vector pWSK29 (*XbaI/NotI*),

resulting in plasmid pSIF119. The plasmid was transformed into the non-fimbriated *E. coli* K-12 *fim* mutant strain ORN172 (Woodall *et al.*, 1993) or into *S. Typhi*.

### **Generation of a *PtcfA-lacZ* transcriptional fusion and $\beta$ -galactosidase assay**

The *tcfA* promoter region was amplified using the Platinum<sup>®</sup> *Taq* DNA Polymerase enzyme mix (Invitrogen) with *tcfAF*prom (*EcoRI*) and *tcfAR*prom primers. The 578 bp PCR fragment with no mutation was digested with *EcoRI* and *SmaI*, purified and ligated with pRS415 (*EcoRI-SmaI*) (Simons *et al.*, 1987), resulting in plasmid pSIF219. The *tcf* fusion vector was transformed in the *S. Typhi* wild-type strain and the different isogenic mutant strains. Another amplification of the *tcfA* promoter region introduced two point mutations localized at positions -197 and -81 upstream of the ATG start of *tcfA*. Site-directed mutagenesis using overlap-extension PCR (Basso *et al.*, 2002) was used to obtain constructs harbouring single point mutations in the promoter region of *tcfA*. These three fragments were also digested with *EcoRI* and *SmaI* (two point mutations PCR fragment) or *BamHI* (one point mutation PCR fragments), purified and ligated with pRS415 (*EcoRI-SmaI* or *EcoRI-BamHI*), resulting in plasmid pSIF220, pSIF233 and pSIF234. These *tcf* fusion vectors containing point mutations were also transformed in the *S. Typhi* wild-type strain. The *PtcfA-lacZ* transcriptional fusion constructs include 473 bp upstream of *tcfA* gene and 105 bp after the start codon of the gene, and they also include the ribosome binding site and the ATG start site of *tcfA* and *lacZ*. The expression of *tcf* was measured by  $\beta$ -galactosidase assays following growth in different conditions.  $\beta$ -galactosidase activity was measured using *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as described previously (Miller, 1972). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the replicate experiments. Statistical differences were assessed using Student's unpaired *t*-test.

### **Interactions with human epithelial cells**

INT-407 (Henle) cells (ATCC CCL-6) were grown in minimal essential medium (Wisent) supplemented with 10 % (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Wisent) and 25 mM HEPES (Wisent). For the adherence and invasion assays,  $2 \times 10^5$  cells were seeded in 24-well tissue culture plates 24 h before the assays. An hour before infection, cells were washed 3 times with prewarmed phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and fresh complete medium was added to each well. *S. Typhi* strains were grown overnight without agitation in LB

containing 0.3 M NaCl (SPI-1-inducing conditions) (Bajaj *et al.*, 1996), and added to each well at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 20:1. *E. coli* strains were grown overnight without shaking in LB and added to each well at a m.o.i. of 100:1. The 24-well plates were then centrifuged at 800 x g for 5 min to synchronize infection, incubated at 37 °C in 5% (v/v) CO<sub>2</sub> for 90 min to assess the adherence level and rinsed three times with PBS. Extracellular bacteria were killed by an additional incubation period of 90 min with 100 µg gentamicin ml<sup>-1</sup>, to assess the invasion level of the *S. Typhi* strains. Cells were lysed after 90 min or 180 min by addition of PBS-DOC 0.1 % (deoxycholic acid sodium salt), and samples were diluted and spread on LB plates for enumeration by viable colony counts. Results are expressed as the mean ± SEM of the replicate experiments. Statistical differences were assessed using Student's unpaired *t*-test.

### **Infection of cultured macrophages**

The human monocyte cell line THP-1 (ATCC TIB-202) was maintained in RPMI 1640 (Wisent) containing 10 % (v/v) heat-inactivated FBS (Wisent), 1 mM sodium pyruvate (Wisent) and 1 % modified Eagle's medium (MEM) with non-essential amino acids (Wisent). A stock culture of these cells was maintained as monocyte-like, non-adherent cells at 37 °C in an atmosphere containing 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>. For macrophage infection, cells were seeded at 5x10<sup>5</sup> cells per well in 24-well tissue-culture dishes and were differentiated by addition of 10<sup>-7</sup> M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma) for 48 h. Macrophage infection was performed as described previously unless specified otherwise (Daigle *et al.*, 2001). Briefly, bacteria were grown overnight without agitation in LB to an OD<sub>600</sub> of 0.6. Bacteria were added to the cell monolayer at a m.o.i. of 10:1, and plates were centrifuged for 5 min at 800 g to synchronize bacterial uptake. After 20 min of incubation at 37 °C, extracellular bacteria were removed by washing cells three times with prewarmed PBS, and the infected monolayers were either lysed with PBS-DOC (0 h) or incubated for 2 h in media containing 100 µg gentamicin ml<sup>-1</sup> (Wisent) to kill extracellular bacteria, and then with 12 µg gentamicin ml<sup>-1</sup> for the rest of the experiment. The number of surviving bacteria was determined as colony forming units (c.f.u.) by plating on LB-agar. Results are expressed as the mean ± SEM of at least three experiments done in duplicate. Statistical differences were assessed using Student's unpaired *t*-test.

## RESULTS

### Role of Tcf during the interaction of *S. Typhi* with host cells

Since fimbriae are normally important during the early interactions with host epithelial cells, the potential role of the *tcf* fimbrial operon during the interaction of *S. Typhi* with INT-407 epithelial cells was evaluated. Adherence was measured after 90 min and invasion after 180 min of interaction between the bacteria and cells. Initially, the effect of a complete deletion of the *tcfABCD* fimbrial cluster was investigated. No difference was observed in the number of bacteria associated with epithelial cells after 90 min and 180 min between the *tcf* mutant and the wild-type strain (Fig. 1a), which suggested that Tcf does not play an essential role in the adherence or invasion of *S. Typhi*.

Then, the complete *tcf* cluster was cloned in the low-copy plasmid pWSK29 and the construction was transformed in an afimbriated noninvasive strain of *E. coli* widely used to express foreign fimbriae (ORN172) (Woodall *et al.*, 1993). The introduction of *tcf* into *E. coli* conferred a significantly higher level of adherence to epithelial cells, which was twofold higher than the level of adherence of the strain with the empty vector (Fig. 1b).

Since *S. Typhi* is phagocytized by macrophages and survives within these cells during the infection of the human host, and that some *Salmonella* fimbrial clusters were shown to be involved in the interaction with macrophages or in the long-term infection process (Edwards *et al.*, 2000; Forest *et al.*, 2007; Klumpp & Fuchs, 2007; Lawley *et al.*, 2006; van der Velden *et al.*, 1998), the role of *tcf* was investigated during the interaction of *S. Typhi* with human THP-1 macrophages. Phagocytosis was measured after 20 minutes (0 h) and survival after 2 h and 24 h of interaction between the bacteria and cells. Slight differences in the amounts of bacteria recovered at each time point were observed between the wild-type and *tcfABCD* mutant strains (Fig. 2). However, none of these effects was statistically significant. Thus, the Tcf fimbrial cluster was not important for the interaction with human macrophages.

Collectively, these results indicated that under the *in vitro* conditions tested, Tcf has a limited role in interaction with host cells, but that the *tcf* fimbrial cluster encodes a functional fimbriae playing a role in adherence when expressed in an afimbriated *E. coli* strain.

### **Expression of *tcf***

To study the regulation of the *tcf* operon, a transcriptional fusion between the *tcfA* promoter and the *lacZ* gene coding for the  $\beta$ -galactosidase was constructed in plasmid pRS415 and introduced into *S. Typhi* strain ISP1820. The effect of the growth phase on *tcf* expression was investigated with bacteria grown in LB with agitation.  $\beta$ -galactosidase expression was low during the exponential phase and increased in stationary phase (Fig. 3). The expression reached its maximum level after 24 hours of incubation (o/n shaking). The effect on *tcf* expression of the bacterial growth conditions used for the infection of the host cells was investigated. Macrophages were infected with bacteria grown overnight in LB without agitation (o/n standing). *tcf* expression was significantly higher when bacteria were grown with agitation (o/n shaking) compared with bacteria grown without agitation (o/n standing), the latter having  $\beta$ -galactosidase activity similar to what was observed in late log phase with agitation (Fig. 3). Epithelial cells were infected with bacteria grown overnight in LB containing 0.3 M NaCl without agitation (o/n standing 0.3 M NaCl). These conditions were used to obtain the highest expression of SPI-1 genes and the highest invasion levels (Bajaj *et al.*, 1996), and it was shown in a previous study that these conditions induce the expression of *tcfA* (Bishop *et al.*, 2008). However, the transcription of *tcf* was not induced under these conditions (Fig. 3). The bacteria grown without agitation with low or high salt levels had similar  $\beta$ -galactosidase activity, so it suggested that *tcf* expression is not influenced by the concentration of salt. Finally, *tcf* expression was high when bacteria were grown on solid medium, but *tcf* expression was significantly lower on LB agar when compared with bacteria grown in LB with agitation (o/n shaking) (Fig. 3).

### **Regulation of *tcf* expression**

When constructing the *tcfA-lacZ* fusion, we had observed a clone exhibiting a darker blue phenotype on LB-agar containing X-gal (data not shown). The plasmid (pSIF220) was extracted and sequenced. The data showed that 2 different point mutations were acquired

upstream of the promoter region of *tcfA*. Indeed, a C was present at position -197 upstream of the ATG start instead of a T (-197T/C), and an A was present instead of a G at position -81 (-81G/A) (Fig. 4a). Site-directed mutagenesis was done to introduce single mutations in the *tcfA* promoter at position -197 or at position -81. *S. Typhi* strains containing *lacZ* fusions with the *tcfA* promoter that contained no mutation (*PtcfA* WT), both mutations (*PtcfA* -197T/C -81G/A) or the single mutations (*PtcfA* -197T/C or *PtcfA* -81G/A) (fig. 4b) were used to determine the role of each mutation on *tcf* expression using the  $\beta$ -galactosidase assay. When grown overnight in LB with agitation, the strain containing both point mutations in the *tcfA* promoter had significantly higher *tcf* transcription compared to the strain with no mutation (Fig. 5a), confirming that the darker blue colony phenotype observed with this strain on X-gal plate is caused by an increased in  $\beta$ -galactosidase activity. Surprisingly, in strains containing only a single point mutation in the *tcfA* promoter (*PtcfA* -197T/C or *PtcfA* -81G/A), *tcf* expression was significantly lower than the expression observed in the (*PtcfA* -197T/C -81G/A) and (*PtcfA* WT) strains (Fig. 5a). Thus, under these *in vitro* conditions, when only one point mutation is present in the *tcfA* promoter, *tcf* expression decreased, and when both mutations are present, *tcf* expression increased.

To understand the regulation involved in *tcf* transcription, a detailed analysis of the putative regulatory region was performed. Putative binding sites for RcsB, Fur, H-NS and ArgR were identified in the *tcfA* promoter region using the bacterial promoters analysis softwares Virtual Footprint and Softberry Bprom (Fig. 4a). The putative RcsB binding site overlapped with the -197 point mutation, the putative Fur and H-NS binding sites were located between the two point mutations, and the putative ArgR binding site overlapped with the -81 point mutation (Fig. 4a). The putative regulation by the global regulators RcsB, Fur and ArgR was evaluated by generating an isogenic *S. Typhi rcsDBC* mutant, a *fur* mutant and an *argR* mutant. The *tcfA-lacZ* reporter plasmid was transformed into the mutant strains and the  $\beta$ -galactosidase production was measured from strains grown overnight in LB with agitation. No difference in *tcf* expression was observed when comparing the *argR* mutant with the wild-type strain (Fig. 5b). However, the transcription of *tcf* was significantly influenced by Rcs and by Fur. The expression of *tcf* increased in the *rscDBC* mutant and strongly decreased in the *fur* mutant in

comparison to the wild-type (Fig. 5b). Therefore, the presence of Rcs and the iron regulator Fur respectively inhibits and activates the expression of the *tcf* fimbrial cluster.

### **Role of iron levels, the Fur regulator and RfrA/RfrB sRNAs in regulation of *tcf* expression**

To determine whether Fur regulation of *tcf* was direct or indirect, the role of the sRNAs RfrA and RfrB in *tcf* regulation was evaluated by generating different isogenic *S. Typhi* *rfrA* and *rfrB* mutants and the deletions were also introduced in the *fur* mutant background to generate the double mutants *fur/rfrA* and *fur/rfrB*, and the triple mutant *fur/rfrA/rfrB*. The *tcfA-lacZ* reporter plasmid was transformed into the mutant strains and  $\beta$ -galactosidase production was measured from strains grown overnight in LB with agitation under iron-rich and iron-limiting conditions. Under iron-rich conditions, *tcf* transcription was lower in the *fur* mutant (Fig. 6), confirming our previous observations (Fig. 5b). No difference in *tcf* expression was observed when comparing the *rfrA*, *rfrB* or *rfrA/rfrB* mutant strains with the wild-type strain, these sRNAs being normally repressed by Fur in these culture conditions. Interestingly, *tcf* expression increased with the loss of one or both sRNAs in the *fur* mutant (Fig. 6). Indeed, *tcf* expression was significantly higher in the double and triple mutant strains compared to the single *fur* mutant, and expression was even higher than for the wild-type strain in the *fur/rfrA* and *fur/rfrA/rfrB* mutants. Thus, expression of the sRNAs in the *fur* mutant, especially RfrA, inhibited the expression of the *tcf* fimbrial cluster.

In addition, since the Fur regulator is activated by  $\text{Fe}^{2+}$  and that the regulation of its target genes is iron-dependent, the regulation of *tcf* by iron levels was investigated. Expression of *tcf* was lower under iron-limiting conditions for each strain (Fig. 6). Indeed, *tcf* expression was about 4-fold lower in iron-limiting conditions compared to iron-rich conditions in the wild-type strain, suggesting that the presence of iron induced the expression of the *tcf* fimbrial cluster. This result is in accordance with the Fur-dependent induction of *tcf* expression, because Fur is inactivated in iron-limiting conditions. Even so, a lower level of expression was observed in the *fur* mutant in these conditions, and *tcf* expression slightly increased in the *fur* mutant strains containing one or both sRNA mutations (Fig. 6). Finally, a slight increase in expression of *tcf* was observed in the single and double mutants *rfrA*, *rfrB* and *rfrA/rfrB*

compared to the wild-type strain under iron-limiting conditions (Fig. 6). Overall, the presence of the chelating agent 2,2'-dipyridyl severely affected the expression of the *tcf* cluster, and this could be due to the inactivation of *fur* and/or to a potential adverse effect of this chelator on the growth of *S. Typhi* strains affecting global gene expression.

Globally, these results indicated that the expression of the *S. Typhi* *tcf* fimbrial cluster is regulated by iron levels and by the global regulator Fur. Activation of *tcf* expression by Fur could potentially be done by indirect mechanisms involving the sRNAs RfrA and RfrB, or by direct regulation, since a putative Fur binding site was found in the promoter region of *tcfA*.

## DISCUSSION

In this study, the role of the *tcf* cluster of *S. Typhi* during the interaction with host cells, and its expression and regulation were investigated. As fimbriae are normally used to mediate adherence to host cells, we compared the interaction of the wild-type and isogenic *tcf* deletion mutant strains with epithelial cells. No significant difference was observed between the adhesion and the invasion levels of both strains (Fig. 1a), confirming previous experiments that used a 4°C adhesion assay (Bishop *et al.*, 2008). It is unusual to see a single fimbrial cluster having a role in virulence of *Salmonella*, and the role of fimbriae in adhesion or invasion is particularly associated with the type 1 fimbriae *fim* cluster and the type IVB pili (Bäumler *et al.*, 1996; Bravo *et al.*, 2011; Misselwitz *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2000). Some *Salmonella* fimbrial clusters were shown to be involved in the interaction with macrophages in different *in vitro* experiments or in the long-term infection process in different *in vivo* models (Edwards *et al.*, 2000; Forest *et al.*, 2007; Klumpp & Fuchs, 2007; Lawley *et al.*, 2006; van der Velden *et al.*, 1998). Thus, we also evaluated the role of the *tcf* mutant in the interaction with human cultured macrophages, and despite the slight variations in the number of bacteria recovered during the infection for the wild-type and the *tcf* mutant strains, no statistically significant difference was observed (Fig. 2).

Bacteria can exploit more than one virulence factor for the same function. Redundancy is usually seen during the adhesion process of bacteria, which can use multiple adhesins to increase the affinity of their interaction with host cells (Virji, 2009). Bacteria that are host-restricted commonly depend on redundancy to evade the host's immune system by alternating the expression of surface structure components through a process called phase variation (Virji, 2009). It is thus possible that the true function of Tcf was masked by the presence of another system during the interaction with epithelial cells and macrophages, as *S. Typhi* harbours a dozen different fimbrial systems as well as plenty of other putative adhesins (Forest & Daigle, 2012; Townsend *et al.*, 2001). However, some *Salmonella* adhesins and several fimbrial genes are absent or are pseudogenes in *S. Typhi*, a consequence of its specialized lifestyle inside its human host (Wagner & Hensel, 2011), suggesting that the intact Tcf fimbrial cluster could have a role in interaction with host cells. Since the *tcf* cluster is found mostly in the genome of serovars causing typhoid fever, it might be involved during the

systemic phase of infection, during interactions with other cell types such as dendritic cells or neutrophils, or even during biofilm formation within the gallbladder of asymptomatic carriers (Forest & Daigle, 2012; Nuccio *et al.*, 2011). In addition, in human serum, antibodies against TcfB were detected following typhoid fever (Harris *et al.*, 2006), suggesting Tcf production during the infection. While we cannot discount a role for Tcf in human infection, we have shown that this fimbrial cluster is dispensable for the interaction of *S. Typhi* with epithelial and macrophage cells under the conditions described here.

In order to directly investigate a role for Tcf in adherence, we have added the *tcf* cluster in a non-fimbriated *E. coli* strain. The adhesion to epithelial cells was significantly higher in the presence of *tcf* (Fig. 1b). Such an adhesion phenotype depending of fimbrial genes expressed in *E. coli* strains was observed for other *Salmonella* fimbriae, such as Stg and Sef (Forest *et al.*, 2007; Rank *et al.*, 2009), confirming that fimbriae can contribute to the interaction with host cells.

Fimbriae are usually poorly expressed in laboratory media (Forest *et al.*, 2007; Humphries *et al.*, 2003; Korea *et al.*, 2010). The *tcfA-lacZ* transcriptional fusion cloned in the multicopy vector pRS415 provided us with the opportunity to measure the transcription levels of the *tcf* genes in a multicopy background, allowing us to more readily detect slight changes in gene expression. In our study, *tcfA* was expressed in LB, with the highest level of expression observed during stationary phase of cultures grown with agitation and on solid medium (Fig. 3). High expression in stationary phase was previously observed for several fimbriae of *E. coli* O157:H7 (Low *et al.*, 2006) as well as for Stg of *S. Typhi* (Forest *et al.*, 2007). However, a previous study that determined the transcription levels of *S. Typhi* fimbriae by RT-PCR showed that *tcfA* expression is low in the stationary phase of cultures grown with agitation, and it was enhanced in bacteria grown overnight without agitation with high-salt concentrations (SPI-1-inducing conditions) (Bishop *et al.*, 2008). Our results showed that the transcription of *tcf* was not induced under the SPI-1-inducing conditions and was not influenced by addition of salt when grown overnight without agitation (Fig. 3). The differences in *tcf* expression in the two studies may be due to the methods used (RT-PCR vs transcriptional fusion) or the strains used (BRD948, a derivative of Ty2 vs ISP1820). Maximal expression in stationary phase of cultures grown with agitation could explain the absence of a

defective phenotype of the *tcf* mutant in virulence, because infection of host cells was done with bacteria grown without agitation, where *tcf* is poorly expressed. Overall, we have shown that the *S. Typhi tcf* cluster can be expressed during *in vitro* growth conditions.

Regulation of gene expression is usually done by the binding of regulatory proteins in the region of the promoter, and mutations in this region can affect transcription by altering the affinity of a protein (regulator or RNA polymerase) to its binding site. Two point mutations located upstream of the promoter region of *tcfA*, at position -197 and -81 before the first ATG, affected the transcription of this gene cluster, since the double mutation increased the expression of *tcf* and the two single point mutations decreased *tcf* expression (Fig. 5a). We hypothesized that these mutations could have modified the binding affinity of putative regulators, and an analysis of the regulatory region of *tcfA* identified putative binding sites for the regulators RcsB, Fur, H-NS and ArgR (Fig. 4a). The putative binding site for H-NS was located between the two point mutations and the presence of this binding site was not unexpected, because H-NS is known to repress the transcription of many fimbriae (Corcoran & Dorman, 2009; Korea *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2006; Murphree *et al.*, 1997; Nicholson & Low, 2000; Ogasawara *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2007; White-Ziegler *et al.*, 2000). Interestingly, H-NS repressed the expression of the *E. coli coo* operon encoding the CS1 fimbriae, a homolog of Tcf (Murphree *et al.*, 1997). Thus, inhibition of *tcf* expression by H-NS is expected. Furthermore, the putative binding site of ArgR overlapped with the -81G/A point mutation, however the absence of ArgR had no effect on the transcription of *tcfA*. ArgR is a repressor of arginine metabolism genes and is involved in Xer-mediated recombination as an accessory factor (Lu *et al.*, 1992; Paul & Summers, 2004). Its role as a regulator of fimbrial expression has not been demonstrated.

A putative binding site for the global regulator RcsB was found in a distant region upstream of the first ATG of *tcfA*. We showed that the Rcs phosphorelay system represses *tcf* expression, since the  $\beta$ -galactosidase activity increased in the *rcsDBC* mutant (Fig. 5b). Since the putative binding site of RcsB overlaps with the -197T/C point mutation, and that *tcf* expression decreased with this mutation, the nucleotide change (cytosine instead of thymine) may have increased the affinity of RcsB to the DNA and hence the repression of *tcf* operon. Rcs has been involved in the regulation of fimbrial gene expression in different bacteria, in particular

in the repression of the *pil* genes coding for the *S. Typhi* type IVB pili (Lee *et al.*, 2006; Lehti *et al.*, 2012; Schwan *et al.*, 2007; Vianney *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Thus, Rcs may be involved in the regulation of fimbrial cluster restricted to the host-adapted *S. Typhi*.

Iron was previously shown to influence fimbrial expression in *E. coli* (CFA/I and Stg) (Karjalainen *et al.*, 1991; Lymberopoulos *et al.*, 2006) and *Salmonella* (Agf) (Romling *et al.*, 1998), suggesting the implication of the iron regulator Fur. We have shown that iron depletion decrease *tcf* expression (Fig. 6). It is important to note that the utilisation of the metal chelator 2,2'-dipyridyl impaired the growth of different strains, so it may have affected gene expression. However, *fur* is inactivated under these conditions, so it correlated with the decreased expression of *tcf* in the *fur* mutant. Fur is a global regulator activated by Fe<sup>2+</sup> and involved in the regulation of iron homeostasis genes. It binds to a conserved sequence called the Fur box in the DNA promoter region of the regulated genes (Escobar *et al.*, 1999). A putative Fur binding site was found in the 5' region of *tcfA* between the two point mutations, but the sequence showed low homology to the Fur box. The binding of Fur to the putative binding site is then questionable, and regulation of *tcf* expression by Fur could be due to direct or indirect mechanisms. Our data showed that Fur activates *tcf* expression. Fur usually acts as a transcriptional repressor but can sometimes activate the transcription of target genes, mostly by indirect mechanisms (Carpenter *et al.*, 2009). Only one gene, *hilD*, is known to be directly activated by Fur in *Salmonella* (Teixido *et al.*, 2011). To test whether Fur can activate *tcf* expression directly by binding to the region upstream of *tcfA*, a Fur titration assay (FURTA) or an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) will be performed. This would help to determine the role of Fur in *tcf* regulation. There are no fimbriae that are Fur-regulated in *Salmonella*, but Fur is involved in the repression of fimbrial gene clusters in other species, such as CFA/I in enterotoxigenic *E. coli* (Karjalainen *et al.*, 1991) and type IV pili in *Moraxella catarrhalis* (Luke *et al.*, 2004). Fur also activates Stg in avian pathogenic *E. coli* (Lymberopoulos *et al.*, 2006) and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* (Wu *et al.*, 2012), and Fur activation of these two fimbriae was done by indirect mechanisms, even if putative Fur binding sites were found in the *stgA* promoter. These observations suggest that Fur might indirectly activate *tcf* expression in *S. Typhi*.

We have shown that the sRNAs RfrA and RfrB repressed *tcf* expression in the absence of *fur*, since the double and triple mutants *fur/rfrA*, *fur/rfrB* and *fur/rfrA/rfrB* expressed significantly more *tcf* compared to the *fur* mutant under iron-rich conditions (Fig. 6). Fur represses the transcription of the *rfrA* and *rfrB* genes (Leclerc *et al.*, 2013), so when iron is scarce or *fur* is absent, RfrA and RfrB are expressed and hence *tcf* transcription is inhibited. It was previously shown that regulation by these sRNAs is frequently non-redundant (Kim & Kwon, 2013; Leclerc *et al.*, 2013), and our results showed that RfrA impaired *tcf* expression more than RfrB. It is difficult to determine if the regulation of *tcf* expression by these sRNAs is done by direct or indirect mechanisms. The effect of RfrA and RfrB on *tcf* expression could be indirect and could probably arise from a regulation of other Tcf regulators. Since expression of *tcf* was measured at the transcriptional level, regulatory effects of RfrA and RfrB were not completely observed, since sRNAs work essentially by post-transcriptional mechanisms (Vogel, 2009). It could then explain why *tcf* expression in the sRNAs mutants grown in iron-limiting conditions was not close to the expression observed in iron-rich conditions (Fig. 6). As previously mentioned, iron depletion by the metal chelator 2,2'-dipyridyl may also have impaired global gene expression. However, the effect of RfrA and RfrB on *tcf* expression could be done by direct mechanisms. In *E. coli*, RyhB binds to the 5'UTR region of its RNA targets and causes rapid degradation of the RNA transcripts (Masse *et al.*, 2003). Thus, if RfrA or RfrB binds to the 5'UTR of *tcfA* found in the *PtcfA-lacZ* transcriptional fusion, the *tcfA-lacZ* transcript is degraded and a lower level of  $\beta$ -galactosidase is produced.

To conclude, fimbriae are induced at specific moments during the infection, probably in order to avoid recognition by the host's immune system (Virji, 2009). Since fimbriae are exposed to the immune system, they are candidates for vaccine development. It is important to understand the regulation and the role played by each fimbrial operon, since some fimbriae can negatively affect the immune system's response (Pascual *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2005). This is the first report demonstrating that the Tcf fimbrial cluster of *S. Typhi* could be functional and that Fur and the sRNAs RfrA and RfrB play a role in the regulation of *tcf* expression.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This research was supported by a Discovery grant (251114-12) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). J.-M.L. was supported by a postgraduate scholarship from NSERC.

## REFERENCES

- Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C. & Lee, C. A. (1996).** Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**, 703-714.
- Basso, H., Rharbaoui, F., Staendner, L. H., Medina, E., García-Del Portillo, F. & Guzmán, C. A. (2002).** Characterization of a novel intracellularly activated gene from *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* **70**, 5404-5411.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M. & Heffron, F. (1996).** Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**, 1862-1865.
- Bishop, A., House, D., Perkins, T., Baker, S., Kingsley, R. & Dougan, G. (2008).** Interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion. *Microbiology* **154**, 1914-1926.
- Bravo, D., Blondel, C. J., Hoare, A., Leyton, L., Valvano, M. A. & Contreras, I. (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.
- Bronowski, C. & Winstanley, C. (2009).** Identification and distribution of accessory genome DNA sequences from an invasive African isolate of *Salmonella* Heidelberg. *FEMS Microbiol Lett* **298**, 29-36.
- Carpenter, B. M., Whitmire, J. M. & Merrell, D. S. (2009).** This is not your mother's repressor: the complex role of *fur* in pathogenesis. *Infect Immun* **77**, 2590-2601.
- Clegg, S., Wilson, J. & Johnson, J. (2011).** More than one way to control hair growth: regulatory mechanisms in enterobacteria that affect fimbriae assembled by the chaperone/usher pathway. *J Bacteriol* **193**, 2081-2088.
- Corcoran, C. P. & Dorman, C. J. (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.
- Daigle, F., Graham, J. & Curtiss, R. r. (2001).** Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol Microbiol* **41**, 1211-1222.
- den Bakker, H. C., Moreno Switt, A. I., Govoni, G., Cummings, C. A., Ranieri, M. L., Degoricija, L., Hoelzer, K., Rodriguez-Rivera, L. D., Brown, S. & other authors (2011).** Genome sequencing reveals diversification of virulence factor content and possible host adaptation in distinct subpopulations of *Salmonella enterica*. *BMC Genomics* **12**, 425.

- Edwards, R., Schifferli, D. & Maloy, S. (2000).** A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1258-1262.
- Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1999).** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**, 6223-6229.
- Faucher, S., Forest, C., Béland, M. & Daigle, F. (2009).** A novel PhoP-regulated locus encoding the cytolysin ClyA and the secreted invasin TaiA of *Salmonella enterica* serovar Typhi is involved in virulence. *Microbiology* **155**, 477-488.
- Folkesson, A., Advani, A., Sukupolvi, S., Pfeifer, J., Normark, S. & Löfdahl, S. (1999).** Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. *Mol Microbiol* **33**, 612-622.
- Forest, C., Faucher, S. P., Poirier, K., Houle, S., Dozois, C. M. & Daigle, F. (2007).** Contribution of the *stg* fimbrial operon of *Salmonella enterica* serovar Typhi during interaction with human cells. *Infect Immun* **75**, 5264-5271.
- Forest, C. G. & Daigle, F. (2012).** Molecular Armory of *S. Typhi*: Deciphering the Putative Arsenal of Our Enemy. In *Salmonella - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*, pp. 405-428. Edited by B. A. Annous & J. B. Gurtler: InTech.
- Harris, J., Baresch-Bernal, A., Rollins, S., Alam, A., LaRocque, R., Bikowski, M., Peppercorn, A., Handfield, M., Hillman, J. & other authors (2006).** Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* **74**, 5161-5168.
- Humphries, A. D., Raffatellu, M., Winter, S., Weening, E. H., Kingsley, R. A., Droleskey, R., Zhang, S., Figueiredo, J., Khare, S. & other authors (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.
- Kaniga, K., Compton, M., Curtiss, R. r. & Sundaram, P. (1998).** Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* **66**, 5599-5606.
- Kaniga, K., I. Delor, and G. Cornelis (1991).** A wide host range suicide vector for improving reverse genetics in gram negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**, 137-141.
- Karjalainen, T. K., Evans, D. G., Evans, D. J., Jr., Graham, D. Y. & Lee, C. H. (1991).** Iron represses the expression of CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *E. coli*. *Microb Pathog* **11**, 317-323.
- Kim, J. N. & Kwon, Y. M. (2013).** Genetic and phenotypic characterization of the RyhB regulon in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol Res* **168**, 41-49.

- Klumpp, J. & Fuchs, T. (2007).** Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. *Microbiology* **153**, 1207-1220.
- Korea, C. G., Badouraly, R., Prevost, M. C., Ghigo, J. M. & Beloin, C. (2010).** *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environ Microbiol* **12**, 1957-1977.
- Lawley, T. D., Chan, K., Thompson, L. J., Kim, C. C., Govoni, G. R. & Monack, D. M. (2006).** Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* **2**, e11.
- Leclerc, J. M., Dozois, C. M. & Daigle, F. (2013).** Role of the *Salmonella enterica* serovar Typhi Fur regulator and small RNAs RfrA and RfrB in iron homeostasis and interaction with host cells. *Microbiology* **159**, 591-602.
- Lee, F. K., Morris, C. & Hackett, J. (2006).** The *Salmonella enterica* serovar Typhi Vi capsule and self-association pili share controls on expression. *FEMS Microbiol Lett* **261**, 41-46.
- Lehti, T. A., Heikkinen, J., Korhonen, T. K. & Westerlund-Wikstrom, B. (2012).** The response regulator RcsB activates expression of Mat fimbriae in meningitic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **194**, 3475-3485.
- Low, A., Holden, N., Rosser, T., Roe, A., Constantinidou, C., Hobman, J., Smith, D., Low, J. & Gally, D. (2006).** Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environ Microbiol* **8**, 1033-1047.
- Lu, C. D., Houghton, J. E. & Abdelal, A. T. (1992).** Characterization of the arginine repressor from *Salmonella typhimurium* and its interactions with the *carAB* operator. *J Mol Biol* **225**, 11-24.
- Luke, N. R., Howlett, A. J., Shao, J. & Campagnari, A. A. (2004).** Expression of type IV pili by *Moraxella catarrhalis* is essential for natural competence and is affected by iron limitation. *Infect Immun* **72**, 6262-6270.
- Lymberopoulos, M., Houle, S., Daigle, F., Léveillé, S., Brée, A., Moulin-Schouleur, M., Johnson, J. & Dozois, C. (2006).** Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract. *J Bacteriol* **188**, 6449-6459.
- Miller, J. H. (1972).** *Experiments in Molecular Genetics*. NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Misselwitz, B., Kreibich, S. K., Rout, S., Stecher, B., Periaswamy, B. & Hardt, W. D. (2011).** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium binds to HeLa cells via Fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking. *Infect Immun* **79**, 330-341.

- Muller, C. M., Dobrindt, U., Nagy, G., Emody, L., Uhlin, B. E. & Hacker, J. (2006).** Role of histone-like proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 5428-5438.
- Murphree, D., Froehlich, B. & Scott, J. R. (1997).** Transcriptional control of genes encoding CS1 pili: negative regulation by a silencer and positive regulation by Rns. *J Bacteriol* **179**, 5736-5743.
- Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & other authors, (editors) (1996).** *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Second Edition edn. Washington D. C.: ASM Press.
- Nicholson, B. & Low, D. (2000).** DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **35**, 728-742.
- Nuccio, S. & Bäumler, A. (2007).** Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 551-575.
- Nuccio, S. P., Thomson, N. R., Fookes, M. C. & Bäumler, A. J. (2011).** Fimbrial signature arrangements in *Salmonella*. In *Salmonella from genome to function*, pp. 149-162. Edited by S. Porwollik. Norfolk: Caister Academic Press.
- O'Callaghan, D. & Charbit, A. (1990).** High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. *Mol Gen Genet* **223**, 156-158.
- Ogasawara, H., Yamada, K., Kori, A., Yamamoto, K. & Ishihama, A. (2010).** Regulation of the *Escherichia coli csgD* promoter: interplay between five transcription factors. *Microbiology* **156**, 2470-2483.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K., Thomson, N., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S. & other authors (2001).** Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848-852.
- Pascual, D., Trunkle, T. & Sura, J. (2002).** Fimbriated *Salmonella enterica* serovar typhimurium abates initial inflammatory responses by macrophages. *Infect Immun* **70**, 4273-4281.
- Paul, S. & Summers, D. (2004).** ArgR and PepA, accessory proteins for XerCD-mediated resolution of ColeI dimers, are also required for stable maintenance of the P1 prophage. *Plasmid* **52**, 63-68.
- Porwollik, S. & McClelland, M. (2003).** Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* **5**, 977-989.
- Rank, D. L., Saeed, M. A. & Muriana, P. M. (2009).** Cloning of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis fimbrial protein SefA as a surface protein in *Escherichia coli* confers the ability to attach to eukaryotic cell lines. *Appl Environ Microbiol* **75**, 6622-6625.

- Rice, J., Peng, T., Spence, J., Wang, H., Goldblum, R., Corthésy, B. & Nowicki, B. (2005).** Pyelonephritic *Escherichia coli* expressing P fimbriae decrease immune response of the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* **16**, 3583-3591.
- Romling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K. & Normark, S. (1998).** Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol* **28**, 249-264.
- Sabbagh, S., Forest, C., Lepage, C., Leclerc, J. & Daigle, F. (2010).** So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 1-13.
- Schwan, W. R., Shibata, S., Aizawa, S. & Wolfe, A. J. (2007).** The two-component response regulator RcsB regulates type 1 piliation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 7159-7163.
- Simons, R. W., Houtman, F. & Kleckner, N. (1987).** Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85-96.
- Suez, J., Porwollik, S., Dagan, A., Marzel, A., Schorr, Y. I., Desai, P. T., Agmon, V., McClelland, M., Rahav, G. & other authors (2013).** Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PLoS One* **8**, e58449.
- Teixido, L., Carrasco, B., Alonso, J. C., Barbe, J. & Campoy, S. (2011).** Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator *in vivo* and *in vitro*. *PloS One* **6**, e19711.
- Torres, A. G., Lopez-Sanchez, G. N., Milflores-Flores, L., Patel, S. D., Rojas-Lopez, M., Martinez de la Pena, C. F., Arenas-Hernandez, M. M. & Martinez-Laguna, Y. (2007).** Ler and H-NS, regulators controlling expression of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **189**, 5916-5928.
- Townsend, S., Kramer, N., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., Stevens, K., Maloy, S., Parkhill, J. & other authors (2001).** *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* **69**, 2894-2901.
- van der Velden, A., Bäumlér, A., Tsohis, R. & Heffron, F. (1998).** Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* **66**, 2803-2808.
- Vianney, A., Jubelin, G., Renault, S., Dorel, C., Lejeune, P. & Lazzaroni, J. C. (2005).** *Escherichia coli* *tol* and *rcs* genes participate in the complex network affecting curli synthesis. *Microbiology* **151**, 2487-2497.
- Virji, M. (2009).** Ins and Outs of Microbial Adhesion. *Top Curr Chem* **288**, 139-156.
- Vogel, J. (2009).** A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol* **71**, 1-11.

- Wagner, C. & Hensel, M. (2011).** Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol* **715**, 17-34.
- Wang, Q., Zhao, Y., McClelland, M. & Harshey, R. M. (2007).** The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *J Bacteriol* **189**, 8447-8457.
- Wang, R. F. & Kushner, S. R. (1991).** Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**, 195-199.
- White-Ziegler, C. A., Villapakkam, A., Ronaszeki, K. & Young, S. (2000).** H-NS controls *pap* and *daa* fimbrial transcription in *Escherichia coli* in response to multiple environmental cues. *J Bacteriol* **182**, 6391-6400.
- Woodall, L., Russell, P., Harris, S. & Orndorff, P. (1993).** Rapid, synchronous, and stable induction of type 1 piliation in *Escherichia coli* by using a chromosomal lacUV5 promoter. *J Bacteriol* **175**, 2770-2778.
- Wu, C. C., Lin, C. T., Cheng, W. Y., Huang, C. J., Wang, Z. C. & Peng, H. L. (2012).** Fur-dependent MrkHI regulation of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microbiology* **158**, 1045-1056.
- Zhang, X. L., Tsui, I. S., Yip, C. M., Fung, A. W., Wong, D. K., Dai, X., Yang, Y., Hackett, J. & Morris, C. (2000).** *Salmonella enterica* serovar typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **68**, 3067-3073.

## TABLES AND FIGURES

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

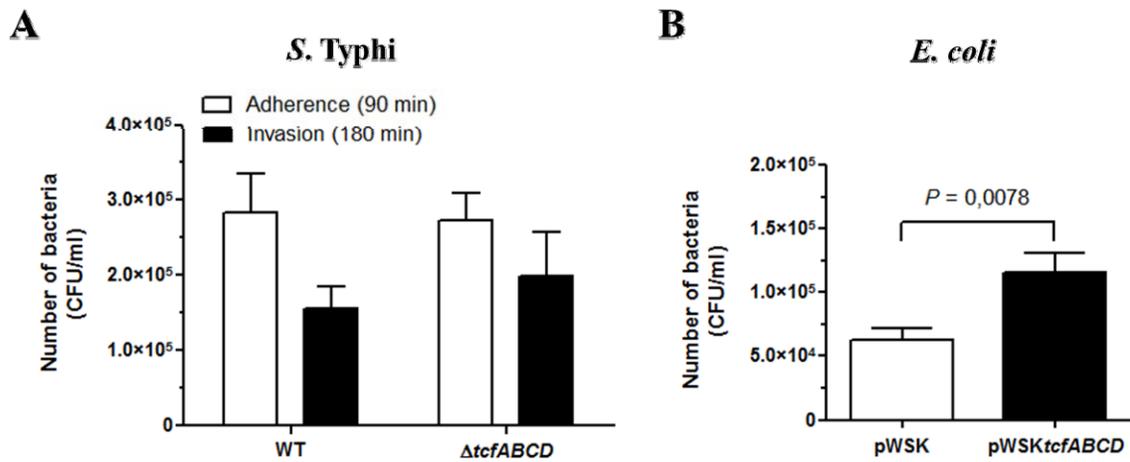
Strain or plasmid	Characteristic	Source or reference
<b>Strains</b>		
<b><i>S. Typhi</i></b>		
WT	ISP1820 wild-type	R. Curtiss III, ASU
$\Delta tcfABCD$	ISP1820 $\Delta tcfABCD$	This study
WT ( <i>PtcfA</i> WT)	ISP1820 (pSIF219)	This study
WT ( <i>PtcfA</i> -197T/C - 81G/A)	ISP1820 (pSIF220)	This study
WT ( <i>PtcfA</i> -197T/C)	ISP1820 (pSIF233)	This study
WT ( <i>PtcfA</i> -81G/A)	ISP1820 (pSIF234)	This study
$\Delta fur$ ( <i>PtcfA</i> WT)	ISP1820 $\Delta fur$ (pSIF219)	This study
$\Delta argR$ ( <i>PtcfA</i> WT)	ISP1820 $\Delta argR$ (pSIF219)	This study
$\Delta rcsDBC$ ( <i>PtcfA</i> WT)	ISP1820 $\Delta rcsDBC$ (pSIF219)	This study
$\Delta rfrA$ ( <i>PtcfA</i> WT)	ISP1820 $\Delta rfrA$ (pSIF219)	This study
$\Delta rfrB$ ( <i>PtcfA</i> WT)	ISP1820 $\Delta rfrB$ (pSIF219)	This study
$\Delta rfrA/rfrB$ ( <i>PtcfA</i> WT)	ISP1820 $\Delta rfrA/rfrB$ (pSIF219)	This study
$\Delta fur/rfrA$ ( <i>PtcfA</i> WT)	ISP1820 $\Delta fur/rfrA$ (pSIF219)	This study
$\Delta fur/rfrB$ ( <i>PtcfA</i> WT)	ISP1820 $\Delta fur/rfrB$ (pSIF219)	This study
$\Delta fur/rfrA/rfrB$ ( <i>PtcfA</i> WT)	ISP1820 $\Delta fur/rfrA/rfrB$ (pSIF219)	This study
<b><i>E. coli</i></b>		
MGN-617	SM10 $\lambda$ pir <i>asd thi thr leu tonA lacY supE recA</i> RP4 2-Tc : :Mu[ $\lambda$ pir] <i>asdA4</i>	(Kaniga <i>et al.</i> , 1998)
ORN172	<i>thr-l leuB thi-1</i> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> ) <i>UI69 xyl-7 ara-13 mtl-2 gal-6 rpsL tonA2 supE44</i> $\Delta$ ( <i>fimBEACDFGH</i> ): : <i>kan pilG1</i>	(Woodall <i>et al.</i> , 1993)
ORN172 (pWSK)	ORN172 (pWSK29)	This study
ORN172 (pWSK <i>tcfABCD</i> )	ORN172 (pSIF119)	This study
<b>Plasmids</b>		
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K</i> , Cm <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	R. Curtiss III, ASU
pRS415	Multicopy vector with a promotorless	(Simons <i>et al.</i> , 1987)

	<i>lacZ</i> reporter gene, Ap <sup>r</sup>	
pSIF098	pMEG-375 with flanking region of <i>tcfA</i> in 5' end and <i>tcfD</i> in 3' end used for <i>tcfABCD</i> deletion	This study
pSIF119	pWSK29 carrying a 5.8 kb fragment of <i>tcfABCD</i>	This study
pSIF130	pMEG-375 with flanking region of <i>fur</i> used for <i>fur</i> deletion	(Leclerc <i>et al.</i> , 2013)
pSIF148	pMEG-375 with flanking region of <i>rscD</i> in 5' end and <i>rscC</i> in 3' end used for <i>rscDBC</i> deletion	This study
pSIF154	pMEG-375 with flanking region of <i>rfrA</i> used for <i>rfrA</i> deletion	(Leclerc <i>et al.</i> , 2013)
pSIF191	pMEG-375 with flanking region of <i>rfrB</i> used for <i>rfrB</i> deletion	(Leclerc <i>et al.</i> , 2013)
pSIF219	pRS415 carrying a 578 bp fragment of the promoter region of <i>tcfA</i>	This study
pSIF220	pRS415 carrying a 578 bp fragment of the promoter region of <i>tcfA</i> with two point mutations at position -197T/C and -81G/A upstream of ATG start codon	This study
pSIF233	pRS415 carrying a 578 bp fragment of the promoter region of <i>tcfA</i> with a point mutation at position -197T/C upstream of ATG start codon	This study
pSIF234	pRS415 carrying a 578 bp fragment of the promoter region of <i>tcfA</i> with a point mutation at position -81G/A upstream of ATG start codon	This study
pSIF352	pMEG-375 with flanking region of <i>argR</i> used for <i>argR</i> deletion	This study
pWSK29	Low copy number cloning vector, Ap <sup>r</sup>	(Wang & Kushner, 1991)

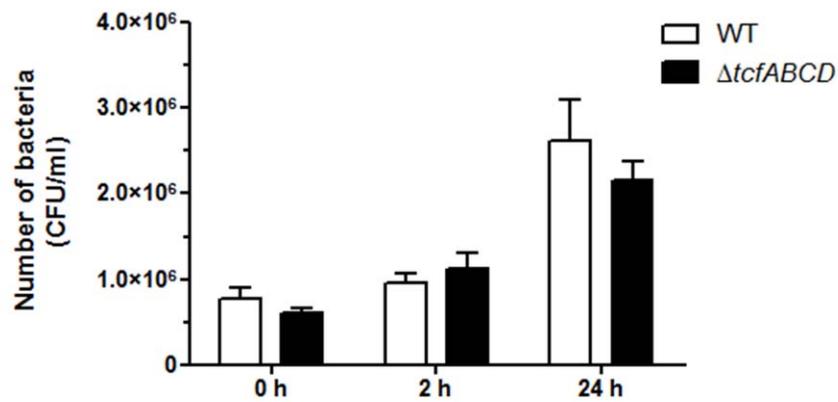
**Table 2.** Primers used in this study

<b>Primer</b>	<b>Sequence (5'–3')*</b>
<i>argR</i> -F	GCTCTAGAGCAACGTTCTACAGGTGGTG
<i>argR</i> -Fover	GCTCGGCTAGCGGCTTTTCCGTAAGAGAT
<i>argR</i> -R	CGGGATCCCCGCTGTCGTTTGAAAAATAA
<i>argR</i> -Rover	AAAAGCCGCTAGCCGAGCTTTCGCATAAGT
<i>fur</i> -F	CGGGATCCCGACATCCTCAACGCCTAA
<i>fur</i> -Fover	AGATTCCGCCACGATGACGCGACTAAA
<i>fur</i> -R	GCTCTAGAGCCTGTGAATAAAAGGCCAG
<i>fur</i> -Rover	GTCATCGTGGCGGAATCTGTCCTGTTG
<i>rcsC</i> -F	GCTCTAGAGATCGTATGCGCCTGTTAGG
<i>rcsC</i> -Rover	TACCGGGAAGGCGATTAAGAGCCAAATGA
<i>rcsD</i> -F	CGGGATCCGCGAAGGTTGTACGCTTTTC
<i>rcsD</i> -Rover	TTAATCGCCTTCCCGGTAGAAGGGAGAAT
<i>rfrA</i> -F	CGGGATCCCGTTGGGTGACCTGAATAG
<i>rfrA</i> -Fover	GTC AACCGCTGTTTCAGCCTGGCTTACT
<i>rfrA</i> -R	GCTCTAGAGCGACATGCCAGGTATCTT
<i>rfrA</i> -Rover	GCTGAAACAGCGGTTGACGGAATTTTCT
<i>rfrB</i> -F	CGGGATCCCATTTGTGGCTGTTTACCGT
<i>rfrB</i> -Fover	TAGATAGCATAACGGCAAATAAACCGCT
<i>rfrB</i> -R	GCTCTAGAGCTGGGGGTTTTCCATAGA
<i>rfrB</i> -Rover	TTGCCGTTATGCTATCTATCCCATATCG
<i>tcfA</i> -Fprom	GCTCTAGACATGATGATCAGTCTATTTGTGGC
<i>tcfA</i> -Fprom (EcoRI)	CGGAATTCCATGATGATCAGTCTATTTGTGGC
<i>tcfA</i> -Rover	TGTCAGGGTAATTTCTGCCGCCATGGGATA
<i>tcfA</i> -Rprom	AATTTCTGCCGCCATGGGATA
<i>tcfA</i> -Rprom (BamHI)	CGGGATCCAATTTCTGCCGCCATGGGATA
<i>tcfD</i> -Fover	GCAGAAATTACCCTGACAACACAACCCTT
<i>tcfD</i> -R	AAGGAAAAAAGCGGCCGAGCAGAACCTCACGCATTGA
<i>tcf</i> -g393a-F	TTAACGCTGAATCATAATTTGCTT
<i>tcf</i> -g393a-R	GAAGCAAATTATGATTCAGCGTT
<i>tcf</i> -t277c-F	CTTTTGGTGAACGAAATCCGTG
<i>tcf</i> -t277c-R	CACGGATTCGTTACCAAAAG

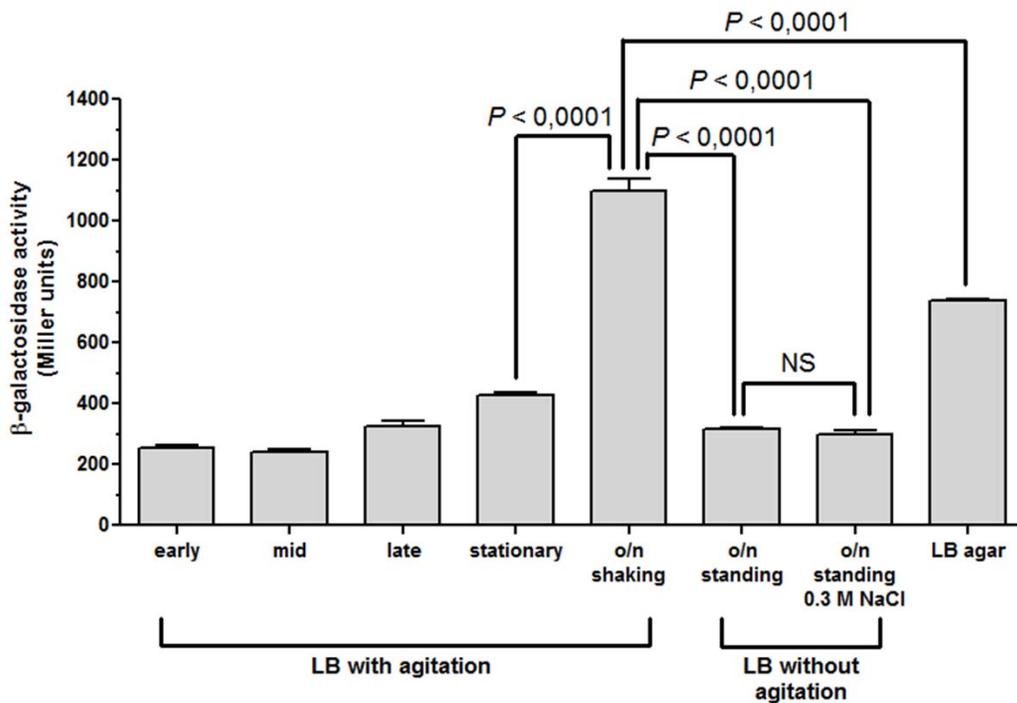
\*Restriction enzyme sites are underlined. Letters in italics denote overlapping sequences.



**Figure 1.** Role of the *tcf* fimbrial cluster during the interaction of *S. Typhi* and *E. coli* with human epithelial cells. (a) INT-407 epithelial cells were infected with the *S. Typhi* ISP1820 wild-type strain and the isogenic *tcfABCD* mutant. The number of bacteria (CFU/ml) associated with the cells was determined after adherence (90 min) and invasion (180 min). (b) INT-407 epithelial cells were infected with *E. coli* strains harbouring the empty vector (pWSK) or the vector with *tcf* cluster (pWSKtcfABCD), and the number of bacteria (CFU/ml) associated with the cells was determined after adherence (90 min). All assays were conducted in duplicate and repeated independently at least three times. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the replicate experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) in the number of bacteria recovered between the different strains were determined by the Student's unpaired *t*-test.



**Figure 2.** Role of the *tcf* fimbrial cluster during the interaction of *S. Typhi* with human macrophages. THP-1 macrophages were infected with the *S. Typhi* wild-type and the isogenic *tcfABCD* mutant strains, and the number of bacteria (CFU/ml) associated with the cells was determined after uptake (0 h) and during survival (2 h and 24 h) in macrophages. All assays were conducted in duplicate and repeated independently at least three times. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the replicate experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) in the number of bacteria recovered between the different strains were determined by the Student's unpaired *t*-test.



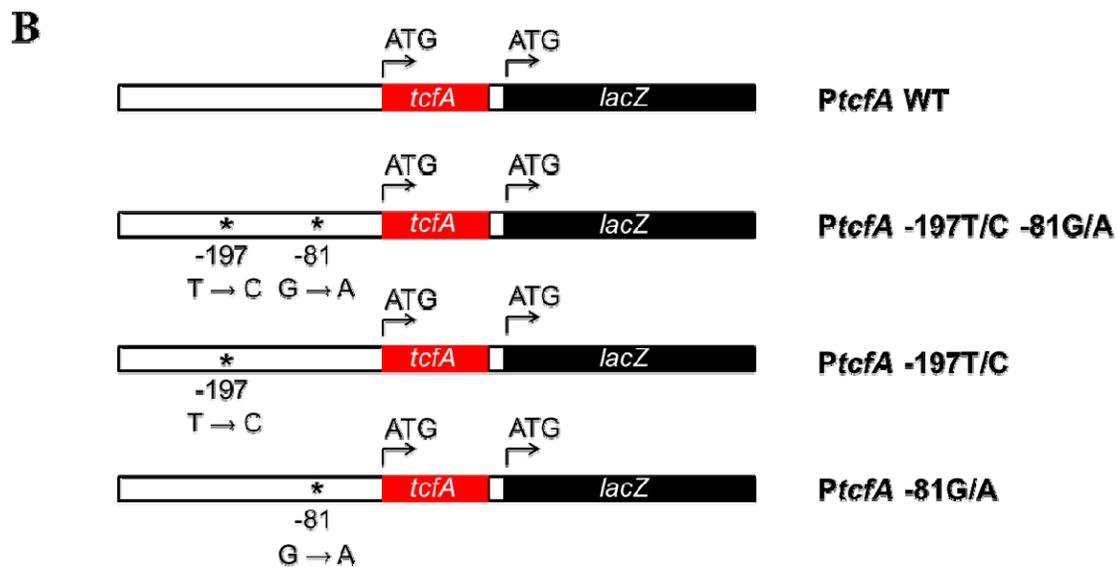
**Figure 3.** *tcf* expression in *S. Typhi*.  $\beta$ -galactosidase activity was measured in strain containing a transcriptional fusion between the *tcfA* promoter and the *lacZ* gene. The *S. Typhi* wild-type strain harbouring this fusion was grown in LB medium with agitation to early log phase ( $OD_{600}$  0.3), mid log phase ( $OD_{600}$  0.6), late log phase ( $OD_{600}$  0.9) and stationary phase ( $OD_{600}$  1.2 and o/n shaking). This strain was also grown without agitation in LB (o/n standing) and in LB containing 0.3 M NaCl (o/n standing 0.3 M NaCl). Finally, the strain was grown on solid medium (LB agar). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three experiments done in triplicate. Significant differences ( $P < 0.05$ ) between the different conditions were determined by the Student's unpaired *t*-test; NS, not significant.

**A**

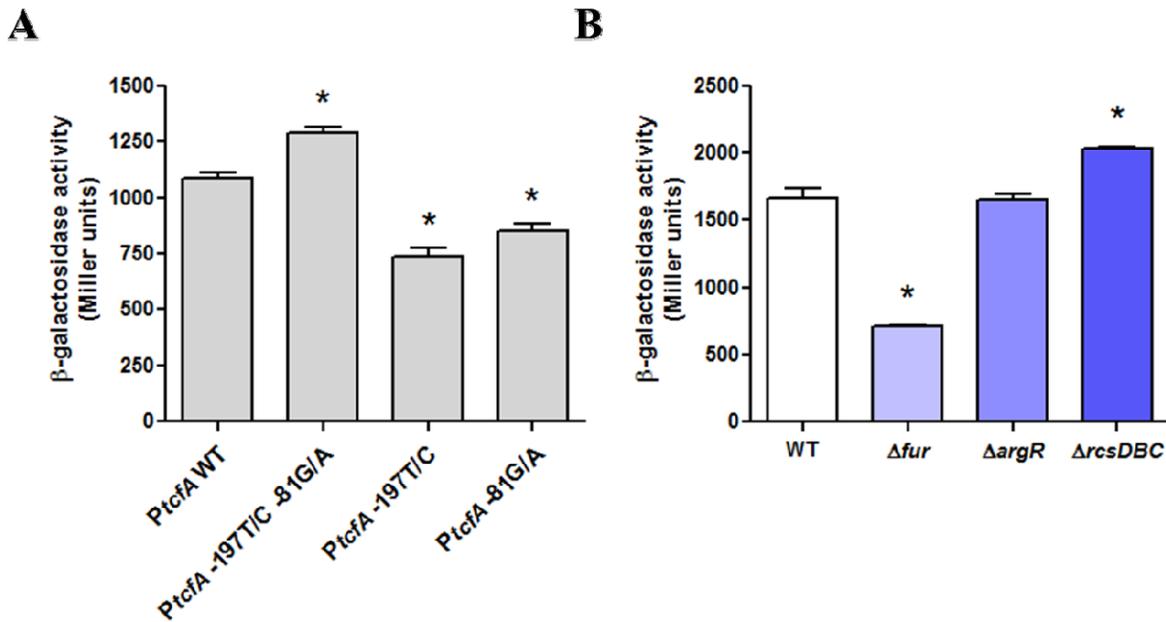
```

catgatgatcagtcctatattgtggctttgtttaaggtttatattggttttagtagtctgaattgtatctccctcctgg
aggcctttcttttagattctctgtctcctacgttggttatgttacgtatttggctttgaaggaggggaaataca
gttccatttatctgagtaagtcaggtaacacagtaacaactttcttatgaagaatttccaaaattttactgcggc
gttattaattgttcagcgattcttacagatctgtcgttcgcttttggtgaaEgaaatccgtggacttttatttac
                                RcsB
taatTTTTTctttcctgaaaaaacagaggtattgagcgaaaaattttattccgtatgatgccctccacacaaaa
                                Fur                                H-NS
tgtattaacgctgaatcGtaatttgcttctttatgctgataactttctgtctatgctaactaaaatttagatg
                                ArgR
acttttatacggtaaaatctggtatgaatTTTaaagatactcttcccggggtgtttctctgtgtcgctatgtttg
catgtggtcatgccagggcgaatatgctcgtttatcccatggcggcagaaaatt

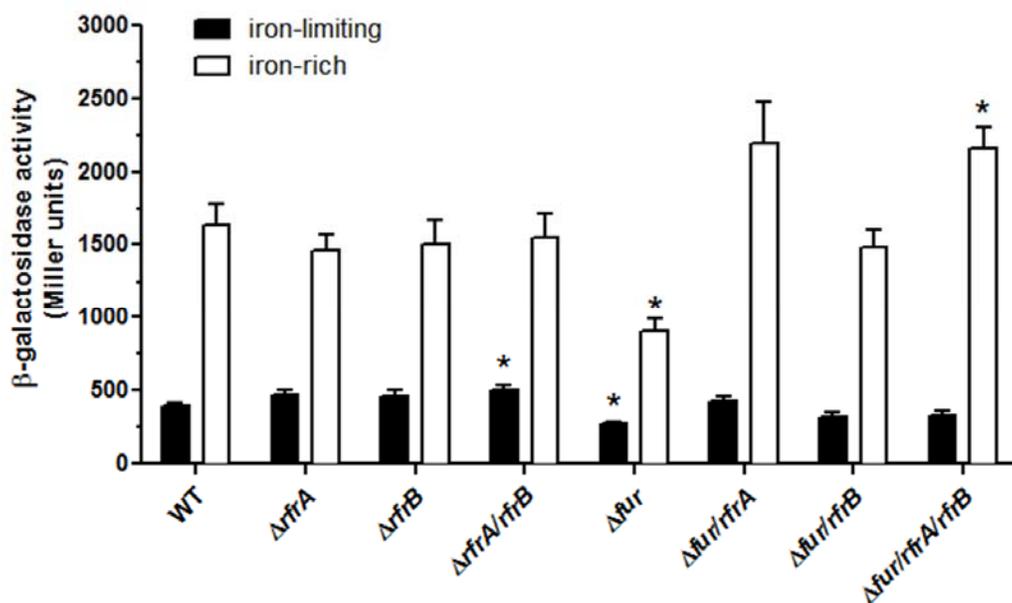
```



**Figure 4.** Regulatory region of the *tcfA* promoter. (a) The 578 bp sequence used in the *tcfA-lacZ* fusion including 473 bp upstream of the *tcfA* gene, and 105 bp after the start codon (sequence in red). The promoter region of *tcfA* contains the putative binding sites for RcsB, Fur, H-NS and ArgR (underlined). The two nucleotides that were mutated are shown inside the boxes at position -197 (thymine) and -81 (guanine) before the first codon. (b) Construction of the *PtcfA-lacZ* transcriptional fusion containing the sequence shown in (a) without mutation (*PtcfA* WT), with two point mutations at position -197 and -81 (*PtcfA* -197T/C -81G/A) and with only one point mutation at position -197 (*PtcfA* -197T/C) or -81 (*PtcfA* -81G/A). The *PtcfA-lacZ* transcriptional fusion constructs include the ribosome binding site and the first ATG of *tcfA* and *lacZ*.



**Figure 5.** Regulation of *tcf* expression. (a) β-galactosidase activity was measured in strains containing a *PtcfA-lacZ* transcriptional fusion with the promoter region harbouring no mutation (*PtcfA* WT), the two point mutations at position -197 and -81 (*PtcfA* -197T/C -81 G/A) and only one point mutation at position -197 (*PtcfA* -197T/C) or -81 (*PtcfA* -81G/A). *S. Typhi* strains containing these fusions were grown in LB medium with agitation (o/n shaking). (b) β-galactosidase activity was measured from the *PtcfA-lacZ* transcriptional fusion with the promoter region harbouring no mutation (*PtcfA* WT). *S. Typhi* wild-type strain and the isogenic *fur*, *argR* and *rcsDBC* mutants harbouring this fusion were grown in LB medium with agitation (o/n shaking). All assays were conducted in triplicate and repeated independently at least two times. The results are expressed as the mean ± SEM of the replicate experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) between the mutant strains and the wild-type strains are indicated by asterisks.



**Figure 6.** Role of iron, Fur and the sRNAs RfrA and RfrB in regulation of *tcf* expression.  $\beta$ -galactosidase activity was measured from the *PtcfA-lacZ* transcriptional fusion with the promoter region harbouring no mutation (*PtcfA* WT). *S. Typhi* wild-type strain and the different isogenic mutant strains harbouring this fusion were grown in iron-limiting and iron-rich conditions. All assays were conducted in triplicate and repeated independently at least three times. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the replicate experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) between the mutant strains and the wild-type strain are indicated by asterisks.

## CHAPITRE 5 - Discussion

Chez *Salmonella*, la régulation de l'homéostasie du fer est réalisée principalement par la protéine régulatrice Fur et les deux petits ARN non codants RfrA et RfrB. Ces trois régulateurs affectent l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans diverses fonctions physiologiques. Il est donc important d'étudier le rôle de ces régulateurs afin de mieux comprendre leur impact sur le métabolisme, la physiologie et la virulence de *Salmonella*. Lors de cette étude, le rôle de la protéine régulatrice Fur et des petits ARN non codants RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer ainsi que dans la virulence de *S. Typhi* et *S. Typhimurium* a été étudié. Le rôle de ces régulateurs dans la régulation d'un fimbriae unique à *S. Typhi*, Tcf, a également été étudié.

### 5.1. Expression des régulateurs Fur, RfrA et RfrB

L'expression du régulateur global Fur est influencée par plusieurs signaux extracellulaires et intracellulaires ainsi que par différents régulateurs. Chez *E. coli* et *S. Typhimurium*, il a été démontré que le gène *fur* est activé par la présence de fer, de peroxyde d'hydrogène et de superoxyde (13, 150). Effectivement, ce gène est activé en présence de stress oxydatif par les régulateurs OxyR et SoxRS (391). *fur* est aussi régulé par la protéine CAP et est autorégulé négativement (81). Également, le petit ARN RyhB inhibe l'expression de *fur* chez *E. coli* en diminuant la traduction du transcrit *uof-fur* (357). Les résultats présentés dans le chapitre 2 de cette thèse ont confirmé que le gène *fur* est positivement régulé par le fer chez *S. Typhi*, et ce travail a montré pour la première fois que les petits ARN RfrA et RfrB inhibent l'expression de *fur* chez *Salmonella*. De plus, cette étude a montré que le gène *fur* est fortement exprimé lors de l'interaction avec les cellules de l'hôte, ce qui concorde avec le rôle de ce régulateur dans la virulence de *Salmonella*. La régulation du gène *fur* est donc très élaborée, et cela permet à ce régulateur d'être exprimé dans les conditions où il est requis.

La régulation des petits ARN RfrA et RfrB a été étudiée préalablement chez *S. Typhimurium* (263). Il a été montré que l'expression des gènes *rfrA* et *rfrB* est induite en phase stationnaire de croissance via RpoS et par une concentration faible en fer, et qu'elle est inhibée par le régulateur Fur. Également, ces petits ARN sont fortement exprimés lors de

l'interaction intracellulaire avec des macrophages. Les résultats présentés dans le chapitre 2 ont permis de déterminer que l'expression des gènes *rfrA* et *rfrB* est régulée par le fer, par Fur et lors de la survie intracellulaire chez *S. Typhi*. La régulation de ces petits ARN est donc similaire chez les sérovars Typhimurium et Typhi. Contrairement à *E. coli* qui possède un seul petit ARN RyhB pour la régulation de l'homéostasie du fer, la régulation de *rfrA* et *rfrB* chez *Salmonella* est particulière car ces petits ARN sont régulés sensiblement par les mêmes conditions, mais le niveau d'expression varie beaucoup entre *rfrA* et *rfrB*. Cette variation d'expression démontre que leur régulation est distincte, ce qui suggère que ces deux régulateurs ont des fonctions non-redondantes.

Ainsi, chez *S. Typhimurium* et *S. Typhi*, Fur réprime l'expression de *rfrA* et *rfrB* lorsque le niveau de fer est élevé, et lorsque ce niveau diminue, l'expression de ces petits ARN est induite et RfrA et RfrB inhibent à leur tour l'expression de *fur*. Il y a donc une boucle de régulation négative entre ces différents régulateurs.

## **5.2. Le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer de *Salmonella***

La régulation de l'homéostasie du fer est importante afin d'exprimer les différents systèmes liés à cette homéostasie au moment opportun et pour garder un niveau de fer libre intracellulaire à une concentration optimale selon les besoins de la bactérie. Lorsque le niveau de fer est élevé, Fur est actif et permet de garder un niveau de fer libre intracellulaire assez faible pour limiter l'effet toxique du fer en présence d'oxygène. En effet, Fur inhibe l'expression des systèmes d'acquisition du fer et stimule le stockage du fer libre via l'activation de ferritines et l'activation de différentes protéines associées au fer via l'inhibition du petit ARN RyhB chez *E. coli* (221). Lorsque l'homéostasie du fer est dérégulée par l'inactivation du gène *fur*, le niveau de fer libre intracellulaire augmente (179, 302, 303). En présence d'oxygène, cette augmentation en  $Fe^{2+}$  favorise la formation de ROS via la réaction de Fenton et entraîne des dommages à différentes composantes cellulaires (13, 343).

Le stress causé par l'inactivation du gène *fur* affecte les bactéries à différents niveaux. L'accumulation de fer libre augmente la sensibilité d'un mutant *fur* au stress oxydatif

rencontré par les bactéries. En effet, le mutant *fur* de *E. coli* (191, 344) et de *S. Typhimurium* ((194, 358) et Fig. S1) est beaucoup plus sensible au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que la souche sauvage, et cette sensibilité est directement liée au niveau élevé de fer libre intracellulaire. Les résultats présentés au chapitre 2 ont démontré pour la première fois la grande sensibilité du mutant *fur* de *S. Typhi* au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette sensibilité accrue du mutant *fur* au stress oxydatif est donc retrouvée chez plusieurs bactéries, dont les sérovars Typhi et Typhimurium de *Salmonella*. La présence du régulateur Fur est donc cruciale pour la résistance bactérienne au stress oxydatif, et sa régulation par les régulateurs OxyR et SoxRS confirme ce principe. Les études réalisées chez *Salmonella* ont poussé l'analyse plus loin en étudiant le rôle des petits ARN RfrA et RfrB dans la réponse au stress oxydatif. Il a été démontré chez *E. coli* que l'augmentation du fer libre intracellulaire chez le mutant *fur* est due en grande partie à l'expression du petit ARN RyhB, et qu'un double mutant *fur/ryhB* a un niveau de fer libre intracellulaire plus faible que le mutant *fur*, se rapprochant du niveau de la souche sauvage (302). L'expression des petits ARN RfrA et RfrB contribue aussi à diminuer la défense bactérienne contre le stress oxydatif via l'inhibition de l'expression du gène *sodB* codant pour une superoxyde dismutase (96). Deux études ont démontré que l'inactivation des gènes *rfrA* et *rfrB* chez le mutant *fur* de *S. Typhimurium* et de *S. Typhi* diminue la sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparativement au mutant *fur* (194, 205). Ces deux expériences ont utilisé des méthodes différentes pour mesurer la sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, c'est-à-dire une croissance des bactéries en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur un milieu solide chez *S. Typhi* et dans un milieu liquide chez *S. Typhimurium*. Les résultats de ces expériences montrent que le triple mutant *fur/rfrA/rfrB* de *S. Typhi* rétablit presque complètement la résistance au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau de la souche sauvage, contrairement au triple mutant de *S. Typhimurium* qui rétablit partiellement cette résistance (194, 205). Toutefois, lorsque la sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des souches de *S. Typhimurium* est mesurée avec la même méthode que pour les souches de *S. Typhi*, c'est-à-dire sur milieu LB solide, le triple mutant *fur/rfrA/rfrB* de *S. Typhimurium* rétablit complètement la résistance au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau de la souche sauvage (Fig. S1). En outre, dans ces conditions, le phénotype de sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des différentes souches mutantes pour les gènes des régulateurs *fur*, *rfrA* et *rfrB* de *S. Typhimurium* (Fig. S1) est très semblable au phénotype des souches mutantes de *S. Typhi* (Chapitre 2, Fig. 2), indiquant que le régulateur Fur et les petits ARN RfrA et RfrB de ces deux sérovars ont une implication similaire dans la réponse au stress oxydatif.

L'augmentation du stress oxydatif observé chez un mutant *fur* affecte la croissance de plusieurs bactéries (1, 78, 179, 353). Chez un mutant *fur*, l'augmentation du fer libre induit la formation de ROS via la réaction de Fenton et cela entraîne des lésions à l'ADN qui sont néfastes aux bactéries (13, 69, 343). Ces dommages affectent différemment la croissance et la survie des bactéries, et une mutation du gène *fur* est létale chez certaines espèces (24, 298), tandis que chez d'autres bactéries, un mutant *fur* ne présente aucun défaut de croissance. Ce phénomène est observé chez *Salmonella*, où le mutant *fur* du sérovar Typhi possède un important défaut de croissance tandis que la mutation de ce gène chez le sérovar Typhimurium n'affecte pratiquement pas la croissance de cette bactérie (voir chapitres 2 et 3 et (194, 347)). De la même manière que pour la sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le défaut de croissance d'un mutant *fur* de *Salmonella* est dû à l'expression des petits ARN RfrA et RfrB qui sont les principaux responsables de l'augmentation du fer libre intracellulaire, et ainsi de la formation de ROS et des dommages à l'ADN. En effet, l'inactivation des gènes *rfrA* et *rfrB* chez un mutant *fur* rétablit la croissance à un niveau semblable à celui de la souche sauvage chez *S. Typhi*, et dans les quelques expériences où le mutant *fur* de *S. Typhimurium* présente un défaut de croissance, le triple mutant rétablit aussi complètement la croissance. Il n'en demeure pas moins que l'inactivation de *fur* affecte beaucoup plus la croissance de *S. Typhi* que celle de *S. Typhimurium*, et cette différence est observable au niveau de la morphologie adoptée par ces deux mutants. Le mutant *fur* de *S. Typhi* forme de longues cellules filamenteuses, contrairement à *S. Typhimurium*. Ce phénotype de filamentation est associé à une réponse protectrice adoptée par les bactéries qui ont d'importantes lésions à l'ADN, ce qui leur permet d'arrêter la croissance afin de réparer ces dommages (176). Ce phénotype a déjà été observé chez un mutant *fur* de *E. coli* (344), mais c'est la première fois qu'un mutant *fur* de *Salmonella* est associé à un phénotype de filamentation. Le mutant *fur/rfrA/rfrB* de *S. Typhi* forme également des filaments, avec une proportion de cellules filamenteuses un peu moins élevée que le mutant *fur*, démontrant que cette souche subit un stress même si les petits ARN ne sont pas exprimés. Cela suggère que la filamentation observée chez le mutant *fur* de *S. Typhi* n'est pas due uniquement à l'expression de RfrA et RfrB. Cela suggère aussi que la filamentation n'explique pas entièrement le défaut de croissance du mutant *fur*, car le mutant *fur/rfrA/rfrB* n'a pas de défaut de croissance mais forme tout de même des filaments.

La différence de sensibilité entre le mutant *fur* des sérovars Typhi et Typhimurium est intéressante, mais demeure incomprise. Il est possible que le niveau de fer libre intracellulaire soit plus élevé chez le mutant *fur* de *S. Typhi* que chez le mutant *fur* de *S. Typhimurium*, menant à une plus grande production de ROS et de dommages à l'ADN. Il se pourrait aussi que le niveau de fer soit similaire entre le mutant *fur* des deux sérovars, mais que les dommages à l'ADN créés par les ROS soient plus importants chez *S. Typhi*, expliquant la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN et de la filamentation des cellules bactériennes. Le régulateur Fur affecte donc différenciellement la physiologie de *S. Typhi* et *S. Typhimurium*, probablement par une régulation similaire mais ayant des effets distincts chez les deux sérovars.

Le principal rôle de Fur est d'inhiber la transcription des gènes codant pour les systèmes d'acquisition du fer, incluant la synthèse et le transport des sidérophores. Ce rôle est bien caractérisé chez les bactéries *E. coli* et *S. Typhimurium*, mais peu d'informations étaient disponibles concernant le rôle de ce régulateur chez *S. Typhi*. Les expériences réalisées au cours de cette thèse et présentées dans les chapitres 2 et 3 ont démontré que la protéine régulatrice Fur de *S. Typhi* inhibe l'expression des sidérophores produits par cette bactérie. Fur agit en inhibant la transcription des gènes de sidérophores. En effet, l'opéron *iroBCDE*, codant pour les protéines impliquées dans la synthèse, l'exportation et l'hydrolyse des salmochélines, est 10 fois plus transcrit chez un mutant *fur* que chez la souche sauvage en conditions riches en fer. Le fer influence aussi l'expression des sidérophores chez *S. Typhi*, puisque dans les conditions pauvres en fer, Fur est inactif. En effet, l'opéron *iro* est également 10 fois plus transcrit en conditions pauvre en fer chez la souche sauvage. L'analyse par spectrométrie de masse des sidérophores produits lors de la croissance en milieu dépourvu de fer a révélé que *S. Typhi* exprime une quantité beaucoup plus importante d'entérobactine que de salmochélines, et cela a également été observé chez *S. Typhimurium*. Ces résultats ne sont pas conformes à une étude précédente réalisée chez *S. Typhimurium* où l'entérobactine et les salmochélines étaient produites en quantité semblable (74). La proportion de ces deux sidérophores semble donc varier selon le milieu et les conditions de croissance utilisés, et cela permet d'émettre l'hypothèse que la proportion de sidérophores est différente dans d'autres conditions, comme un milieu riche en fer ou lors de l'interaction avec l'hôte. Puisque

l'entérobactine est séquestrée par le lipocalin 2 chez l'hôte, il est probable que *Salmonella* exprime une quantité plus importante de salmochélines *in vivo* que *in vitro*. Il a d'ailleurs été démontré chez une souche de *E. coli* pathogène que la proportion de sidérophores varie beaucoup entre des conditions *in vitro* et *in vivo* (55). En effet, l'entérobactine est produite principalement en milieu minimal, et lors d'infections de poulet, la proportion d'entérobactine produite diminue et celle des autres types de sidérophores (salmochélines et aéro bactéine) augmente considérablement. Par ailleurs, *S. Typhi* produit une plus grande quantité de sidérophores que *S. Typhimurium* en conditions *in vitro* pauvres en fer. Ce résultat est également sujet à varier selon les conditions de croissance, et cela démontre qu'il existe des différences entre les deux sérovars au niveau de la production des sidérophores.

Le rôle du petit ARN RyhB dans la régulation des sidérophores a été déterminé récemment. Chez *E. coli*, RyhB favorise la production de l'entérobactine en stimulant l'expression de certains gènes de synthèse de l'entérobactine et en favorisant le transfert de la sérine pour la production du sidérophore via l'inhibition du gène *cysE* (302). Chez *Vibrio parahaemolyticus*, RyhB stimule la production de la vibrioferrine en stabilisant l'ARNm polycistronique codant pour la synthèse de ce sidérophore (334). Il apparaît donc que Fur ne soit pas le seul responsable de la régulation des sidérophores et que RyhB participe activement en déployant divers mécanismes selon les différentes espèces. L'implication des petits ARN RfrA et RfrB dans la régulation des sidérophores de *Salmonella* n'avait jamais été déterminée. Les expériences effectuées dans le chapitre 2 permettant de déterminer le niveau des sidérophores exprimés et produits par *S. Typhi*, c'est-à-dire le dosage de l'expression de l'opéron *iroBCDE* via la fusion transcriptionnelle *PiroB-lacZ* et l'utilisation de la gélose CAS, ont permis de révéler une implication mineure des petits ARN chez *S. Typhi*. La gélose CAS est un milieu où la concentration en fer est assez élevée pour activer Fur, donc les petits ARN ne sont pas exprimés lorsque le gène *fur* est présent. Les doubles (*fur/rfrA* et *fur/rfrB*) et triple (*fur/rfrA/rfrB*) mutants ont produit une quantité plus importante de sidérophores que le mutant *fur*, suggérant que les petits ARN régulent négativement les sidérophores. Toutefois, il a été démontré chez *E. coli* qu'un double mutant *fur/ryhB* produit plus de sidérophores que le mutant *fur* en présence de fer, et que cette augmentation est due au dérèglement de l'homéostasie du fer et de l'accroissement du niveau de fer intracellulaire (302). Donc, les

résultats de la gélose CAS ne permettent pas de conclure que les petits ARN possèdent un rôle actif dans la régulation des sidérophores de *S. Typhi*. Le dosage  $\beta$ -galactosidase de la fusion transcriptionnelle *PiroB-lacZ* a montré des effets peu prononcés chez les mutants *rfrA* et *rfrB*. Seul le mutant *rfrB* exprime significativement moins les gènes de salmochélines que la souche sauvage en conditions pauvres en fer. RfrA et RfrB semblent donc affecter différemment l'expression des salmochélines. Lors de l'analyse des sidérophores produits par *Salmonella* à l'aide de la spectrométrie de masse, le double mutant *rfrA/rfrB* de chaque sérovar a également été testé (Fig. S2). Des concentrations significativement plus petites d'entérobactine et de salmochélines ont été mesurées dans le surnageant du mutant *rfrA/rfrB* de *S. Typhi* comparativement à la souche sauvage. Par contre, aucune différence significative dans la quantité de sidérophores produits par la souche sauvage et le mutant *rfrA/rfrB* de *S. Typhimurium* n'a été observée (Fig. S2). Ces résultats semblent donc montrer que RfrA et RfrB sont importants pour la régulation de l'expression des sidérophores chez *S. Typhi*.

En résumé, Fur est important pour limiter la production de stress oxydatif et de dommages à la cellule via l'augmentation du niveau de fer libre intracellulaire causée par l'expression des petits ARN RfrA et RfrB. Le stress observé chez le mutant *fur* de *S. Typhi* se traduit par la formation de cellules filamenteuses, par une grande sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et par un défaut de croissance. Le mutant *fur* de *S. Typhimurium* est beaucoup moins affecté par ces stress, démontrant une différence importante entre les deux sérovares. La sensibilité du mutant *fur* est en grande partie due à RfrA et RfrB, où la mutation de ces ARN rétablit presque tous les phénotypes à un niveau similaire à celui de la souche sauvage. Le phénotype de filamentation ne semble pas être dû qu'à l'expression de ces petits ARN, car le triple mutant *fur/rfrA/rfrB* de *S. Typhi* forme également des filaments. Les effets de ces petits ARN sont souvent différents, suggérant qu'ils agissent de façon non-redondante. Finalement, en présence de fer, Fur inhibe la transcription des sidérophores, et en carence de fer, les petits ARN RfrA et RfrB semblent promouvoir la production de l'entérobactine et des salmochélines chez *S. Typhi*.

### 5.3. Le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB dans la virulence de *Salmonella*

Chez *Salmonella*, Fur est impliqué dans la virulence de plusieurs façons. *Salmonella* possède des flagelles qui lui permettent d'être mobile et de se déplacer dans les différents environnements retrouvés chez l'hôte afin d'atteindre et d'infecter les cellules de l'hôte. Les résultats présentés dans le chapitre 3 montrent pour la première fois que Fur est requis pour la motilité de type *swimming* chez *Salmonella*. Le défaut de motilité du mutant *fur* est plus prononcé chez *S. Typhi* que chez *S. Typhimurium*, indiquant une autre différence dans la fonction de ce régulateur entre les deux sérovars. Chez *S. Typhimurium*, Fur régule positivement les gènes *flhDC* codant pour le régulateur de la biosynthèse des flagelles (50), et le petit ARN RfrB inhibe certains gènes de flagelles et ainsi la motilité de type *swimming* (195). Considérant ces observations, il est surprenant que le défaut de motilité du mutant *fur* de *S. Typhimurium* soit si peu prononcé. Toutefois, les petits ARN RfrA et RfrB semblent jouer un rôle dans la motilité de *S. Typhimurium*, car le triple mutant *fur/rfrA/rfrB* rétablit le niveau de motilité du mutant *fur* à un niveau semblable à celui de la souche sauvage. Inversement, les petits ARN RfrA et RfrB ne semblent pas jouer un rôle dans la motilité de *S. Typhi*, car le triple mutant *fur/rfrA/rfrB* présente le même défaut de motilité que le mutant *fur*. La raison pour laquelle il y a une différence dans le niveau de motilité du mutant *fur* des deux sérovars peut être expliquée par la morphologie de type filamenteuse adoptée par le mutant *fur* de *S. Typhi*. En effet, il a été démontré qu'une mutation qui entraîne la formation de filaments chez *Salmonella* affecte la motilité de type *swimming* (317). De plus, le triple mutant *fur/rfrA/rfrB* de *S. Typhi* forme également des filaments, appuyant l'hypothèse que la filamentation inhibe la motilité. Donc, la motilité de *Salmonella* est régulée par les régulateurs de l'homéostasie du fer. Chez *S. Typhi*, Fur active la motilité principalement en empêchant les bactéries de filamenter, et les petits ARN RfrA et RfrB ne semblent pas impliqués. Chez *S. Typhimurium*, Fur active aussi la motilité principalement par l'inhibition de l'expression de *rfrA* et *rfrB*, où le petit ARN RfrB semble être responsable de l'inhibition de la motilité.

*Salmonella* possède un SST3 retrouvé sur le SPI-1 qui permet de sécréter des effecteurs dans les cellules de l'hôte et qui est essentiel pour l'invasion des cellules épithéliales de

l'intestin (146). Chez *S. Typhimurium*, il a été démontré que Fur régule positivement les gènes du SPI-1 et qu'il est requis pour l'invasion des cellules épithéliales (96, 130, 296, 337, 348). De plus, parmi les différentes études démontrant l'atténuation de la virulence d'un mutant *fur* chez les souris, certaines ont été faites par une inoculation orale, suggérant un rôle de Fur dans l'infection de *Salmonella* au niveau de l'intestin (77, 296). Dans le chapitre 2 de cette thèse, il a été démontré pour la première fois que Fur est requis pour l'invasion des cellules épithéliales par *S. Typhi*. Ce défaut d'invasion du mutant *fur* serait en grande partie dû à une diminution de l'expression des gènes du SPI-1. En effet, les résultats présentés dans le chapitre 2 (données non montrées) ont démontré que Fur active l'expression du gène *hilA* codant pour un activateur global de l'expression des gènes du SPI-1 codant pour le SST3. Également, le mutant *fur* de *S. Typhi* possède un petit défaut d'adhérence aux cellules épithéliales, contrairement aux mutants SPI-1, suggérant que d'autres facteurs sont responsables de ce défaut. Le mutant *fur* de *S. Typhi* forme des filaments, et il a été démontré que des mutations dans les gènes *sulA* ou *gidA* de *S. Typhimurium* provoquent un phénotype de filamentation et que les cellules filamenteuses sont incapables de forcer leur invasion dans les cellules épithéliales (172, 317). Donc, le régulateur Fur de *S. Typhi* est important pour l'invasion, car il active les gènes du SPI-1, via l'activation du gène *hilA*, et son expression permet à cette bactérie d'adopter une morphologie normale qui assure une interaction optimale avec les cellules de l'hôte. Les petits ARN RfrA et RfrB ne jouent pas de rôle majeur dans l'interaction entre *Salmonella* et les cellules épithéliales. L'activation du SPI-1 par Fur n'est pas due à ces deux petits ARN, puisque l'expression de *hilA* n'est pas régulée par RfrA et RfrB (96). De plus, aucun défaut d'adhésion ou d'invasion n'a été observé chez les mutants *rfrA* et *rfrB* de *S. Typhi*. Toutefois, l'expression de RfrA chez le mutant *fur* semble nuire à l'invasion, puisque le double mutant *fur/rfrA* et le triple mutant *fur/rfrA/rfrB* ont un niveau d'invasion significativement plus élevé que le mutant *fur*. Ces deux mutants rétablissent la croissance du mutant *fur* dans les conditions *in vitro*, alors il est possible que leur effet dans l'invasion soit dû au niveau de croissance de *S. Typhi*.

Une fois traversé l'épithélium intestinal, *Salmonella* est phagocytée par des macrophages et est capable de survivre à l'intérieur de ces cellules, ce qui lui permet d'être disséminée chez l'hôte. *S. Typhi* survit de façon optimale dans les macrophages humains, tandis que *S.*

Typhimurium survit particulièrement dans les macrophages murins, mais est toutefois capable de survivre dans les macrophages humains à un degré moindre que *S. Typhi* et induit une mortalité des macrophages par apoptose (312). Avant les résultats obtenus dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse, le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB de *Salmonella* dans l'interaction avec les macrophages n'était pratiquement pas connu. Contrairement à l'interaction avec les cellules épithéliales, l'implication du régulateur Fur dans l'interaction avec les macrophages humains est différente entre les sérovars Typhi et Typhimurium.

Premièrement, le mutant *fur* de *S. Typhimurium* est phagocyté au même niveau que la souche sauvage, contrairement au mutant *fur* de *S. Typhi* qui possède un important défaut de phagocytose. Ce défaut n'est pas lié à une diminution de l'activité du SPI-1. Cela concorde avec les résultats obtenus car l'entrée du mutant *fur* de *S. Typhimurium* aurait également été affectée si cela dépend du SPI-1. Le défaut de phagocytose du mutant *fur* de *S. Typhi* pourrait être dû en grande partie au défaut de motilité et à la morphologie filamenteuse de ce mutant. En effet, l'inactivation de gènes de flagelles importants pour la motilité de *Salmonella* affecte grandement l'entrée de cette bactérie dans les macrophages (260). Également, il a été démontré qu'un mutant filamenteux de *S. Typhimurium* est atténué aux temps précoces lors d'infection de macrophages (317), suggérant que la filamentation du mutant *fur* de *S. Typhi* nuit à son entrée dans les macrophages THP-1. Finalement, le défaut de phagocytose de ce mutant n'est pas dû à l'expression des petits ARN RfrA et RfrB, car le triple mutant *fur/rfrA/rfrB* possède le même défaut que le mutant *fur*. Le triple mutant forme également des filaments, appuyant ainsi le principe que la filamentation nuit à l'entrée des bactéries dans les macrophages.

Deuxièmement, le mutant *fur* de *S. Typhi* possède un important défaut de survie et de prolifération intracellulaire, contrairement au mutant *fur* de *S. Typhimurium* qui survit et se multiplie au même niveau que la souche sauvage. Le fait que la survie et la prolifération intracellulaire du mutant *fur* de *S. Typhi* soient limitées peut être expliqué par la grande sensibilité de ce mutant face aux différentes défenses antimicrobiennes rencontrées à l'intérieur des macrophages, tels que le pH acide, le stress oxydatif et les peptides antimicrobiens, ainsi que par son défaut de croissance. Puisque le mutant *fur* de *S. Typhimurium* est beaucoup moins affecté par ces différents stress, il est beaucoup plus apte à

survivre et à se multiplier dans les macrophages. Toutefois, la sensibilité du mutant *fur* de *S. Typhi* aux différentes conditions est principalement due à l'expression des petits ARN RfrA et RfrB, où un triple mutant rétablit le phénotype à un niveau similaire à celui de la souche sauvage. Donc, puisque le triple mutant possède le même défaut de survie dans les macrophages que le mutant *fur*, d'autres facteurs autres que la sensibilité du mutant *fur* sont probablement responsables de ce défaut de survie et de prolifération. Le mutant *fur* et le triple mutant *fur/rfrA/rfrB* de *S. Typhi* filamentent, et il a été démontré qu'un mutant filamenteux de *S. Typhimurium* possède un défaut de réplication intracellulaire lors de l'infection de macrophages (317). Il est donc probable que la filamentation nuit à la réplication intracellulaire des mutants *fur* de *S. Typhi*. Comme l'inactivation de *fur* affecte différemment les sérovars *Typhi* et *Typhimurium*, il est fort probable que le régulateur Fur régule certaines cibles uniques à chaque sérovar ou qu'il régule différemment des cibles communes, affectant la capacité de survie intracellulaire de façon distincte. Également, le mutant *fur* de *S. Typhimurium* n'a pas de défaut de survie chez des macrophages murins (130), donc la différence de survie entre les deux sérovars ne semble pas être due au type de macrophages. Puisque le mutant *fur* de *S. Typhimurium* ne possède pas de défaut d'interaction avec les macrophages, le phénotype d'atténuation observé chez ce mutant lors de l'infection de souris doit être attribué à son défaut d'invasion de l'épithélium intestinal et lors d'autres phases d'infection, mais pas à son interaction avec les macrophages.

Les petits ARN RfrA et RfrB n'influencent pas la phagocytose de *S. Typhi*, mais ils sont nécessaires pour une multiplication intracellulaire optimale durant l'infection à long terme de macrophages. Contrairement à la majorité des phénotypes observés chez les mutants *rfrA* et *rfrB*, le rôle de ces petits ARN dans la prolifération intracellulaire est redondant, puisque seulement le double mutant possède le défaut de survie. L'expression d'un seul ARN serait donc suffisante pour assurer la régulation des différents éléments de virulence nécessaires à la multiplication intracellulaire. À l'inverse du rôle du régulateur Fur dans l'interaction avec les macrophages, le rôle des petits ARN RfrA et RfrB est conservé entre les sérovars *Typhi* et *Typhimurium*. Effectivement, le double mutant *rfrA/rfrB* de *S. Typhimurium* possède un défaut significatif de multiplication intracellulaire (Fig. S3). De plus, le double mutant *fur/rfrB* et le triple mutant *fur/rfrA/rfrB* ont également un défaut significatif de multiplication

intracellulaire, suggérant que RfrB est plus impliqué que RfrA pour cette multiplication chez *S. Typhimurium*. Le rôle des petits ARN RfrA et RfrB dans la prolifération intra-macrophage corrèle avec leur surexpression dans les macrophages. Le rôle du petit ARN RyhB dans la virulence a été démontré chez plusieurs bactéries pathogènes, mais c'est la première démonstration d'un rôle dans l'interaction avec les macrophages chez ce régulateur de l'homéostasie du fer. Il est donc possible que les petits ARN RfrA et RfrB de *Salmonella* soient impliqués lors des étapes d'infection à long terme chez l'hôte. Toutefois, ces régulateurs ne semblent pas requis lors de l'infection de souris par *S. Typhimurium* (157, 305). Étant donné que seuls les simples mutants ont été testés, il serait intéressant d'étudier le double mutant *rfrA/rfrB* dans un modèle d'infection de souris pour déterminer si ces régulateurs ont un rôle *in vivo*.

Le fait que Fur et les petits ARN RfrA et RfrB soient exprimés dans les macrophages et qu'ils soient requis pour la multiplication intracellulaire soulève la question du niveau de fer retrouvé à l'intérieur des macrophages lors de l'infection. À l'inverse du paradigme qui propose que la SCV soit un environnement privé de fer, une étude utilisant une fusion transcriptionnelle avec des gènes régulés par le fer a démontré que les gènes de sidérophores de *S. Typhimurium* n'étaient pas exprimés dans les macrophages, suggérant que le niveau de fer est assez élevé pour activer la protéine régulatrice Fur (336). Ces résultats suggèrent qu'à l'intérieur des macrophages, Fur serait actif et RfrA et RfrB seraient inactifs. Toutefois, ces petits ARN ne sont pas seulement régulés par Fur. En effet, leur expression est induite par le stress oxydatif et lors de la phase stationnaire de croissance, donc il est possible qu'après 24 h d'infection dans les macrophages, les régulateurs Fur, RfrA et RfrB soient exprimés en même temps. Cela serait bénéfique pour *Salmonella* afin de pouvoir proliférer efficacement dans les macrophages.

Pour résumer, les régulateurs Fur, RfrA et RfrB sont impliqués à différents niveaux dans la virulence de *Salmonella*. La présence de Fur est requise pour la motilité de *Salmonella*, particulièrement chez *S. Typhi*, mais le petit ARN RfrB inhibe la motilité de type *swimming* seulement chez *S. Typhimurium*. Cela démontre une différence dans le rôle de ces régulateurs entre les deux sérovars. Fur est requis pour l'invasion des cellules épithéliales via l'activation des gènes du SPI-1, mais les petits ARN ne jouent pas de rôle important dans l'interaction

avec ces cellules. Finalement, Fur est nécessaire pour l'interaction avec les macrophages chez *S. Typhi*, contrairement au régulateur Fur de *S. Typhimurium* qui n'est aucunement requis lors de l'infection de macrophages. Les petits ARN RfrA et RfrB sont importants pour la multiplication intra-macrophage, suggérant un rôle dans les étapes tardives de l'infection.

#### **5.4. Le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB dans la régulation du fimbriae Tcf de *S. Typhi***

Chaque sérovar de *Salmonella* possède un répertoire précis de fimbriae. *S. Typhi* possède plusieurs fimbriae dont cinq lui sont spécifiques et ne sont pas retrouvés chez *S. Typhimurium*, en plus d'un pilus de type IVB unique à *S. Typhi*. Les fimbriae de *Salmonella* sont peu caractérisés, car ils sont généralement très peu exprimés *in vitro* (115, 173, 199). Un rôle dans la virulence a été attribué à seulement quelques fimbriae chez cette bactérie, et cela est dû en grande partie à une redondance des nombreux systèmes d'adhésion fimbriaires et afimbriaires exprimés par *S. Typhi*. Le fimbriae Tcf est spécifique à *S. Typhi* et d'autres sérovares restreints aux humains, de même que certaines salmonelles non-typhoïdiques invasives, mais il est absent du génome de *S. Typhimurium* (48, 83, 332, 345). Le rôle de ce fimbriae est peu connu, alors les expériences du chapitre 3 ont permis de caractériser le rôle de Tcf dans la virulence de *S. Typhi*, son niveau d'expression dans des conditions *in vitro* ainsi que sa régulation.

Les résultats d'infection des cellules de l'hôte en culture présentés dans le chapitre 3, de même que les résultats du laboratoire des docteurs Robert A. Kingsley et Gordon Dougan (35) ont démontré que le fimbriae Tcf était très peu impliqué dans l'interaction avec les cellules épithéliales et les macrophages, où un mutant *pcf* n'avait aucun défaut significatif en comparaison avec la souche sauvage. Cependant, l'expression des gènes *pcfABCD* dans une souche afimbriaire d'*E. coli* a permis un attachement significatif sur les cellules épithéliales, démontrant clairement le phénomène de redondance entre les différents systèmes d'adhésion de *S. Typhi*. En effet, l'absence de *pcf* chez *S. Typhi* est complétée par les nombreux autres fimbriae et adhésines non fimbriaires exprimés par cette bactérie, dissimulant le rôle réel de Tcf qui permet une plus grande adhérence aux cellules épithéliales. Cette capacité d'exprimer plusieurs systèmes d'adhésion est une arme efficace chez les bactéries hôte-spécifique, leur

permettant d'échapper à la reconnaissance immunitaire de l'hôte (359). Donc, puisque Tcf est retrouvé principalement chez des bactéries humain-spécifique, que des anticorps anti-TcfB ont été retrouvés dans le sang de patients atteints de fièvre typhoïde (155) et qu'il possède un rôle potentiel d'adhésine, le fimbriae Tcf de *S. Typhi* joue probablement un rôle lors de l'infection et sa présence chez ce sérovar implique un rôle dans la spécificité d'hôte de cette bactérie.

Les fimbriae sont normalement très peu exprimés *in vitro*, et cela s'est avéré vrai pour le fimbriae Tcf lors de différentes conditions de croissance en milieu LB. En effet, lorsque *S. Typhi* est en phase exponentielle de croissance ou croît en absence d'agitation, les niveaux d'expression de *tcf* sont assez faibles avec une production entre 200 et 400 unités Miller, sachant que d'autres gènes analysés avec le même système (fusion transcriptionnelle sur le vecteur pRS415) peuvent produire quelques milliers d'unité Miller (voir résultats de la figure 4 du chapitre 2). Toutefois, le niveau d'expression maximal de *tcf* lors de la phase stationnaire tardive de croissance avec agitation démontre que ce fimbriae est exprimé chez *S. Typhi* et que son expression est régulée selon les différentes conditions de croissance. Une corrélation entre le niveau d'expression de Tcf et son rôle dans la virulence peut être établie. En effet, les bactéries utilisées pour infecter les cellules épithéliales et les macrophages ont été cultivées dans un milieu LB sans agitation (avec ou sans ajout de sel), où *tcf* est peu exprimé, donc l'absence de phénotype observé avec le mutant *tcfABCD* peut être attribuée au fait que ce fimbriae était peu exprimé chez la souche sauvage dans ces conditions, diminuant les chances d'observer une différence entre les deux souches.

Lors de l'analyse de la région promotrice du gène *tcfA*, la présence de deux mutations ponctuelles situées à 81 et 197 nucléotides en amont du codon d'initiation du gène a affecté l'expression de l'opéron *tcf*. En effet, lorsque les deux mutations sont présentes, l'expression de *tcf* augmente, tandis qu'elle diminue lorsqu'il y a une seule mutation. Ces résultats suggèrent que les mutations changent l'affinité de liaison du promoteur pour des régulateurs putatifs, et une analyse *in silico* a permis d'identifier des sites de liaisons putatifs pour certains régulateurs. Un site de liaison pour le régulateur RcsB est situé au niveau de la thymine en position -197, et il s'est avéré que Rcs réprime l'expression de *tcf*. Il est donc possible que la mutation en position -197 augmente l'affinité de liaison de RcsB, diminuant ainsi le niveau d'expression de *tcf*. Par ailleurs, il est connu que Rcs régule le pilus de type IVB de même que

la capsule Vi de *S. Typhi* (17, 206). Cela suggère que ce régulateur est impliqué dans la régulation de différents facteurs de virulence spécifiques à *S. Typhi*.

L'analyse du promoteur de *tcfA* a également permis d'identifier un site putatif de liaison pour la protéine régulatrice Fur. L'expression de *tcfA* est diminuée chez un mutant *fur*, signifiant que Fur active l'expression de *tcf*. Cette régulation peut être effectuée directement par la liaison de Fur sur son site de liaison, activant la transcription de *tcf*, et elle peut également être due à un mécanisme indirect où un autre régulateur régulé par Fur serait responsable de ce changement d'expression. Fur active rarement la transcription directement, mais chez *E. coli*, Fur s'apparie au niveau du promoteur du gène *fnA* et entre en compétition avec H-NS qui réprime la transcription de ce gène (246). La liaison de Fur sur ces sites empêche ainsi la liaison de H-NS, permettant l'expression de *fnA* (246). Puisque le site de liaison du régulateur Fur dans la région promotrice de *tcfA* est situé juste en amont d'un site de liaison putatif pour H-NS reconnu pour inhiber l'expression de plusieurs fimbriae (68, 199, 237, 238, 249, 257, 342, 372), il est fort possible que Fur se lie dans cette région et restreigne l'accès de H-NS, activant du même coup l'expression de *tcf*.

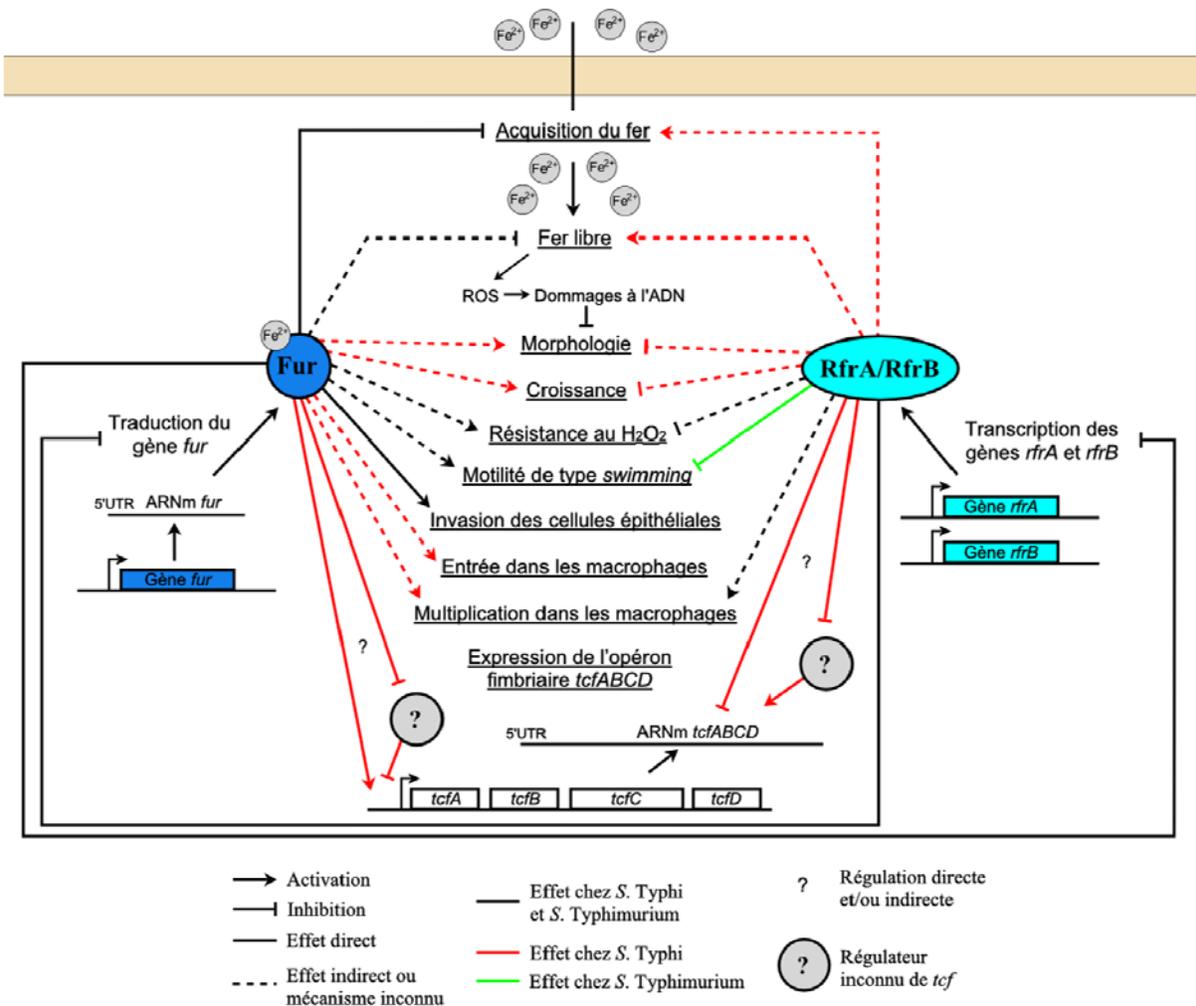
À ce jour, aucun autre fimbriae de *Salmonella* n'est régulé par Fur. Toutefois, ce régulateur affecte l'expression de différents systèmes fimbriaires chez certaines bactéries. La régulation de l'opéron fimbriaire *tcf* chez *S. Typhi* est assez similaire à la régulation du fimbriae Stg de la souche de *E. coli* pathogène aviaire (APEC)  $\chi$ 7122. Les résultats de l'étude ayant caractérisé ce fimbriae sont quelque peu contradictoires, car l'expression de *stg* est inhibée par l'augmentation du niveau de fer mais est activée par Fur (212). Malgré la présence de sites de liaison putatifs pour Fur dans la région promotrice de *stgA*, l'activation de ce gène n'est pas due à une interaction directe de Fur, démontré à l'aide d'une analyse FURTA. Ces observations suggèrent que Fur régule *stgA* indirectement, et cela était expliqué en partie par la faible homologie des sites de liaison à la séquence consensus de liaison du régulateur Fur (boîte Fur). La séquence de liaison du régulateur Fur en amont du gène *tcfA* déterminée par le programme *Virtual Footprint* possède également très peu d'homologie avec la boîte Fur, il est donc probable que Fur régule l'expression de *tcf* indirectement.

L'expression de *tcf* est induite en condition riche en fer, suggérant un rôle d'un régulateur influencé par les niveaux de fer. L'hypothèse d'un rôle des petits ARN RfrA et RfrB fut donc émise et, en effet, les résultats ont démontré que ces petits ARN inhibent l'expression de *tcf* en absence de *fur*. Fur inhibe l'expression des gènes *rfrA* et *rfrB*, donc en carence de fer ou chez le mutant *fur*, ces petits ARN sont exprimés et semblent être responsables de la diminution d'expression de l'opéron fimbriaire *tcf*. Cette observation a été confirmée par l'augmentation de l'expression de *tcf* chez les doubles et triple mutants *fur/rfrA*, *fur/rfrB* et *fur/rfrA/rfrB* comparativement au mutant *fur* en conditions riches en fer. De plus, le niveau de régulation semble être différent entre les deux ARN, puisque le double mutant *fur/rfrB* rétablit l'expression de *tcf* à un niveau significativement moins élevé que les mutants *fur/rfrA* et *fur/rfrA/rfrB*, indiquant que l'inhibition de *tcf* est réalisée en plus grande partie par RfrA que par RfrB. L'inhibition de l'expression de *tcf* par ces petits ARN peut être réalisée de façon indirecte ou directe. Il est possible que la régulation de l'expression de *tcf* par RfrA et RfrB soit indirecte et qu'elle implique un autre régulateur étant régulé par ces petits ARN. Il est également possible que la régulation soit directe, c'est-à-dire que RfrA et RfrB inhibent l'expression de *tcf* en se liant dans la région 5'UTR de *tcfA*. L'utilisation d'une fusion transcriptionnelle ne permet pas de déterminer totalement le rôle de ces petits ARN, qui agissent principalement par des mécanismes post-transcriptionnels. Toutefois, chez *E. coli*, les ARN régulés par RyhB sont généralement dégradés rapidement suite à l'appariement de RyhB dans leur région 5'UTR (219). Par conséquent, si la régulation est directe, la liaison de RfrA et RfrB dans la région 5'UTR de *tcfA* présente dans la fusion *PtcfA-lacZ* va rapidement provoquer la dégradation du transcrit *tcfA-lacZ*, diminuant ainsi le niveau de  $\beta$ -galactosidase produit. Par ailleurs, le petit ARN RyhB régule généralement des cibles codant pour des protéines contenant ou reliées à l'utilisation du fer, afin de créer une économie de fer pour les protéines essentielles, et les différentes protéines Tcf ne font pas partie de cette catégorie. Récemment, des cibles de ce petit ARN n'étant pas reliées au fer ont été identifiées (195, 302), suggérant que RyhB et ses homologues réguleraient un ensemble de gènes plus diversifié que ce qui avait été établi.

En résumé, l'expression de l'opéron fimbriaire *tcf* de *S. Typhi* est positivement régulée par le fer et par la protéine régulatrice Fur, et est négativement régulée par les petits ARN RfrA et

RfrB. Toutefois, le mécanisme précis de la régulation de l'expression de *tcf* par ces régulateurs n'est pas connu. Il est possible que Fur active directement la transcription de *tcf* en se liant dans sa région promotrice, et que les petits ARN RfrA et RfrB inhibe directement l'expression de *tcf* en se liant dans sa région 5'UTR. Il est également probable que la régulation soit effectuée de façon indirecte impliquant un autre régulateur de *tcf*, lui-même régulé par Fur, RfrA ou RfrB. Il s'agit d'un autre cas démontrant une implication des régulateurs de l'homéostasie du fer dans la régulation d'un facteur de virulence d'une bactérie pathogène. De plus, la régulation de l'opéron fimbriaire *tcf* par Fur et RfrA/RfrB chez *S. Typhi* est un bon exemple de régulation de gènes qui sont spécifiques à une bactérie par un système de régulation global conservé chez les bactéries.

Les différents rôles des régulateurs Fur, RfrA et RfrB identifiés à l'aide des expériences de cette thèse ainsi que les rôles déjà connus dans la littérature sont représentés dans la figure 1 ci-dessous.



**Figure 1.** Rôle du régulateur Fur et des petits ARN non codants RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer et la virulence de *Salmonella*. Lorsque le niveau de fer augmente, la protéine régulatrice Fur est activée et inhibe la transcription des gènes *rfrA* et *rfrB*. Lorsque le niveau de fer diminue, les petits ARN RfrA et RfrB sont exprimés et inhibent la traduction du gène *fur*. Fur, RfrA et RfrB régulent l'homéostasie du fer de *Salmonella*. Fur inhibe la transcription des gènes liés à l'acquisition du fer chez *S. Typhi* et *S. Typhimurium*. Fur permet de maintenir un niveau de fer libre intracellulaire assez faible, diminuant ainsi la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) et les dommages à l'ADN. RfrA/RfrB sont impliqués dans la production de sidérophores chez *S. Typhi*, et leur expression promouvoit une augmentation du fer libre intracellulaire et la production de ROS. Fur est important pour une croissance optimale et pour la morphologie de *S. Typhi*. Lorsque RfrA/RfrB sont exprimés,

ils nuisent à la croissance de *S. Typhi* et induisent partiellement la formation de cellule filamenteuse chez ce sérovar. Fur est important pour la résistance au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez *S. Typhi* et *S. Typhimurium*, et l'expression de RfrA/RfrB augmente la sensibilité de *Salmonella* au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fur est aussi important pour la motilité de type swimming chez les deux sérovares. Il semble que les petits ARN ne soient pas impliqués dans la motilité de *S. Typhi*, mais que RfrB inhibe cette fonction chez *S. Typhimurium*. La protéine Fur et les petits ARN RfrA et RfrB sont également importants pour la virulence de *Salmonella*. Fur est requis pour l'invasion des cellules épithéliales en promouvant l'induction des gènes du SPI-1 via l'activation du gène *hilA*. Il est également important pour l'entrée et la multiplication de *S. Typhi* dans les macrophages. RfrA/RfrB ne semblent pas jouer de rôle dans l'interaction de *Salmonella* avec les cellules épithéliales, mais ils sont requis pour la réplication de *S. Typhi* et *S. Typhimurium* dans les macrophages. Finalement, ces régulateurs affectent l'expression de l'opéron fimbriaire *tcf* retrouvé chez *S. Typhi* mais absent de *S. Typhimurium*. Fur active l'expression de *tcf*, tandis que RfrA/RfrB inhibent l'expression de ce fimbriae. Le mécanisme de régulation pourrait être direct, c'est-à-dire que Fur active *tcf* en se liant à son promoteur et/ou RfrA/RfrB inhibent *tcf* en se liant à sa région 5'UTR. La régulation pourrait également être indirecte et impliquer un autre régulateur de *tcf* qui serait lui-même régulé par Fur et/ou RfrA/RfrB.

## 5.5. Perspectives

Les résultats présentés dans cette thèse offrent un apport considérable sur les connaissances concernant le rôle de la protéine régulatrice Fur et des petits ARN RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer et la virulence de *Salmonella*, en particulier *S. Typhi*, et plusieurs expériences seraient intéressantes afin de continuer l'étude de ces régulateurs et de mettre en pratique les informations découlant des travaux de cette thèse.

Le rôle des petits ARN RfrA et RfrB est moins détaillé que celui de Fur dans la régulation des systèmes d'acquisition du fer, et il serait intéressant d'investiguer l'implication de ces ARN dans la régulation des gènes de sidérophores chez *Salmonella*. Les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 étaient les premiers à montrer un tel rôle, mais une étude plus approfondie sur l'implication de chaque ARN et une comparaison entre les sérovares Typhi et Typhimurium permettraient de faire un parallèle avec le rôle de RyhB dans la production de

l'entérobactine chez *E. coli*. L'analyse des sidérophores produits par les simples mutants et le double mutant ou par une souche surexprimant ces petits ARN permettrait de déterminer si ces petits ARN sont importants pour la production d'entérobactine et de salmochélines et si chaque régulateur affecte cette production différemment. Également, les études ayant mesuré les types de sidérophores produits par *Salmonella* (chapitre 3 de cette thèse et (74)) se sont concentrées sur des conditions de croissance *in vitro*. Comme il a été clairement démontré que les sidérophores produits en conditions d'infections varient beaucoup comparativement aux sidérophores produits en conditions de laboratoire, il serait intéressant de déterminer les sidérophores produits par *Salmonella* lors de l'infection de cellules en culture pour les sérovars Typhi et Typhimurium et même lors d'infections de modèle animal pour *S. Typhimurium*, et de déterminer si les régulateurs Fur, RfrA et RfrB influencent la quantité et la nature des sidérophores.

Contrairement au rôle de Fur dans la virulence de *Salmonella*, celui des petits ARN RfrA et RfrB est moins caractérisé. Les expériences de cette thèse ont démontré pour la première fois que les petits ARN RfrA et RfrB jouent un rôle dans la virulence de *S. Typhi*. Il serait donc important d'investiguer davantage l'implication de ces ARN dans la virulence de *S. Typhimurium* à différents niveaux de l'infection, notamment en testant un double mutant *rfrA/rfrB* chez les souris afin de corroborer les résultats obtenus chez les macrophages.

La protéine Fur est un régulateur global qui affecte l'expression d'un grand nombre de gènes ayant des fonctions diversifiées chez *Salmonella*, comme l'a démontré différentes études transcriptomiques et protéomiques chez *S. Typhimurium* (37, 119, 347, 349). Les gènes régulés par ce régulateur chez *S. Typhi* sont moins bien connus que chez *S. Typhimurium*. En effet, malgré une étude réalisée par la technique FURTA (28), aucune étude transcriptomique n'a été effectuée dans le but d'identifier les différents gènes régulés par le fer ou par Fur chez *S. Typhi*. Une telle étude est présentement en cours dans notre laboratoire où les gènes régulés par le fer et par Fur chez *S. Typhi* ont été identifiés à l'aide d'analyses par biopuces de l'ARN (cDNA) exprimé par la souche sauvage et le mutant *fur* en conditions riches et pauvres en fer. Cette étude permettra une comparaison des différentes cibles de ce régulateur entre les sérovars Typhi et Typhimurium. En effet, le mutant *fur* de ces deux sérovars présente plusieurs différences phénotypiques (chapitre 3) qui sont probablement dues à une régulation

différentielle ou une régulation de gènes uniques à chaque sérovar. Cette analyse permettra aussi d'identifier des nouvelles cibles de ce régulateur ayant des rôles dans l'homéostasie du fer ou dans la virulence de *S. Typhi* et qui pourraient expliquer en partie le mode d'infection spécifique à cette bactérie. Dans le même ordre d'idées, les cibles du petit ARN RyhB ont été déterminées chez *E. coli* via la surexpression de ce petit ARN (222) et les cibles de RfrA et RfrB ont été identifiées chez *S. Typhimurium* via l'étude des simples et double mutants (195), mais aucune étude n'a été effectuée pour déterminer les cibles de RfrA et RfrB chez *S. Typhi*. Puisque le génome de *S. Typhi* diffère de ces bactéries, il est fort probable que des gènes soient régulés par ces petits ARN spécifiquement chez *S. Typhi*. Ces données permettraient de faire un parallèle entre le rôle de ces petits ARN dans l'homéostasie du fer et la virulence de cette bactérie et leurs différentes cibles.

Finalement, le rôle des régulateurs de l'homéostasie du fer dans la virulence de *Salmonella* pourrait permettre l'établissement de nouveaux vaccins efficaces contre les salmonelloses ou contre d'autres infections via l'expression d'antigènes hétérologues. De tels vaccins bénéficiant du défaut de virulence du mutant *fur* sont présentement en développement. L'équipe du Dr Roy Curtiss III travaille actuellement sur des vaccins vivants atténués recombinants de *S. Typhi* et *S. Typhimurium* permettant entre autres de protéger les enfants contre la pneumonie causée par *S. pneumoniae* (77, 316). Ces vaccins doivent être complètement atténués afin de prévenir l'apparition de symptômes et doivent être très immunogéniques. Ces mutants combinent la mutation du gène *fur* à plusieurs autres mutations permettant d'être totalement avirulent. Pour contrer le fait que l'inactivation du gène *fur* dans ces souches vaccinales diminue leur résistance à l'acidité, cette équipe a développé une méthode permettant à ces souches vaccinales de résister au pH acide de l'estomac à l'aide du système *rhamnose-regulated arginine decarboxylase* (45). De plus, ils ont également développé un moyen d'exprimer les différents facteurs de virulence lors de l'immunisation, permettant à la souche vaccinale de coloniser efficacement les tissus lymphoïdes, pour ensuite inhiber leur expression afin de produire une atténuation à retardement (77). Par ailleurs, une autre étude a combiné un mutant *fur* à un mutant SPI-2 ( $\Delta$ *ssaV*) pour créer un vaccin vivant atténué chez *S. Typhimurium* (362). Ce vaccin s'est avéré être complètement atténué lors d'une infection systémique de souris, permettant l'établissement d'une immunité

efficace et protégeait la souris d'une infection subséquente. Ces développements de vaccins laissent croire qu'une combinaison de mutations est plus efficace qu'une mutation du gène *fur*. Puisque les vaccins actuels contre la fièvre typhoïde ne sont pas complètement efficaces et possèdent plusieurs désavantages, et que les infections par des salmonelles non-typhoïdiques invasives sont en augmentation, le développement de nouveaux vaccins est primordial pour protéger la population contre les salmonelloses.

## CHAPITRE 6 - Conclusion

L'homéostasie du fer est essentielle pour le bon fonctionnement de *Salmonella*. Lors d'une infection, cette bactérie doit compétitionner avec l'hôte pour obtenir le fer et doit réguler l'expression des gènes d'acquisition et du métabolisme du fer au moment approprié afin de survivre et d'être pleinement virulente. La régulation de ces gènes est cruciale pour cette bactérie et ainsi, le but de cette étude était de déterminer le rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer et la virulence de *Salmonella*.

Premièrement, cette étude montre que l'expression des sidérophores est soumise à une régulation rigoureuse par ces régulateurs. En conditions riches en fer, Fur est activé et inhibe l'expression des gènes de sidérophores de même que les gènes *rfrA* et *rfrB*. À l'inverse, en conditions de carence en fer, les petits ARN RfrA et RfrB sont exprimés, inhibent l'expression du gène *fur* et sont requis pour la production des sidérophores chez *S. Typhi*. Ensuite, Fur est important pour limiter le niveau de fer libre intracellulaire et protéger la cellule contre les dommages dus au stress oxydatif causé par l'augmentation du fer libre lorsque les petits ARN RfrA et RfrB sont exprimés. Également, les régulateurs de l'homéostasie du fer sont impliqués dans la virulence de *Salmonella* de plusieurs façons. Fur est nécessaire pour la motilité, l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales ainsi que l'entrée et la survie dans les macrophages, tandis que RfrA et RfrB sont importants pour la réplication intracellulaire dans les macrophages. Globalement, l'absence du régulateur Fur affecte beaucoup plus *S. Typhi* que *S. Typhimurium*. En effet, contrairement au mutant *fur* de *S. Typhimurium*, le mutant *fur* de *S. Typhi* forme des filaments, possède un important défaut de croissance dans plusieurs conditions *in vitro*, possède un grand défaut de motilité et est atténué lors de l'entrée et la survie dans les macrophages. Finalement, les régulateurs Fur, RfrA et RfrB peuvent réguler des gènes de virulences spécifiques à *S. Typhi* et absent chez *S. Typhimurium*. Il a été démontré que cette protéine et ces petits ARN régulent l'opéron fimbriaire *tef*. En effet, Fur active l'expression de ce fimbriae, et RfrA et RfrB l'inhibent en absence de Fur.

La protéine Fur et les petits ARN RfrA et RfrB sont impliqués non seulement dans la régulation de l'homéostasie du fer mais également dans la virulence de cette bactérie. De plus, ces régulateurs qui sont retrouvés chez les sérovars Typhimurium et Typhi affectent

différemment la physiologie et la virulence de ces deux bactéries, et régulent l'expression d'un facteur de virulence qui est spécifique à *S. Typhi*. Cela démontre que des régulateurs communs à deux bactéries apparentées peuvent avoir un effet distinct sur chacune des bactéries.

## Bibliographie

1. **Abdul-Tehrani, H., A.J. Hudson, Y.S. Chang, A.R. Timms, C. Hawkins, et al.** 1999. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J Bacteriol*, **181**(5): 1415-28.
2. **Achard, M.E., K.W. Chen, M.J. Sweet, R. Watts, K. Schroder, et al.** 2013. An antioxidant role for catecholate siderophores in *Salmonella*. *Biochem J*.
3. **Afonyushkin, T., B. Vecerek, I. Moll, U. Blasi and V.R. Kaberdin.** 2005. Both RNase E and RNase III control the stability of *sodB* mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB. *Nucleic Acids Res*, **33**(5): 1678-89.
4. **Africa, L.A., E.R. Murphy, N.R. Egan, A.F. Wigley and H.J. Wing.** 2011. The iron-responsive Fur/RyhB regulatory cascade modulates the *Shigella* outer membrane protease IcsP. *Infect Immun*, **79**(11): 4543-9.
5. **Agbaje, M., R.H. Begum, M.A. Oyekunle, O.E. Ojo and O.T. Adenubi.** 2011. Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiol (Praha)*, **56**(6): 497-503.
6. **Aiba, H.** 2007. Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol*, **10**(2): 134-9.
7. **Alen, C. and A.L. Sonenshein.** 1999. *Bacillus subtilis* aconitase is an RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(18): 10412-7.
8. **Almiron, M., A.J. Link, D. Furlong and R. Kolter.** 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **6**(12B): 2646-54.
9. **Althaus, E.W., C.E. Outten, K.E. Olson, H. Cao and T.V. O'Halloran.** 1999. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry*, **38**(20): 6559-69.
10. **Alvarez-Ordóñez, A., M. Begley, M. Prieto, W. Messens, M. Lopez, et al.** 2011. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*, **157**(Pt 12): 3268-81.
11. **Andrews-Polymenis, H.L., A.J. Baumler, B.A. McCormick and F.C. Fang.** 2010. Taming the elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis, and prevention. *Infect Immun*, **78**(6): 2356-69.
12. **Andrews, S.C., N.E. Le Brun, V. Barynin, A.J. Thomson, G.R. Moore, et al.** 1995. Site-directed replacement of the coaxial heme ligands of bacterioferritin generates heme-free variants. *J Biol Chem*, **270**(40): 23268-74.
13. **Andrews, S.C., A.K. Robinson and F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, **27**(2-3): 215-37.

14. **Annamalai, R., B. Jin, Z. Cao, S.M. Newton and P.E. Klebba.** 2004. Recognition of ferric catecholates by FepA. *J Bacteriol*, **186**(11): 3578-89.
15. **Argaman, L., M. Elgrably-Weiss, T. Hershko, J. Vogel and S. Altuvia.** 2012. RelA protein stimulates the activity of RyhB small RNA by acting on RNA-binding protein Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**(12): 4621-6.
16. **Argaman, L., R. Hershberg, J. Vogel, G. Bejerano, E.G. Wagner, et al.** 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol*, **11**(12): 941-50.
17. **Arricau, N., D. Hermant, H. Waxin, C. Ecobichon, P.S. Duffey, et al.** 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**(3): 835-50.
18. **Aslund, F., M. Zheng, J. Beckwith and G. Storz.** 1999. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(11): 6161-5.
19. **Audia, J.P., C.C. Webb and J.W. Foster.** 2001. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int J Med Microbiol*, **291**(2): 97-106.
20. **Bagg, A. and J.B. Neilands.** 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **26**(17): 5471-7.
21. **Bakowski, M.A., V. Braun and J.H. Brumell.** 2008. *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic*, **9**(12): 2022-31.
22. **Bao, G., M. Clifton, T.M. Hoette, K. Mori, S.X. Deng, et al.** 2010. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nat Chem Biol*, **6**(8): 602-9.
23. **Baothman, O.A., M.D. Rolfe and J. Green.** 2013. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aconitase A. *Microbiology*, **159**(Pt 6): 1209-16.
24. **Barton, H.A., Z. Johnson, C.D. Cox, A.I. Vasil and M.L. Vasil.** 1996. Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol Microbiol*, **21**(5): 1001-17.
25. **Bäumler, A.J.** 1997. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol*, **5**(8): 318-22.
26. **Bäumler, A.J., T.L. Norris, T. Lasco, W. Voight, R. Reissbrodt, et al.** 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, **180**(6): 1446-53.

27. **Bäumler, A.J., R.M. Tsolis, T.A. Ficht and L.G. Adams.** 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun*, **66**(10): 4579-87.
28. **Bäumler, A.J., R.M. Tsolis, A.W. van der Velden, I. Stojiljkovic, S. Anic, et al.** 1996. Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Gene*, **183**(1-2): 207-13.
29. **Bearson, B.L., S.M. Bearson, J.J. Uthe, S.E. Dowd, J.O. Houghton, et al.** 2008. Iron regulated genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to norepinephrine and the requirement of *fepDGC* for norepinephrine-enhanced growth. *Microbes Infect*, **10**(7): 807-16.
30. **Bearson, S., B. Bearson and J.W. Foster.** 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, **147**(2): 173-80.
31. **Beier, D. and R. Gross.** 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol*, **9**(2): 143-52.
32. **Benjamin, W.H., Jr., C.L. Turnbough, Jr., B.S. Posey and D.E. Briles.** 1985. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. *Infect Immun*, **50**(2): 392-7.
33. **Berger, T., A. Togawa, G.S. Duncan, A.J. Elia, A. You-Ten, et al.** 2006. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(6): 1834-9.
34. **Bhan, M.K., R. Bahl and S. Bhatnagar.** 2005. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet*, **366**(9487): 749-62.
35. **Bishop, A., D. House, T. Perkins, S. Baker, R. Kingsley, et al.** 2008. Interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion. *Microbiology*, **154**(Pt 7): 1914-26.
36. **Bister, B., D. Bischoff, G.J. Nicholson, M. Valdebenito, K. Schneider, et al.** 2004. The structure of salmochelins: C-glycosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals*, **17**(4): 471-81.
37. **Bjarnason, J., C.M. Southward and M.G. Surette.** 2003. Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol*, **185**(16): 4973-82.
38. **Bleuel, C., C. Grosse, N. Taudte, J. Scherer, D. Wesenberg, et al.** 2005. TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **187**(19): 6701-7.
39. **Bos, J., Y. Duverger, B. Thouvenot, C. Chiaruttini, C. Branlant, et al.** 2013. The sRNA RyhB regulates the synthesis of the *Escherichia coli* methionine sulfoxide reductase MsrB but not MsrA. *PLoS one*, **8**(5): e63647.

40. **Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros and M.F. Cellier.** 2002. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun*, **70**(11): 6032-42.
41. **Braun, V.** 2009. FhuA (TonA), the career of a protein. *J Bacteriol*, **191**(11): 3431-6.
42. **Braun, V., M. Braun and H. Killmann.** 2004. Ferrichrome- and citrate-mediated iron transport, in *Iron transport in bacteria*. J.H. Crosa, A.R. Mey, and S.M. Payne, Editors. ASM Press: Washington. p. 158-177.
43. **Braun, V. and H. Killmann.** 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci*, **24**(3): 104-9.
44. **Braun, V., S.I. Patzer and K. Hantke.** 2002. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*, **84**(5-6): 365-80.
45. **Brenneman, K.E., C. Willingham, W. Kong, R. Curtiss, 3rd and K.L. Roland.** 2013. Low-pH rescue of acid-sensitive *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains by a Rhamnose-regulated arginine decarboxylase system. *J Bacteriol*, **195**(13): 3062-72.
46. **Brenner, F.W., R.G. Villar, F.J. Angulo, R. Tauxe and B. Swaminathan.** 2000. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*, **38**(7): 2465-7.
47. **Brickman, T.J. and M.A. McIntosh.** 1992. Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J Biol Chem*, **267**(17): 12350-5.
48. **Bronowski, C. and C. Winstanley.** 2009. Identification and distribution of accessory genome DNA sequences from an invasive African isolate of *Salmonella* Heidelberg. *FEMS Microbiol Lett*, **298**(1): 29-36.
49. **Buchanan, S.K., B.S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, et al.** 1999. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol*, **6**(1): 56-63.
50. **Campoy, S., M. Jara, N. Busquets, A.M. de Rozas, I. Badiola, et al.** 2002. Intracellular cyclic AMP concentration is decreased in *Salmonella typhimurium fur* mutants. *Microbiology*, **148**(Pt 4): 1039-48.
51. **Carpenter, B.M., J.M. Whitmire and D.S. Merrell.** 2009. This is not your mother's repressor: the complex role of *fur* in pathogenesis. *Infect Immun*, **77**(7): 2590-601.
52. **Cartron, M.L., S. Maddocks, P. Gillingham, C.J. Craven and S.C. Andrews.** 2006. Feo-transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals*, **19**(2): 143-57.
53. **Cassat, J.E. and E.P. Skaar.** 2013. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*, **13**(5): 509-19.
54. **Caza, M., F. Lepine and C.M. Dozois.** 2011. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **80**(1): 266-82.

55. **Caza, M., F. Lepine, S. Milot and C.M. Dozois.** 2008. Specific roles of the *iroBCDEN* genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. *Infect Immun*, **76**(8): 3539-49.
56. **Chamngpol, S., W. Dodson, M.J. Cromie, Z.L. Harris and E.A. Groisman.** 2002. Fe(III)-mediated cellular toxicity. *Mol Microbiol*, **45**(3): 711-9.
57. **Chen, H.D. and E.A. Groisman.** 2013. The Biology of the PmrA/PmrB Two-Component System: The Major Regulator of Lipopolysaccharide Modifications. *Annu Rev Microbiol*, **67**: 83-112.
58. **Chenault, S.S. and C.F. Earhart.** 1991. Organization of genes encoding membrane proteins of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *Mol Microbiol*, **5**(6): 1405-13.
59. **Chenault, S.S. and C.F. Earhart.** 1992. Identification of hydrophobic proteins FepD and FepG of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *J Gen Microbiol*, **138**(10): 2167-71.
60. **Chiancone, E., P. Ceci, A. Ilari, F. Ribacchi and S. Stefanini.** 2004. Iron and proteins for iron storage and detoxification. *Biometals*, **17**(3): 197-202.
61. **Chibber, S. and S.B. Bhardwaj.** 2004. Protection in a mouse peritonitis model mediated by iron-regulated outer-membrane protein of *Salmonella typhi* coupled to its Vi antigen. *J Med Microbiol*, **53**(Pt 7): 705-9.
62. **Chlosta, S., D.S. Fishman, L. Harrington, E.E. Johnson, M.D. Knutson, et al.** 2006. The iron efflux protein ferroportin regulates the intracellular growth of *Salmonella enterica*. *Infect Immun*, **74**(5): 3065-7.
63. **Choi, E., E.A. Groisman and D. Shin.** 2009. Activated by different signals, the PhoP/PhoQ two-component system differentially regulates metal uptake. *J Bacteriol*, **191**(23): 7174-81.
64. **Clarke, T.E., L.W. Tari and H.J. Vogel.** 2001. Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr Top Med Chem*, **1**(1): 7-30.
65. **Collins, H.L.** 2008. Withholding iron as a cellular defence mechanism--friend or foe? *Eur J Immunol*, **38**(7): 1803-6.
66. **Colonna, B., M. Nicoletti, P. Visca, M. Casalino, P. Valenti, et al.** 1985. Composite IS1 elements encoding hydroxamate-mediated iron uptake in FIme plasmids from epidemic *Salmonella* spp. *J Bacteriol*, **162**(1): 307-16.
67. **Compan, I. and D. Touati.** 1993. Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **175**(6): 1687-96.
68. **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**(5): 1071-82.

69. **Cornelis, P., Q. Wei, S.C. Andrews and T. Vinckx.** 2011. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics*, **3**(6): 540-9.
70. **Correnti, C. and R.K. Strong.** 2012. Mammalian siderophores, siderophore-binding lipocalins, and the labile iron pool. *J Biol Chem*, **287**(17): 13524-31.
71. **Coy, M. and J.B. Neilands.** 1991. Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry*, **30**(33): 8201-10.
72. **Crawford, R.W., R. Rosales-Reyes, L. Ramirez-Aguilar Mde, O. Chapa-Azuela, C. Alpuche-Aranda, et al.** 2010. Gallstones play a significant role in *Salmonella spp.* gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(9): 4353-8.
73. **Crosa, J.H.** 1997. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**(3): 319-36.
74. **Crouch, M.L., M. Castor, J.E. Karlinsey, T. Kalhorn and F.C. Fang.** 2008. Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, **67**(5): 971-83.
75. **Crump, J.A., S.P. Luby and E.D. Mintz.** 2004. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ*, **82**(5): 346-53.
76. **Cuellar-Mata, P., N. Jabado, J. Liu, W. Furuya, B. Finlay, et al.** 2002. Nramp1 modifies the fusion of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles with cellular endomembranes in macrophages. *J Biol Chem*, **277**(3): 2258-65.
77. **Curtiss, R., 3rd, S.Y. Wanda, B.M. Gunn, X. Zhang, S.A. Tinge, et al.** 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect Immun*, **77**(3): 1071-82.
78. **da Silva Neto, J.F., V.S. Braz, V.C. Italiani and M.V. Marques.** 2009. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res*, **37**(14): 4812-25.
79. **Davis, B.M., M. Quinones, J. Pratt, Y. Ding and M.K. Waldor.** 2005. Characterization of the small untranslated RNA RyhB and its regulon in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, **187**(12): 4005-14.
80. **De Lay, N., D.J. Schu and S. Gottesman.** 2013. Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *J Biol Chem*, **288**(12): 7996-8003.
81. **de Lorenzo, V., M. Herrero, F. Giovannini, and J. B. Neilands.** 1988. Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **173**: 537-546.
82. **de Lorenzo, V., J. Perez-Martin, L. Escolar, G. Pesole and G. Bertonni.** 2004. Mode of binding of the Fur protein to target DNA: negative regulation of iron-controlled gene expression, in *Iron transport in bacteria*. J.H. Crosa, A.R. Mey, and S.M. Payne, Editors. ASM Press: Washington. p. 185-198.

83. **den Bakker, H.C., A.I. Moreno Switt, G. Govoni, C.A. Cummings, M.L. Ranieri, et al.** 2011. Genome sequencing reveals diversification of virulence factor content and possible host adaptation in distinct subpopulations of *Salmonella enterica*. *BMC genomics*, **12**: 425.
84. **Deng, Z., X. Meng, S. Su, Z. Liu, X. Ji, et al.** 2012. Two sRNA RyhB homologs from *Yersinia pestis* biovar microtus expressed in vivo have differential Hfq-dependent stability. *Res Microbiol*, **163**(6-7): 413-8.
85. **Deriu, E., J.Z. Liu, M. Pezeshki, R.A. Edwards, R.J. Ochoa, et al.** 2013. Probiotic bacteria reduce *Salmonella typhimurium* intestinal colonization by competing for iron. *Cell Host Microbe*, **14**(1): 26-37.
86. **Desin, T.S., W. Koster and A.A. Potter.** 2013. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines*, **12**(1): 87-96.
87. **Desnoyers, G., A. Morissette, K. Prevost and E. Masse.** 2009. Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *Embo J*, **28**(11): 1551-61.
88. **Devireddy, L.R., D.O. Hart, D.H. Goetz and M.R. Green.** 2010. A mammalian siderophore synthesized by an enzyme with a bacterial homolog involved in enterobactin production. *Cell*, **141**(6): 1006-17.
89. **Doolittle, R., D. Feng, S. Tsang, G. Cho and E. Little.** 1996. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science*, **271**(5248): 470-7.
90. **Dorman, C.J. and P. Deighan.** 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev*, **13**(2): 179-84.
91. **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**(3): 263-8.
92. **Earhart, C.F.** 2004. Iron uptake via the enterobactin system, in *Iron transport in bacteria*. J.H. Crosa, A.R. Mey, and S.M. Payne, Editors. ASM Press: Washington. p. 133-146.
93. **Ecker, D.J., B.F. Matzanke and K.N. Raymond.** 1986. Recognition and transport of ferric enterobactin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **167**(2): 666-73.
94. **Ellermeier, C.D. and J.M. Slauch.** 2006. The Genus *Salmonella*, in *The Prokaryotes*. M. Dworkin, et al., Editors. Springer: New York. p. 123-158.
95. **Ellermeier, J.R. and J.M. Slauch.** 2007. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol*, **10**(1): 24-9.

96. **Ellermeier, J.R. and J.M. Slauch.** 2008. Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J Bacteriol*, **190**(2): 476-86.
97. **Ernst, J.F., R.L. Bennett and L.I. Rothfield.** 1978. Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, **135**(3): 928-34.
98. **Escolar, L., J. Perez-Martin and V. de Lorenzo.** 1998. Binding of the Fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol*, **283**(3): 537-47.
99. **Escolar, L., J. Perez-Martin and V. de Lorenzo.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol*, **181**(20): 6223-9.
100. **Fabrega, A. and J. Vila.** 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev*, **26**(2): 308-41.
101. **Fang, F., S. Libby, N. Buchmeier, P. Loewen, J. Switala, et al.** 1992. The alternative sigma factor katF (rpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(24): 11978-82.
102. **Fang, F.C., M.A. DeGroot, J.W. Foster, A.J. Baumler, U. Ochsner, et al.** 1999. Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(13): 7502-7.
103. **Farr, S.B. and T. Kogoma.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev*, **55**(4): 561-85.
104. **Fass, E. and E.A. Groisman.** 2009. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol*, **12**(2): 199-204.
105. **Feasey, N.A., G. Dougan, R.A. Kingsley, R.S. Heyderman and M.A. Gordon.** 2012. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet*, **379**(9835): 2489-99.
106. **Feng, Y., W.Q. Liu, K.E. Sanderson and S.L. Liu.** 2011. Comparison of *Salmonella* genomes, in *Salmonella from genome to function*. S. Porwollik, Editor Caister Academic Press: Norfolk. p. 49-68.
107. **Fernandez-Beros, M.E., C. Gonzalez, M.A. McIntosh and F.C. Cabello.** 1989. Immune response to the iron-deprivation-induced proteins of *Salmonella typhi* in typhoid fever. *Infect Immun*, **57**(4): 1271-5.
108. **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 U S A*, **83**: 5189-5193.
109. **Figueira, R. and D.W. Holden.** 2012. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology*, **158**(Pt 5): 1147-61.

110. **Fischbach, M.A., H. Lin, D.R. Liu and C.T. Walsh.** 2005. In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(3): 571-6.
111. **Fischbach, M.A., H. Lin, D.R. Liu and C.T. Walsh.** 2006. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat Chem Biol*, **2**(3): 132-8.
112. **Fischbach, M.A., H. Lin, L. Zhou, Y. Yu, R.J. Abergel, et al.** 2006. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(44): 16502-7.
113. **Flo, T.H., K.D. Smith, S. Sato, D.J. Rodriguez, M.A. Holmes, et al.** 2004. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, **432**(7019): 917-21.
114. **Forbes, J.R. and P. Gros.** 2001. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*, **9**(8): 397-403.
115. **Forest, C., S.P. Faucher, K. Poirier, S. Houle, C.M. Dozois, et al.** 2007. Contribution of the *stg* fimbrial operon of *Salmonella enterica* serovar Typhi during interaction with human cells. *Infect. Immun.*, **75**: 5264-5271.
116. **Forest, C., E. Ferraro, S. Sabbagh and F. Daigle.** 2010. Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is SPI-2 independent. *Microbiology*, **156**(Pt 12): 3689-98.
117. **Foster, J.** 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J Bacteriol*, **173**(21): 6896-902.
118. **Foster, J. and H. Hall.** 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, **173**(16): 5129-35.
119. **Foster, J. and H. Hall.** 1992. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J Bacteriol*, **174**(13): 4317-23.
120. **Franze de Fernandez, M.T., L. Eoyang and J.T. August.** 1968. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature*, **219**(5154): 588-90.
121. **Frawley, E.R., M.L. Crouch, L.K. Bingham-Ramos, H.F. Robbins, W. Wang, et al.** 2013. Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in *Salmonella* Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**(29): 12054-9.
122. **Fritsche, G., M. Nairz, S.J. Libby, F.C. Fang and G. Weiss.** 2012. Slc11a1 (Nramp1) impairs growth of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in macrophages via stimulation of lipocalin-2 expression. *J Leukoc Biol*, **92**(2): 353-9.
123. **Frohlich, K.S. and J. Vogel.** 2009. Activation of gene expression by small RNA. *Curr Opin Microbiol*, **12**(6): 674-82.

124. **Frueh, D.P., H. Arthanari, A. Koglin, D.A. Vosburg, A.E. Bennett, et al.** 2008. Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase. *Nature*, **454**(7206): 903-6.
125. **Furman, M., A. Fica, M. Saxena, J.L. Di Fabio and F.C. Cabello.** 1994. *Salmonella typhi* iron uptake mutants are attenuated in mice. *Infect. Immun.*, **62**(9): 4091-4.
126. **Furrer, J.L., D.N. Sanders, I.G. Hook-Barnard and M.A. McIntosh.** 2002. Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol Microbiol*, **44**(5): 1225-34.
127. **Galán, J. and A. Collmer.** 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, **284**(5418): 1322-8.
128. **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**(16): 6383-7.
129. **Ganz, T. and E. Nemeth.** 2012. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, **1823**(9): 1434-43.
130. **Garcia-del Portillo, F., J.W. Foster and B.B. Finlay.** 1993. Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun*, **61**(10): 4489-92.
131. **Gehring, A.M., K.A. Bradley and C.T. Walsh.** 1997. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry*, **36**(28): 8495-503.
132. **Geissmann, T.A. and D. Touati.** 2004. Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *Embo J*, **23**(2): 396-405.
133. **Goetz, D.H., M.A. Holmes, N. Borregaard, M.E. Bluhm, K.N. Raymond, et al.** 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*, **10**(5): 1033-43.
134. **Gonzalez-Escobedo, G., J.M. Marshall and J.S. Gunn.** 2011. Chronic and acute infection of the gall bladder by *Salmonella Typhi*: understanding the carrier state. *Nat Rev Microbiol*, **9**(1): 9-14.
135. **Gorbacheva, V.Y., G. Faundez, H.P. Godfrey and F.C. Cabello.** 2001. Restricted growth of *ent*(-) and *tonB* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human Mono Mac 6 monocytic cells. *FEMS Microbiol Lett*, **196**(1): 7-11.
136. **Gorvel, J.P. and S. Meresse.** 2001. Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes Infect*, **3**(14-15): 1299-303.
137. **Gottesman, S.** 1984. Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annu Rev Genet*, **18**: 415-41.
138. **Gottesman, S.** 2005. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet*, **21**(7): 399-404.

139. **Gottesman, S., C.A. McCullen, M. Guillier, C.K. Vanderpool, N. Majdalani, et al.** 2006. Small RNA regulators and the bacterial response to stress. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**: 1-11.
140. **Grass, G.** 2006. Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. *Biometals*, **19**(2): 159-72.
141. **Guillier, M. and S. Gottesman.** 2006. Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol*, **59**(1): 231-47.
142. **Guillier, M. and S. Gottesman.** 2008. The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic Acids Res*, **36**(21): 6781-94.
143. **Gunn, J.S.** 2008. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol*, **16**(6): 284-90.
144. **Hall, H.K.a.J.W.F.** 1996. The role of Fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol*, **178**: 5683-5691.
145. **Halsey, T.A., A. Vazquez-Torres, D.J. Gravidahl, F.C. Fang and S.J. Libby.** 2004. The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative stress resistance and virulence. *Infect Immun*, **72**(2): 1155-8.
146. **Hansen-Wester, I. and M. Hensel.** 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect*, **3**(7): 549-59.
147. **Hantke, K.** 1981. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet*, **182**(2): 288-92.
148. **Hantke, K.** 1983. Identification of an iron uptake system specific for coprogen and rhodotorulic acid in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet*, **191**(2): 301-6.
149. **Hantke, K.** 1990. Dihydroxybenzoylserine--a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett*, **55**(1-2): 5-8.
150. **Hantke, K.** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, **4**(2): 172-7.
151. **Hantke, K.** 2003. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol*, **11**(5): 192-5.
152. **Hantke, K.** 2004. Ferrous iron transport, in *Iron transport in bacteria*. J.H. Crosa, A.R. Mey, and S.M. Payne, Editors. ASM Press: Washington. p. 178-184.
153. **Hantke, K., G. Nicholson, W. Rabsch and G. Winkelmann.** 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(7): 3677-82.
154. **Haraga, A., M. Ohlson and S. Miller.** 2008. Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*, **6**(1): 53-66.

155. **Harris, J., A. Baresch-Bernal, S. Rollins, A. Alam, R. LaRocque, et al.** 2006. Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun*, **74**(9): 5161-8.
156. **Harshey, R.M.** 2011. New insights into the role and formation of flagella in *Salmonella*, in *Salmonella from genome to function*. S. Porwollik, Editor Caister Academic Press: Norfolk. p. 163-186.
157. **Hebrard, M., C. Kroger, S. Srikumar, A. Colgan, K. Handler, et al.** 2012. sRNAs and the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *RNA Biol*, **9**(4): 437-45.
158. **Hebrard, M., J.P. Viala, S. Meresse, F. Barras and L. Aussel.** 2009. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *J Bacteriol*, **191**(14): 4605-14.
159. **Heidinger, S., V. Braun, V.L. Pecoraro and K.N. Raymond.** 1983. Iron supply to *Escherichia coli* by synthetic analogs of enterochelin. *J Bacteriol*, **153**(1): 109-15.
160. **Hensel, M.** 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*, **36**(5): 1015-23.
161. **Hensel, M., J. Shea, S. Waterman, R. Mundy, T. Nikolaus, et al.** 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol*, **30**(1): 163-74.
162. **Higgs, P.I., R.A. Larsen and K. Postle.** 2002. Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol Microbiol*, **44**(1): 271-81.
163. **Hohmann, E.L.** 2001. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis*, **32**(2): 263-9.
164. **Hoiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin and O. Ciofu.** 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, **35**(4): 322-32.
165. **Holmes, M.A., W. Paulsene, X. Jide, C. Ratledge and R.K. Strong.** 2005. Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure*, **13**(1): 29-41.
166. **Holt, J.G.** 1993. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Bergey, Baltimore, Williams & Wilkins.
167. **Horiyama, T., A. Yamaguchi and K. Nishino.** 2010. TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother*, **65**(7): 1372-6.
168. **Horst, S.A., T. Jaeger, L.A. Denkel, S.F. Rouf, M. Rhen, et al.** 2010. Thiol peroxidase protects *Salmonella enterica* from hydrogen peroxide stress in vitro and facilitates intracellular growth. *J Bacteriol*, **192**(11): 2929-32.
169. **Horvath, P. and R. Barrangou.** 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, **327**(5962): 167-70.

170. **House, D., A. Bishop, C. Parry, G. Dougan and J. Wain.** 2001. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr Opin Infect Dis*, **14**(5): 573-8.
171. **Huang, S.H., C.K. Wang, H.L. Peng, C.C. Wu, Y.T. Chen, et al.** 2012. Role of the small RNA RyhB in the Fur regulon in mediating the capsular polysaccharide biosynthesis and iron acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol*, **12**: 148.
172. **Humphrey, S., T. Macvicar, A. Stevenson, M. Roberts, T.J. Humphrey, et al.** 2011. SulA-induced filamentation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: effects on SPI-1 expression and epithelial infection. *J Appl Microbiol*, **111**(1): 185-96.
173. **Humphries, A.D., M. Raffatellu, S. Winter, E.H. Weening, R.A. Kingsley, et al.** 2003. The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Mol Microbiol*, **48**(5): 1357-76.
174. **Ikeda, J.S., A. Janakiraman, D.G. Kehres, M.E. Maguire and J.M. Slauch.** 2005. Transcriptional regulation of *sitABCD* of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by MntR and Fur. *J Bacteriol*, **187**(3): 912-22.
175. **Imbert, M. and R. Blondeau.** 1998. On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr Microbiol*, **37**(1): 64-6.
176. **Imlay, J.A. and S. Linn.** 1987. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, **169**(7): 2967-76.
177. **Izumiya, H., T. Sekizuka, H. Nakaya, M. Taguchi, A. Oguchi, et al.** 2011. Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**(2): 623-30.
178. **Jabado, N., P. Cuellar-Mata, S. Grinstein and P. Gros.** 2003. Iron chelators modulate the fusogenic properties of *Salmonella*-containing phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(10): 6127-32.
179. **Jacques, J.F., S. Jang, K. Prevost, G. Desnoyers, M. Desmarais, et al.** 2006. RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **62**(4): 1181-90.
180. **Janakiraman, A. and J.M. Slauch.** 2000. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, **35**(5): 1146-55.
181. **Javayel, S., K. Papenfort and J. Vogel.** 2011. The small RNAs of *Salmonella*, in *Salmonella from genome to function*. S. Porwollik, Editor Caister Academic Press: Norfolk. p. 123-148.

182. **Jones, B., N. Ghorri and S. Falkow.** 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med*, **180**(1): 15-23.
183. **Kadner, R.J., K. Heller, J.W. Coulton and V. Braun.** 1980. Genetic control of hydroxamate-mediated iron uptake in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **143**(1): 256-64.
184. **Kammler, M., C. Schon and K. Hantke.** 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **175**(19): 6212-9.
185. **Kaneshige, T., K. Yaguchi and T. Ohgitani.** 2009. Siderophore receptor IroN is an important protective antigen against *Salmonella* infection in chickens. *Avian Dis*, **53**(4): 563-7.
186. **Karlinsey, J.E., M.E. Maguire, L.A. Becker, M.L. Crouch and F.C. Fang.** 2010. The phage shock protein PspA facilitates divalent metal transport and is required for virulence of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *Mol Microbiol*, **78**(3): 669-85.
187. **Kazmierczak, M.J., M. Wiedmann and K.J. Boor.** 2005. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69**(4): 527-43.
188. **Kehres, D.G., A. Janakiraman, J.M. Slauch and M.E. Maguire.** 2002. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>. *J Bacteriol*, **184**(12): 3151-8.
189. **Kehres, D.G., A. Janakiraman, J.M. Slauch and M.E. Maguire.** 2002. SitABCD is the alkaline Mn<sup>2+</sup> transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, **184**(12): 3159-66.
190. **Kehres, D.G., M.L. Zaharik, B.B. Finlay and M.E. Maguire.** 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol*, **36**(5): 1085-100.
191. **Keyer, K. and J.A. Imlay.** 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(24): 13635-40.
192. **Kim, H., H. Lee and D. Shin.** 2012. The FeoA protein is necessary for the FeoB transporter to import ferrous iron. *Biochem Biophys Res Commun*, **423**(4): 733-8.
193. **Kim, H., H. Lee and D. Shin.** 2013. The FeoC Protein Leads to High Cellular Levels of the Fe(II) Transporter FeoB by Preventing FtsH Protease Regulation of FeoB in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, **195**(15): 3364-70.
194. **Kim, J.N. and Y.M. Kwon.** 2013. Genetic and phenotypic characterization of the RyhB regulon in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol Res*, **168**(1): 41-9.
195. **Kim, J.N. and Y.M. Kwon.** 2013. Identification of target transcripts regulated by small RNA RyhB homologs in *Salmonella*: RyhB-2 regulates motility phenotype. *Microbiol Res* **168**(10): 621-629.

196. **Kingsley, R., W. Rabsch, M. Roberts, R. Reissbrodt and P.H. Williams.** 1996. TonB-dependent iron supply in *Salmonella* by alpha-ketoacids and alpha-hydroxyacids. *FEMS Microbiol Lett*, **140**(1): 65-70.
197. **Kingsley, R.A., R. Reissbrodt, W. Rabsch, J.M. Ketley, R.M. Tsolis, et al.** 1999. Ferrioxamine-mediated Iron(III) utilization by *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol*, **65**(4): 1610-8.
198. **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.
199. **Korea, C.G., R. Badouraly, M.C. Prevost, J.M. Ghigo and C. Beloin.** 2010. *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environ Microbiol*, **12**(7): 1957-77.
200. **Koronakis, V.** 2003. TolC--the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Lett*, **555**(1): 66-71.
201. **Kothari, A., A. Pruthi and T.D. Chugh.** 2008. The burden of enteric fever. *J Infect Dev Ctries*, **2**(4): 253-9.
202. **Krewulak, K.D. and H.J. Vogel.** 2011. TonB or not TonB: is that the question? *Biochem Cell Biol*, **89**(2): 87-97.
203. **Kuhn, D.E., B.D. Baker, W.P. Lafuse and B.S. Zwillig.** 1999. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169. *J Leukoc Biol*, **66**(1): 113-9.
204. **Lavrrar, J.L. and M.A. McIntosh.** 2003. Architecture of a *fur* binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol*, **185**(7): 2194-202.
205. **Leclerc, J.M., C.M. Dozois and F. Daigle.** 2013. Role of the *Salmonella enterica* serovar Typhi Fur regulator and small RNAs RfrA and RfrB in iron homeostasis and interaction with host cells. *Microbiology*, **159**(Pt 3): 591-602.
206. **Lee, F.K., C. Morris and J. Hackett.** 2006. The *Salmonella enterica* serovar Typhi Vi capsule and self-association pili share controls on expression. *FEMS Microbiol Lett*, **261**(1): 41-6.
207. **Lee, J.W. and J.D. Helmann.** 2007. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals*, **20**(3-4): 485-99.
208. **Leveille, S., M. Caza, J.R. Johnson, C. Clabots, M. Sabri, et al.** 2006. Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infect Immun*, **74**(6): 3427-36.
209. **Lewin, A.C., P.A. Doughty, L. Flegg, G.R. Moore and S. Spiro.** 2002. The ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion. *Microbiology*, **148**(Pt 8): 2449-56.

210. **Lin, H., M.A. Fischbach, D.R. Liu and C.T. Walsh.** 2005. In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J Am Chem Soc*, **127**(31): 11075-84.
211. **Luo, M., H. Lin, M.A. Fischbach, D.R. Liu, C.T. Walsh, et al.** 2006. Enzymatic tailoring of enterobactin alters membrane partitioning and iron acquisition. *ACS Chem Biol*, **1**(1): 29-32.
212. **Lymberopoulos, M., S. Houle, F. Daigle, S. Léveillé, A. Brée, et al.** 2006. Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract. *J Bacteriol*, **188**(18): 6449-59.
213. **Majowicz, S.E., J. Musto, E. Scallan, F.J. Angulo, M. Kirk, et al.** 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, **50**(6): 882-9.
214. **Makui, H., E. Roig, S.T. Cole, J.D. Helmann, P. Gros, et al.** 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol*, **35**(5): 1065-78.
215. **Mandin, P. and M. Guillier.** 2013. Expanding control in bacteria: interplay between small RNAs and transcriptional regulators to control gene expression. *Curr Opin Microbiol*, **16**(2): 125-32.
216. **Marlovits, T.C., W. Haase, C. Herrmann, S.G. Aller and V.M. Unger.** 2002. The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(25): 16243-8.
217. **Martin, L.B.** 2012. Vaccines for typhoid fever and other salmonellosis. *Curr Opin Infect Dis*, **25**(5): 489-99.
218. **Masse, E. and M. Arguin.** 2005. Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem Sci*, **30**(8): 462-8.
219. **Masse, E., F.E. Escorcía and S. Gottesman.** 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **17**(19): 2374-83.
220. **Masse, E. and S. Gottesman.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(7): 4620-5.
221. **Masse, E., H. Salvail, G. Desnoyers and M. Arguin.** 2007. Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr Opin Microbiol*, **10**(2): 140-5.
222. **Masse, E., C.K. Vanderpool and S. Gottesman.** 2005. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **187**(20): 6962-71.
223. **Mastroeni, P. and A.J. Grant.** 2011. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. *Expert Rev Mol Med*, **13**: e12.

224. **Matzanke, B.F., S. Anemuller, V. Schunemann, A.X. Trautwein and K. Hantke.** 2004. FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry*, **43**(5): 1386-92.
225. **McClelland, M., K. Sanderson, J. Spieth, S. Clifton, P. Latreille, et al.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, **413**(6858): 852-6.
226. **McDougall, S. and J.B. Neilands.** 1984. Plasmid- and chromosome-coded aerobactin synthesis in enteric bacteria: insertion sequences flank operon in plasmid-mediated systems. *J Bacteriol*, **159**(1): 300-5.
227. **Methner, U., W. Rabsch, R. Reissbrodt and P.H. Williams.** 2008. Effect of norepinephrine on colonisation and systemic spread of *Salmonella enterica* in infected animals: role of catechol siderophore precursors and degradation products. *Int J Med Microbiol*, **298**(5-6): 429-39.
228. **Mey, A.R., S.A. Craig and S.M. Payne.** 2005. Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of ryhB in biofilm formation. *Infect Immun*, **73**(9): 5706-19.
229. **Miethke, M.** 2013. Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems. *Metallomics*, **5**(1): 15-28.
230. **Mills, D., V. Bajaj and C. Lee.** 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol*, **15**(4): 749-59.
231. **Mills, S.A. and M.A. Marletta.** 2005. Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the ferric uptake regulator from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **44**(41): 13553-9.
232. **Mirus, O., S. Strauss, K. Nicolaisen, A. von Haeseler and E. Schleiff.** 2009. TonB-dependent transporters and their occurrence in cyanobacteria. *BMC Biol*, **7**: 68.
233. **Moller, T., T. Franch, P. Hojrup, D.R. Keene, H.P. Bachinger, et al.** 2002. Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell*, **9**(1): 23-30.
234. **Morita, T., K. Maki and H. Aiba.** 2005. RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev*, **19**(18): 2176-86.
235. **Morita, T., Y. Mochizuki and H. Aiba.** 2006. Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(13): 4858-63.
236. **Morpeth, S.C., H.O. Ramadhani and J.A. Crump.** 2009. Invasive non-Typhi *Salmonella* disease in Africa. *Clin Infect Dis*, **49**(4): 606-11.
237. **Muller, C.M., U. Dobrindt, G. Nagy, L. Emody, B.E. Uhlin, et al.** 2006. Role of histone-like proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **188**(15): 5428-38.

238. **Murphree, D., B. Froehlich and J.R. Scott.** 1997. Transcriptional control of genes encoding CS1 pili: negative regulation by a silencer and positive regulation by Rns. *J Bacteriol*, **179**(18): 5736-43.
239. **Murphy, E.R. and S.M. Payne.** 2007. RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates *Shigella dysenteriae* virulence. *Infect Immun*, **75**(7): 3470-7.
240. **Murray, G.L., S.R. Attridge and R. Morona.** 2003. Regulation of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol Microbiol*, **47**(5): 1395-406.
241. **Nairz, M., G. Fritsche, P. Brunner, H. Talasz, K. Hantke, et al.** 2008. Interferon-gamma limits the availability of iron for intramacrophage *Salmonella typhimurium*. *Eur J Immunol*, **38**(7): 1923-36.
242. **Nairz, M., G. Fritsche, M.L. Crouch, H.C. Barton, F.C. Fang, et al.** 2009. Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition. *Cell Microbiol*, **11**(9): 1365-81.
243. **Nairz, M., U. Schleicher, A. Schroll, T. Sonnweber, I. Theurl, et al.** 2013. Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in *Salmonella* infection. *J Exp Med*, **210**(5): 855-73.
244. **Nairz, M., A. Schroll, T. Sonnweber and G. Weiss.** 2010. The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface. *Cell Microbiol*, **12**(12): 1691-702.
245. **Nairz, M., I. Theurl, S. Ludwiczek, M. Theurl, S.M. Mair, et al.** 2007. The coordinated regulation of iron homeostasis in murine macrophages limits the availability of iron for intracellular *Salmonella typhimurium*. *Cell Microbiol*, **9**(9): 2126-40.
246. **Nandal, A., C.C. Huggins, M.R. Woodhall, J. McHugh, F. Rodriguez-Quinones, et al.** 2010. Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe(2+)-Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent. *Mol Microbiol*, **75**(3): 637-57.
247. **Neilands, J.B.** 1976. Siderophores: diverse roles in microbial and human physiology. *Ciba Found Symp*, (51): 107-24.
248. **Newton, S.M., V. Trinh, H. Pi and P.E. Klebba.** 2010. Direct measurements of the outer membrane stage of ferric enterobactin transport: postuptake binding. *J Biol Chem*, **285**(23): 17488-97.
249. **Nicholson, B. and D. Low.** 2000. DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, **35**(4): 728-42.
250. **Nikaido, H. and E.Y. Rosenberg.** 1990. Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with beta-lactam antibiotics containing catechol and analogous groups. *J Bacteriol*, **172**(3): 1361-7.

251. **Nishino, K., F.F. Hsu, J. Turk, M.J. Cromie, M.M. Wosten, et al.** 2006. Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III). *Mol Microbiol*, **61**(3): 645-54.
252. **Noinaj, N., M. Guillier, T.J. Barnard and S.K. Buchanan.** 2010. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol*, **64**: 43-60.
253. **Nuccio, S.P., N.R. Thomson, M.C. Fookes and A.J. Bäumlner.** 2011. Fimbrial signature arrangements in *Salmonella*, in *Salmonella from genome to function*. S. Porwollik, Editor Caister Academic Press: Norfolk. p. 149-162.
254. **O'Brien, I.G. and F. Gibson.** 1970. The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **215**(2): 393-402.
255. **Ochman, H. and A.C. Wilson.** 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol*, **26**(1-2): 74-86.
256. **Oelschlaeger, T., D. Zhang, S. Schubert, E. Carniel, W. Rabsch, et al.** 2003. The high-pathogenicity island is absent in human pathogens of *Salmonella enterica* subspecies I but present in isolates of subspecies III and VI. *J Bacteriol*, **185**(3): 1107-11.
257. **Ogasawara, H., K. Yamada, A. Kori, K. Yamamoto and A. Ishihama.** 2010. Regulation of the *Escherichia coli* csgD promoter: interplay between five transcription factors. *Microbiology*, **156**(Pt 8): 2470-83.
258. **Oglesby-Sherrouse, A.G. and E.R. Murphy.** 2013. Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme. *Metallomics*, **5**(4): 276-86.
259. **Oglesby, A.G., E.R. Murphy, V.R. Iyer and S.M. Payne.** 2005. Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and ydeP. *Mol Microbiol*, **58**(5): 1354-67.
260. **Olsen, J.E., K.H. Hoegh-Andersen, J. Casadesus, J. Rosenkranzt, M.S. Chadfield, et al.** 2013. The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar *S. Typhimurium*. *BMC Microbiol*, **13**: 67.
261. **Ortega, A., J. Gonzalo-Asensio and F. Garcia-Del Portillo.** 2012. Dynamics of *Salmonella* small RNA expression in non-growing bacteria located inside eukaryotic cells. *RNA Biol*, **9**(4): 469-488.
262. **Osman, D. and J.S. Cavet.** 2011. Metal sensing in *Salmonella*: implications for pathogenesis. *Adv Microb Physiol*, **58**: 175-232.
263. **Padalon-Brauch, G., R. Hershberg, M. Elgrably-Weiss, K. Baruch, I. Rosenshine, et al.** 2008. Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res*, **36**(6): 1913-27.

264. **Papenfort, K. and J. Vogel.** 2009. Multiple target regulation by small noncoding RNAs rewires gene expression at the post-transcriptional level. *Res Microbiol*, **160**(4): 278-87.
265. **Papenfort, K. and J. Vogel.** 2010. Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe*, **8**(1): 116-27.
266. **Parkhill, J., G. Dougan, K. James, N. Thomson, D. Pickard, et al.** 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, **413**(6858): 848-52.
267. **Parry, C.M., T.T. Hien, G. Dougan, N.J. White and J.J. Farrar.** 2002. Typhoid fever. *N Engl J Med*, **347**(22): 1770-82.
268. **Paterson, G.K. and D.J. Maskell.** 2010. Recent advances in the field of *Salmonella* Typhi vaccines. *Hum Vaccin*, **6**(5): 379-84.
269. **Patzer, S.I., M.R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno and K. Hantke.** 2003. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology*, **149**(Pt 9): 2557-70.
270. **Patzer, S.I. and K. Hantke.** 2001. Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the mntH gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **183**(16): 4806-13.
271. **Payne, S.M. and A.R. Mey.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*, in *Iron transport in bacteria*. J.H. Crosa, A.R. Mey, and S.M. Payne, Editors. ASM Press: Washington. p. 199-218.
272. **Pickard, D., J. Wain, S. Baker, A. Line, S. Chohan, et al.** 2003. Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol*, **185**(17): 5055-65.
273. **Pollack, J.R. and J.B. Neilands.** 1970. Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun*, **38**(5): 989-92.
274. **Popoff, M.Y., J. Bockemuhl and L.L. Gheesling.** 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, **155**(7): 568-70.
275. **Porwollik, S. and M. McClelland.** 2003. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect*, **5**(11): 977-89.
276. **Posey, J.E. and F.C. Gherardini.** 2000. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*, **288**(5471): 1651-3.
277. **Prevost, K., G. Desnoyers, J.F. Jacques, F. Lavoie and E. Masse.** 2011. Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes Dev*, **25**(4): 385-96.
278. **Prevost, K., H. Salvail, G. Desnoyers, J.F. Jacques, E. Phaneuf, et al.** 2007. The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of

- shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol*, **64**(5): 1260-73.
279. **Rabsch, W., L. Ma, G. Wiley, F.Z. Najar, W. Kaserer, et al.** 2007. FepA- and TonB-dependent bacteriophage H8: receptor binding and genomic sequence. *J Bacteriol*, **189**(15): 5658-74.
280. **Rabsch, W., U. Methner, W. Voigt, H. Tschape, R. Reissbrodt, et al.** 2003. Role of receptor proteins for enterobactin and 2,3-dihydroxybenzoylserine in virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun*, **71**(12): 6953-61.
281. **Rabsch, W., W. Voigt, R. Reissbrodt, R. Tsolis and A. Bäumlner.** 1999. *Salmonella typhimurium* IronN and FepA proteins mediate uptake of enterobactin but differ in their specificity for other siderophores. *J Bacteriol*, **181**(11): 3610-2.
282. **Raffatellu, M. and A.J. Baumber.** 2010. *Salmonella's* iron armor for battling the host and its microbiota. *Gut Microbes*, **1**(1): 70-72.
283. **Raffatellu, M., D. Chessa, R. Wilson, C. Tükel, M. Akçelik, et al.** 2006. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun*, **74**(1): 19-27.
284. **Raffatellu, M., M.D. George, Y. Akiyama, M.J. Hornsby, S.P. Nuccio, et al.** 2009. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe*, **5**(5): 476-86.
285. **Ramos, H.C., M. Rumbo and J.C. Sirard.** 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol*, **12**(11): 509-17.
286. **Rathman, M., L.P. Barker and S. Falkow.** 1997. The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect Immun*, **65**(4): 1475-85.
287. **Ratledge, C.** 2007. Iron metabolism and infection. *Food Nutr Bull*, **28**(4 Suppl): S515-23.
288. **Ratledge, C. and L.G. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **54**: 881-941.
289. **Raymond, K.N. and E.A. Dertz.** 2004. Biochemical and physical properties of siderophores, in *Iron transport in bacteria*. J.H. Crosa, A.R. Mey, and S.M. Payne, Editors. ASM Press: Washington. p. 3-17.
290. **Raymond, K.N., E.A. Dertz and S.S. Kim.** 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(7): 3584-8.
291. **Rebuffat, S.** 2012. Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem Soc Trans*, **40**(6): 1456-62.

292. **Reissbrodt, R., R. Kingsley, W. Rabsch, W. Beer, M. Roberts, et al.** 1997. Iron-regulated excretion of alpha-keto acids by *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, **179**(14): 4538-44.
293. **Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, et al.** 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, **2**(4): 361-7.
294. **Rhen, M. and C.J. Dorman.** 2005. Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieu. *Int J Med Microbiol*, **294**(8): 487-502.
295. **Richards, G.R. and C.K. Vanderpool.** 2011. Molecular call and response: the physiology of bacterial small RNAs. *Biochim Biophys Acta*, **1809**(10): 525-31.
296. **Riesenberg-Wilmes, M.R., B. Bearson, J.W. Foster and R. Curtis, 3rd.** 1996. Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, **64**(4): 1085-92.
297. **Robbe-Saule, V., C. Coynault, M. Ibanez-Ruiz, D. Hermant and F. Norel.** 2001. Identification of a non-haem catalase in *Salmonella* and its regulation by RpoS (sigmaS). *Mol Microbiol*, **39**(6): 1533-45.
298. **Rodriguez, G.M., M.I. Voskuil, B. Gold, G.K. Schoolnik and I. Smith.** 2002. *ideR*, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect Immun*, **70**(7): 3371-81.
299. **Runyen-Janecky, L.J., S.A. Reeves, E.G. Gonzales and S.M. Payne.** 2003. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infect Immun*, **71**(4): 1919-28.
300. **Rychlik, I. and P.A. Barrow.** 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol Rev*, **29**(5): 1021-40.
301. **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*, **305**(1): 1-13.
302. **Salvail, H., P. Lanthier-Bourbonnais, J.M. Sobota, M. Caza, J.A. Benjamin, et al.** 2010. A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(34): 15223-8.
303. **Salvail, H. and E. Masse.** 2012. Regulating iron storage and metabolism with RNA: an overview of posttranscriptional controls of intracellular iron homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **3**(1): 26-36.
304. **Sansonetti, P.J.** 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol*, **4**(12): 953-64.

305. **Santiviago, C., M. Reynolds, S. Porwollik, S. Choi, F. Long, et al.** 2009. Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice. *PLoS Pathog*, **5**(7): e1000477.
306. **Santos, R.L., M. Raffatellu, C.L. Bevins, L.G. Adams, C. Tukel, et al.** 2009. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol*, **17**(11): 498-506.
307. **Sauer, M., K. Hantke and V. Braun.** 1987. Ferric-coprogen receptor FhuE of *Escherichia coli*: processing and sequence common to all TonB-dependent outer membrane receptor proteins. *J Bacteriol*, **169**(5): 2044-9.
308. **Schaible, U.E. and S.H. Kaufmann.** 2004. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol*, **2**(12): 946-53.
309. **Schauer, K., D.A. Rodionov and H. de Reuse.** 2008. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends Biochem Sci*, **33**(7): 330-8.
310. **Schmitt, M.P., E.M. Twiddy and R.K. Holmes.** 1992. Purification and characterization of the diphtheria toxin repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(16): 7576-80.
311. **Schroder, I., E. Johnson and S. de Vries.** 2003. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev*, **27**(2-3): 427-47.
312. **Schwan, W., X. Huang, L. Hu and D. Kopecko.** 2000. Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun*, **68**: 1005-1013.
313. **Shea, C.M. and M.A. McIntosh.** 1991. Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system: homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **5**(6): 1415-28.
314. **Shea, J., M. Hensel, C. Gleeson and D. Holden.** 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(6): 2593-7.
315. **Shen, S. and F.C. Fang.** 2012. Integrated stress responses in *Salmonella*. *Int J Food Microbiol*, **152**(3): 75-81.
316. **Shi, H., J. Santander, K.E. Brenneman, S.Y. Wanda, S. Wang, et al.** 2010. Live recombinant *Salmonella* Typhi vaccines constructed to investigate the role of rpoS in eliciting immunity to a heterologous antigen. *PLoS One*, **5**(6): e11142.
317. **Shippy, D.C., N.M. Eakley, P.N. Bochsler, A.K. Chopra and A.A. Fadhil.** 2011. Biological and virulence characteristics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium following deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene. *Microb Pathog*, **50**(6): 303-13.
318. **Sinnott, C.R. and A.J. Teall.** 1987. Persistent gallbladder carriage of *Salmonella typhi*. *Lancet*, **1**(8539): 976.

319. **Skamene, E., E. Schurr and P. Gros.** 1998. Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med*, **49**: 275-87.
320. **Smith, J.L.** 2004. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit Rev Microbiol*, **30**(3): 173-85.
321. **Smith, K.D.** 2007. Iron metabolism at the host pathogen interface: lipocalin 2 and the pathogen-associated *iroA* gene cluster. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**(10): 1776-80.
322. **Sood, S., P. Rishi, V. Dhawan, S. Sharma and N.K. Ganguly.** 2005. Protection mediated by antibodies to iron-regulated outer-membrane proteins of *S. typhi* in a mouse peritonitis model. *Mol Cell Biochem*, **273**(1-2): 69-78.
323. **Sood, S., P. Rishi, H. Vohra, S. Sharma and N.K. Ganguly.** 2005. Cellular immune response induced by *Salmonella enterica* serotype Typhi iron-regulated outer-membrane proteins at peripheral and mucosal levels. *J Med Microbiol*, **54**(Pt 9): 815-21.
324. **Sorek, R., V. Kunin and P. Hugenholtz.** 2008. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol*, **6**(3): 181-6.
325. **Sprenkel, C., Z. Cao, Z. Qi, D.C. Scott, M.A. Montague, et al.** 2000. Binding of ferric enterobactin by the *Escherichia coli* periplasmic protein FepB. *J Bacteriol*, **182**(19): 5359-64.
326. **Steele-Mortimer, O.** 2008. The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol*, **11**(1): 38-45.
327. **Stephens, D.L., M.D. Choe and C.F. Earhart.** 1995. *Escherichia coli* periplasmic protein FepB binds ferrienterobactin. *Microbiology*, **141** ( Pt 7): 1647-54.
328. **Stojiljkovic, I., A.J. Baumler and K. Hantke.** 1994. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a *fur* titration assay. *J Mol Biol*, **236**(2): 531-45.
329. **Stojiljkovic, I. and K. Hantke.** 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet*, **247**(2): 199-205.
330. **Storz, G., J.A. Opdyke and A. Zhang.** 2004. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol*, **7**(2): 140-4.
331. **Su, L.H. and C.H. Chiu.** 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J*, **30**(3): 210-9.
332. **Suez, J., S. Porwollik, A. Dagan, A. Marzel, Y.I. Schorr, et al.** 2013. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PLoS One*, **8**(3): e58449.

333. **Tabak, M., K. Scher, M.L. Chikindas and S. Yaron.** 2009. The synergistic activity of triclosan and ciprofloxacin on biofilms of *Salmonella* Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett*, **301**(1): 69-76.
334. **Tanabe, T., T. Funahashi, H. Nakao, J. Maki and S. Yamamoto.** 2013. The *Vibrio parahaemolyticus* Small RNA RyhB Promotes Production of the Siderophore Vibrioferrin by Stabilizing the Polycistronic mRNA. *J Bacteriol*, **195**(16): 3692-703.
335. **Tang, Y. and J.R. Guest.** 1999. Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases. *Microbiology*, **145** (Pt 11): 3069-79.
336. **Taylor, C.M., D. Osman and J.S. Cavet.** 2009. Differential expression from two iron-responsive promoters in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals the presence of iron in macrophage-phagosomes. *Microb Pathog*, **46**(2): 114-8.
337. **Teixido, L., B. Carrasco, J.C. Alonso, J. Barbe and S. Campoy.** 2011. Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator *in vivo* and *in vitro*. *PLoS One*, **6**(5): e19711.
338. **Teixido, L., P. Cortes, A. Bigas, G. Alvarez, J. Barbe, et al.** 2010. Control by Fur of the nitrate respiration regulators NarP and NarL in *Salmonella enterica*. *Int Microbiol*, **13**(1): 33-9.
339. **Thiennimitr, P., S.E. Winter and A.J. Baumler.** 2012. *Salmonella*, the host and its microbiota. *Curr Opin Microbiol*, **15**(1): 108-14.
340. **Thomas, X., D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi, C. Afonso, A. Blond, et al.** 2004. Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J Biol Chem*, **279**(27): 28233-42.
341. **Thulasiraman, P., S.M. Newton, J. Xu, K.N. Raymond, C. Mai, et al.** 1998. Selectivity of ferric enterobactin binding and cooperativity of transport in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, **180**(24): 6689-96.
342. **Torres, A.G., G.N. Lopez-Sanchez, L. Milflores-Flores, S.D. Patel, M. Rojas-Lopez, et al.** 2007. Ler and H-NS, regulators controlling expression of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol*, **189**(16): 5916-28.
343. **Touati, D.** 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys*, **373**(1): 1-6.
344. **Touati, D., M. Jacques, B. Tardat, L. Bouchard and S. Despied.** 1995. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta *fur* mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol*, **177**(9): 2305-14.
345. **Townsend, S., N. Kramer, R. Edwards, S. Baker, N. Hamlin, et al.** 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun*, **69**(5): 2894-901.

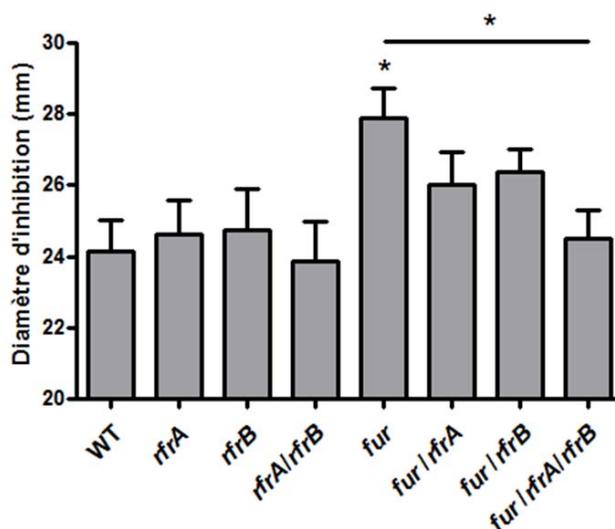
346. **Tran, Q.T., G. Gomez, S. Khare, S.D. Lawhon, M. Raffatellu, et al.** 2010. The *Salmonella enterica* serotype Typhi Vi capsular antigen is expressed after the bacterium enters the ileal mucosa. *Infect Immun*, **78**(1): 527-35.
347. **Troxell, B., R.C. Fink, S. Porwollik, M. McClelland and H.M. Hassan.** 2011. The Fur regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: identification of new Fur targets. *BMC Microbiol*, **11**: 236.
348. **Troxell, B., M.L. Sikes, R.C. Fink, A. Vazquez-Torres, J. Jones-Carson, et al.** 2011. Fur negatively regulates *hns* and is required for the expression of HilA and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, **193**(2): 497-505.
349. **Tsolis, R., A. Bäumlner, I. Stojiljkovic and F. Heffron.** 1995. Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J Bacteriol*, **177**(16): 4628-37.
350. **Tsolis, R.M., A.J. Baumler, F. Heffron and I. Stojiljkovic.** 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun*, **64**(11): 4549-56.
351. **Tsolis, R.M., M.N. Xavier, R.L. Santos and A.J. Baumler.** 2011. How to become a top model: impact of animal experimentation on human *Salmonella* disease research. *Infect Immun*, **79**(5): 1806-14.
352. **Uzzau, S., D.J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, et al.** 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect*, **125**(2): 229-55.
353. **van Vliet, A.H., K.G. Wooldridge and J.M. Ketley.** 1998. Iron-responsive gene regulation in a *Campylobacter jejuni fur* mutant. *J Bacteriol*, **180**(20): 5291-8.
354. **Vassiliadis, G., D. Destoumieux-Garzon, C. Lombard, S. Rebuffat and J. Peduzzi.** 2010. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**(1): 288-97.
355. **Vassinova, N. and D. Kozyrev.** 2000. A method for direct cloning of fur-regulated genes: identification of seven new fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology*, **146** (Pt 12): 3171-82.
356. **Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. Bäumlner, S. Falkow, R. Valdivia, et al.** 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, **401**(6755): 804-8.
357. **Vecerek, B., I. Moll and U. Blasi.** 2007. Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *Embo J*, **26**(4): 965-75.
358. **Velayudhan, J., M. Castor, A. Richardson, K.L. Main-Hester and F.C. Fang.** 2007. The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Mol Microbiol*, **63**(5): 1495-507.
359. **Virji, M.** 2009. Ins and Outs of Microbial Adhesion. *Top Curr Chem*, **288**: 139-56.

360. **Virlogeux, I., H. Waxin, C. Ecobichon, J.O. Lee and M.Y. Popoff.** 1996. Characterization of the *rcaA* and *rcaB* genes from *Salmonella typhi*: RcsB through TviA is involved in regulation of Vi antigen synthesis. *J Bacteriol*, **178**(6): 1691-8.
361. **Virlogeux, I., H. Waxin, C. Ecobichon and M.Y. Popoff.** 1995. Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology*, **141**(Pt 12): 3039-47.
362. **Vishwakarma, V., N.B. Pati, H.S. Chandel, S.S. Sahoo, B. Saha, et al.** 2012. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TTSS-2 deficient fur mutant as safe live-attenuated vaccine candidate for immunocompromised mice. *PLoS One*, **7**(12): e52043.
363. **Vogel, J.** 2009. A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol*, **71**(1): 1-11.
364. **Vogel, J. and B.F. Luisi.** 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol*, **9**(8): 578-89.
365. **Wangdi, T., S.E. Winter and A.J. Baumler.** 2012. Typhoid fever: "you can't hit what you can't see". *Gut Microbes*, **3**(2): 88-92.
366. **Wassarman, K.M.** 2007. 6S RNA: a regulator of transcription. *Mol Microbiol*, **65**(6): 1425-31.
367. **Wassarman, K.M.** 2007. 6S RNA: a small RNA regulator of transcription. *Curr Opin Microbiol*, **10**(2): 164-8.
368. **Wassarman, K.M., F. Repoila, C. Rosenow, G. Storz and S. Gottesman.** 2001. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev*, **15**(13): 1637-51.
369. **Waters, L.S. and G. Storz.** 2009. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, **136**(4): 615-28.
370. **Weiss, G.** 2009. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta*, **1790**(7): 682-93.
371. **White-Ziegler, C.A. and T.R. Davis.** 2009. Genome-wide identification of H-NS-controlled, temperature-regulated genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **191**(3): 1106-10.
372. **White-Ziegler, C.A., A. Villapakkam, K. Ronaszeki and S. Young.** 2000. H-NS controls *pap* and *daa* fimbrial transcription in *Escherichia coli* in response to multiple environmental cues. *J Bacteriol*, **182**(22): 6391-400.
373. **Wilderman, P.J., N.A. Sowa, D.J. FitzGerald, P.C. FitzGerald, S. Gottesman, et al.** 2004. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(26): 9792-7.
374. **Williams, P.H., W. Rabsch, U. Methner, W. Voigt, H. Tschape, et al.** 2006. Catechol receptor proteins in *Salmonella enterica*: role in virulence and implications for vaccine development. *Vaccine*, **24**(18): 3840-4.

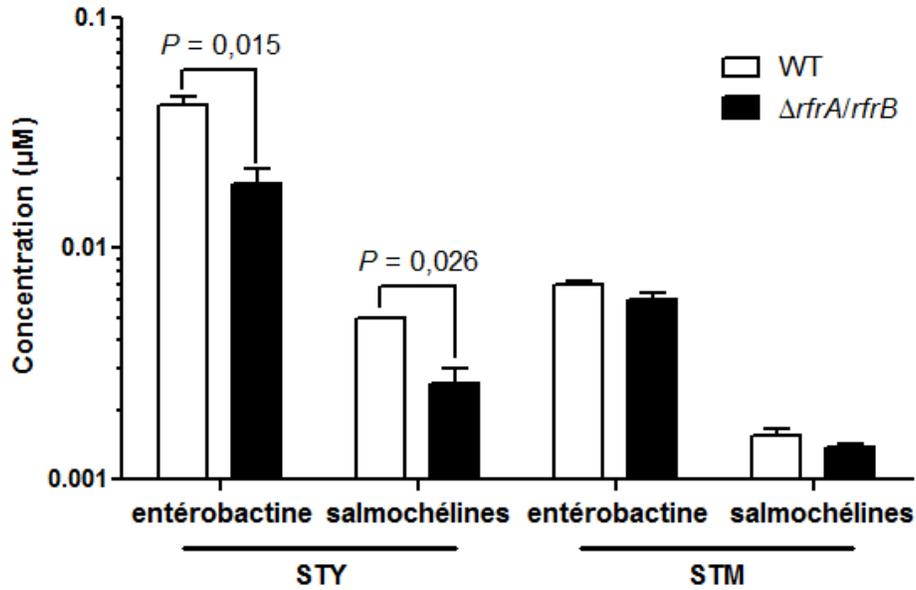
375. **Wilmes-Riesenberg, M.R., B. Bearson, J.W. Foster and R. Curtiss III.** 1996. The role of the acid tolerance response in the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, **64**: 1085-1092.
376. **Wilson, R.P., M. Raffatellu, D. Chessa, S.E. Winter, C. Tukel, et al.** 2008. The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cell Microbiol*, **10**(4): 876-90.
377. **Winter, S.E., M. Raffatellu, R.P. Wilson, H. Russmann and A.J. Baumler.** 2008. The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. *Cell Microbiol*, **10**(1): 247-61.
378. **Worsham, P.L. and J. Konisky.** 1984. Effect of growth temperature on the acquisition of iron by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **158**(1): 163-8.
379. **Wosten, M.M., L.F. Kox, S. Chamnongpol, F.C. Soncini and E.A. Groisman.** 2000. A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell*, **103**(1): 113-25.
380. **Wu, W.S., P.C. Hsieh, T.M. Huang, Y.F. Chang and C.F. Chang.** 2002. Cloning and characterization of an iron regulated locus, *iroA*, in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *DNA Seq*, **13**(6): 333-41.
381. **Xiong, K., Z. Chen, G. Xiang, J. Wang, X. Rao, et al.** 2012. Deletion of *yncD* gene in *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhi leads to attenuation in mouse model. *FEMS Microbiol Lett*, **328**(1): 70-7.
382. **Yancey, R.J., S.A. Breeding and C.E. Lankford.** 1979. Enterochelin (enterobactin): virulence factor for *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, **24**(1): 174-80.
383. **Yeo, W.S., J.H. Lee, K.C. Lee and J.H. Roe.** 2006. IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol Microbiol*, **61**(1): 206-18.
384. **Yoo, A.Y., S.W. Kim, J.E. Yu, Y.H. Kim, J. Cha, et al.** 2007. Requirement of Fur for the full induction of Dps expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Microbiol Biotechnol*, **17**(9): 1452-9.
385. **Zaharik, M.L., V.L. Cullen, A.M. Fung, S.J. Libby, S.L. Kujat Choy, et al.** 2004. The *Salmonella enterica* serovar typhimurium divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model. *Infect Immun*, **72**(9): 5522-5.
386. **Zaharik, M.L., B.A. Vallance, J.L. Puente, P. Gros and B.B. Finlay.** 2002. Host-pathogen interactions: Host resistance factor Nramp1 up-regulates the expression of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(24): 15705-10.

387. **Zaki, S.A. and S. Karande.** 2011. Multidrug-resistant typhoid fever: a review. *J Infect Dev Ctries*, **5**(5): 324-37.
388. **Zeth, K.** 2012. Dps biomineralizing proteins: multifunctional architects of nature. *Biochem J*, **445**(3): 297-311.
389. **Zhang-Barber, L., A.K. Turner and P.A. Barrow.** 1999. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine*, **17**(20-21): 2538-45.
390. **Zhao, G., P. Ceci, A. Ilari, L. Giangiacomo, T.M. Laue, et al.** 2002. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **277**(31): 27689-96.
391. **Zheng, M., B. Doan, T.D. Schneider and G. Storz.** 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol*, **181**(15): 4639-43.
392. **Zhou, D., W.D. Hardt and J.E. Galan.** 1999. *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun*, **67**(4): 1974-81.
393. **Zhu, M., M. Valdebenito, G. Winkelmann and K. Hantke.** 2005. Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology*, **151**(Pt 7): 2363-72.

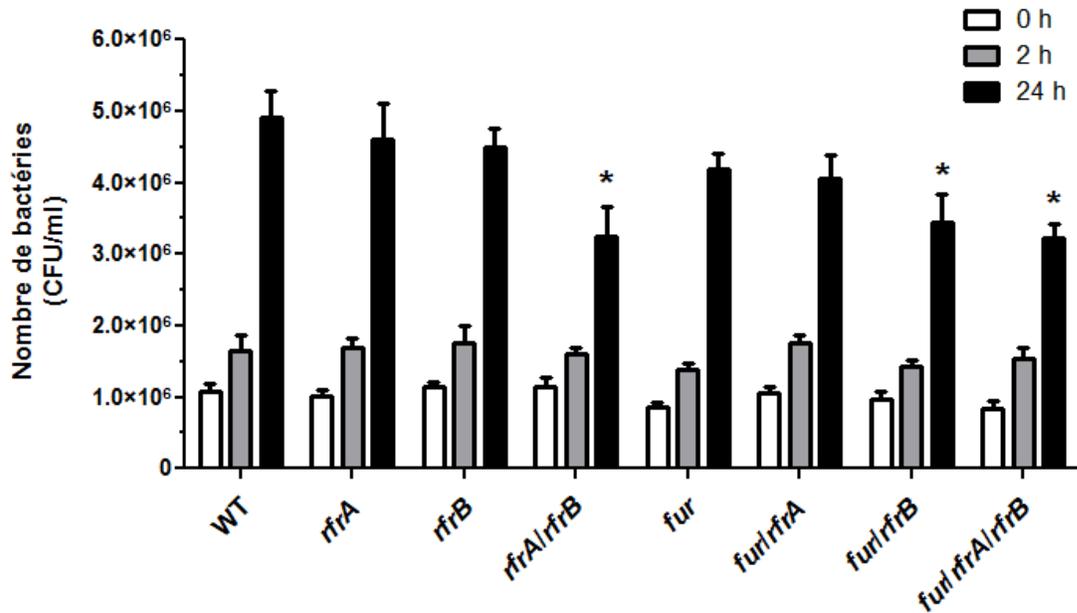
## ANNEXE I : Résultats supplémentaires



**Figure S1.** Sensibilité de *S. Typhimurium* au peroxyde d'hydrogène. La sensibilité au peroxyde d'hydrogène 30 % de la souche sauvage 14028 de *S. Typhimurium* et des mutants isogéniques a été déterminée par le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne sur géloses LB. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard de la moyenne) de quatre expériences. Les différences significatives ( $P < 0.05$ ) entre les mutants et la souche sauvage ou entre les différents mutants de *S. Typhimurium* sont indiquées par un astérisque.



**Figure S2.** Production de sidérophore par *S. Typhi* et *S. Typhimurium*. Les concentrations d'entérobactine et de salmochélines ont été mesurées dans les surnageants de cultures bactériennes de la souche sauvage et du mutant isogénique *rfrA/rfrB* de *S. Typhi* (STY) et *S. Typhimurium* (STM) cultivés en milieu RPMI contenant aucun fer. La quantité de sidérophore a été normalisée avec le standard interne 5,6,7,8-tetradeutero-3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard de la moyenne) de trois réplicats biologiques. Les différences significatives ( $P < 0.05$ ) entre les mutants *rfrA/rfrB* et les souches sauvages ont été déterminées par le test *t* bilatéral non-apparié.



**Figure S3.** Rôle des régulateurs Fur, RfrA et RfrB de *S. Typhimurium* pendant l'interaction avec les macrophages humains. Les macrophages THP-1 ont été infectés par la souche sauvage 14028 de *S. Typhimurium* et les différents mutants isogéniques. Le nombre de bactéries associées aux cellules a été déterminé après l'entrée (0 h) et durant la survie (2 h et 24 h) dans les macrophages. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard de la moyenne) de trois expériences réalisées en duplicata. Les différences significatives ( $P < 0.05$ ) entre les mutants et la souche sauvage de *S. Typhimurium* sont indiquées par un astérisque.

## **ANNEXE II : Article publié non discuté dans cette thèse**

Lors de cette thèse, j'ai eu l'occasion de participer à la rédaction d'une revue de littérature qui n'est pas discutée dans cette thèse. Cet article a pour sujet la comparaison génétique de *Salmonella enterica* sérovars Typhimurium et Typhi. Cet article a été soumis à un processus de révision par les pairs avant sa publication dans la revue «FEMS Microbiology Letters».

Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., **Leclerc, J. M.** 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., **305**:1-13.



understanding systemic infections by *S. enterica*. However, as each serovar causes a distinct type of disease in humans, conclusions regarding *S. Typhi* pathogenesis in humans must be interpreted carefully.

Many recent reviews have extensively covered the literature on the pathogenesis of *S. enterica* (Grassl & Finlay, 2008; Haraga *et al.*, 2008; Tsolis *et al.*, 2008; McGhie *et al.*, 2009). This review presents a comparative analysis of the major genetic differences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi* and how this may contribute to our understanding of typhoid pathogenesis.

## Genetic diversity

Organization of genomes allows us to gain a better understanding of the mechanisms by which species or serovars have evolved. Analysis of the chromosomal gene arrangement revealed that the genomic backbone of *S. Typhimurium* is very similar to the *Escherichia coli* genome. However, major differences in gene order have been observed in the *S. Typhi* chromosome. Differences in the *S. Typhi* genome occur mainly because of genomic rearrangements involving recombination between different rRNA operons (Liu & Sanderson, 1995; Liu & Sanderson, 1996) or IS200 elements (Alokam *et al.*, 2002). Each serovar evolves through the acquisition of genetic elements by horizontal gene transfer or by gene degradation. The genomes of *S. Typhimurium* strain LT2 and *S. Typhi* strain CT18 are composed of 4 857 432 and 4 809 037 bp, respectively (Fig. 2) (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001). Both serovars share about 89% of genes (McClelland *et al.*, 2001). Differences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi* include  $\approx$  480 genes unique

to *S. Typhimurium* and  $\approx$  600 genes unique to *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001). *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs), plasmids, functional prophages and phage remnants contribute significantly to the genetic diversity among *S. enterica* strains (Rotger & Casadesús, 1999; Boyd & Brüssow, 2002) and will be discussed below.

The low level of genetic variation observed in *S. Typhi* genomes of distinct isolates from around the world revealed a highly conserved and clonal relation, suggesting that they emerged from a single progenitor, making *S. Typhi* a monomorphic organism (Baker & Dougan, 2007; Holt *et al.*, 2008). Clonality is often encountered in human-restricted pathogens (Achtman, 2008). There is very little evidence of adaptive selection in *S. Typhi* genes, with the exception of a recent evolution in phenotypic traits that includes the acquisition of resistance to fluoroquinolones (Chau *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2007). Examination of DNA sequences and the rate of change of single-nucleotide polymorphisms suggest that *S. Typhi* may be only 50 000 years old, a short time frame for bacteria to accumulate diversity (Selander *et al.*, 1990; Kidgell *et al.*, 2002a,b; Roumagnac *et al.*, 2006). This situation strongly suggests that evolution in the *S. Typhi* strain population is mainly characterized by loss of gene function. *Salmonella enterica* serovar Typhi is an example of reductive evolution, where the adaptation to its human niche has led to the functional inactivation of genes, due to certain needs that have been satisfied by the host (Dagan *et al.*, 2006). Annotation of the first completed *S. Typhi* genome sequence revealed that > 200 genes have been disrupted or inactivated, representing approximately 5% of its genome (Parkhill *et al.*, 2001), a characteristic that was confirmed by the sequencing of other

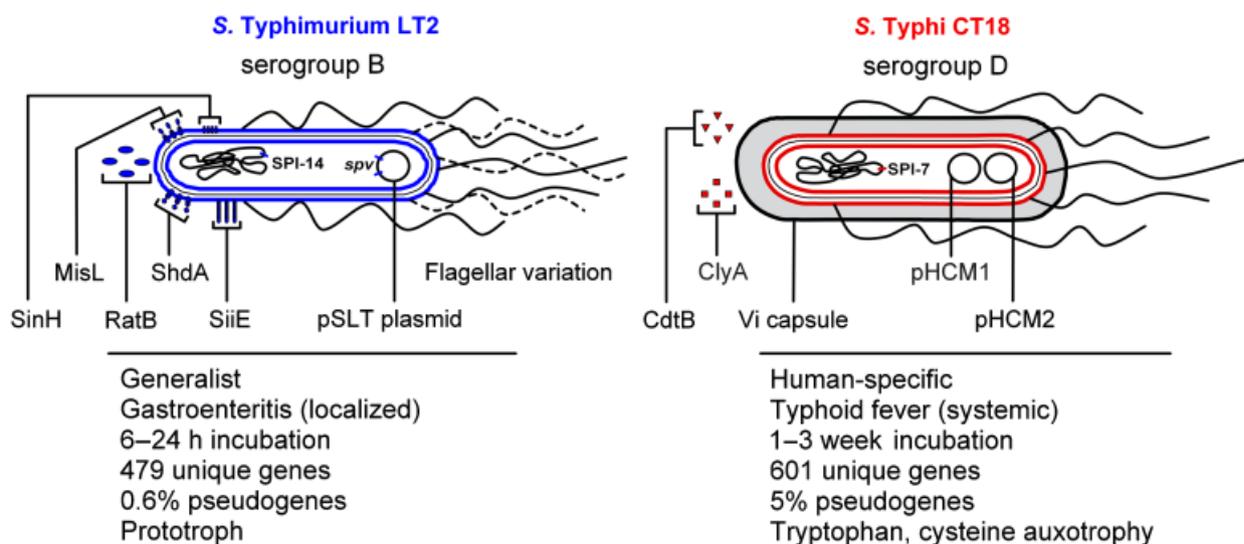
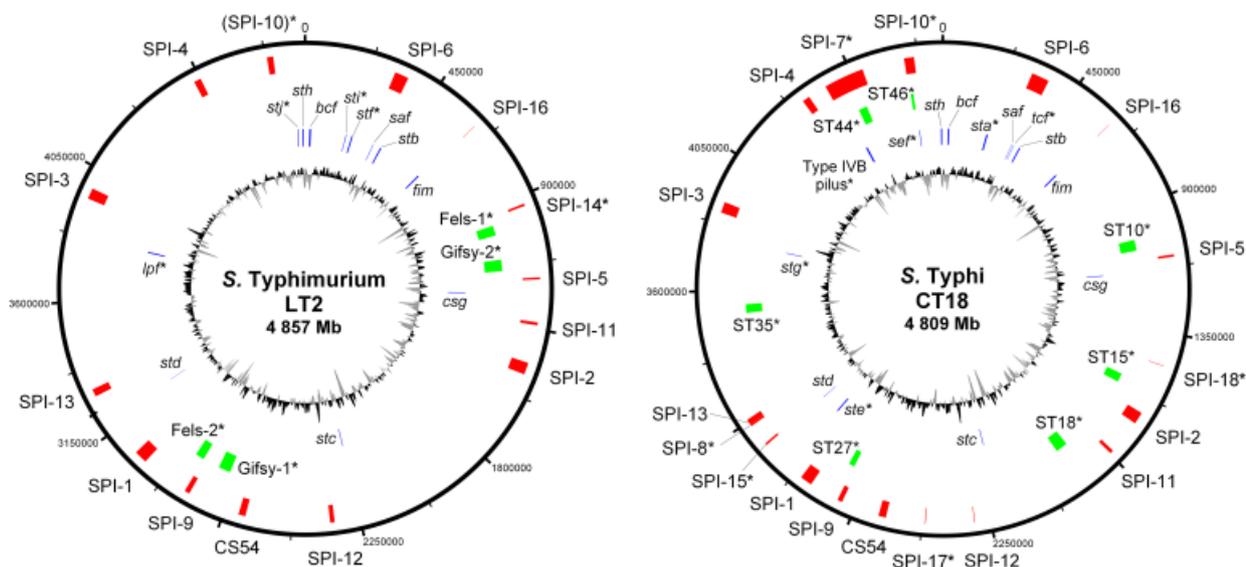


Fig. 1. Major features distinguishing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 from *S. Typhi* CT18.



**Fig. 2.** Circular representation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 and *S. Typhi* CT18 chromosomes. The circles indicate the localization of the pathogenicity islands (red), the prophages and prophage remnants (green) and fimbrial operons (blue). The inner circle indicates the G+C content (values above the average content are in black, and those below are in grey). Asterisks indicate elements specific to each serovar. The outer scale is marked in bases. The chromosomes were generated using DNAPLOTTER software (Carver *et al.*, 2009).

*S. Typhi* strains (Deng *et al.*, 2003; Holt *et al.*, 2009). We will point out the different pseudogenes in each of the following sections. Surprisingly, most of the pseudogenes in *S. Typhi* are intact and fully functional in *S. Typhimurium* (McClelland *et al.*, 2001) and could explain in part the loss of host range for serovar *S. Typhi*. Interestingly, many pseudogenes from *S. Typhi* are also conserved in Paratyphi A, a serovar that has the ability to cause enteric fever that afflicts only humans (McClelland *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2009).

### Plasmids

Most *S. Typhimurium* strains contain a self-transmissible virulence plasmid (pSLT) of about 90 kb harbouring virulence genes such as the *spv* operon, involved in intramacrophage survival, and the plasmid-encoded fimbriae (*pef*) fimbrial operon (Gulig & Doyle, 1993; Ahmer *et al.*, 1999; Rotger & Casadesús, 1999). When *S. Typhimurium* is cured of the plasmid, virulence in the mouse is decreased (Jones *et al.*, 1982) and can be complemented by the sole addition of the *spv* operon (Gulig *et al.*, 1992) encoding the SpvB toxin (Lesnick *et al.*, 2001). Additionally, *S. Typhimurium* can also carry multidrug-resistance plasmids of high molecular weight (up to 200 kb) and much smaller plasmids (< 20 kb) with unknown functions (Rychlik *et al.*, 2006). The pSLT virulence plasmid is absent in *S. Typhi* strains. In *S. Typhi*, *incHI* plasmids involved in multiple-drug resistance are commonly found (Maher & Taylor, 1993; Fica *et al.*, 1997; Wain *et al.*, 2003). *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CT18 harbours plasmid pHCM1, an *incHI1*

plasmid of about 218 kb with genes for resistance to antibiotics and heavy metals (Parkhill *et al.*, 2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi can also carry cryptic plasmids. *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CT18 harbours the cryptic plasmid pHCM2 of about 106 kb whose function is unknown, but it is rarely present in other strains (Parkhill *et al.*, 2001; Kidgell *et al.*, 2002a, b). Additionally, a 27-kb linear plasmid was recently isolated in *S. Typhi* strains originating from Indonesia. This plasmid carries the *fljB*<sup>z66</sup> gene, encoding a flagellin antigen known as H:z66 (Baker *et al.*, 2007b). However, no plasmid has been identified yet in *S. Typhi* that has been associated with virulence.

### Phages

Integrated bacteriophages represent major loci of genetic diversity in bacterial genomes (Brüssow *et al.*, 2004). *Salmonella* genomes contain several prophages or prophage remnants with similarity to the lambda, Mu, P2 and P4 families (Thomson *et al.*, 2004; Bossi & Figueroa-Bossi, 2005). The contribution of prophages to *S. enterica* virulence has been recognized only recently. Some prophages carry nonessential 'cargo' genes involved in fitness and/or virulence, including several type three secreted effectors (Ehrbar & Hardt, 2005). Each strain of *S. Typhimurium* seems to have a distinct set of prophage elements within its genome. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain LT2 harbours four prophages, including Gifsy-1, Gifsy-2, Fels-1 and Fels-2 (McClelland *et al.*, 2001; Brüssow *et al.*, 2004). Both the Gifsy-3 and the SopE prophages, found in *S. Typhimurium* strains 14028 and

SL1344, respectively, are absent in *S. Typhimurium* strain LT2 (Figuroa-Bossi *et al.*, 2001; Brüßow *et al.*, 2004; Thomson *et al.*, 2004). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains SL1344 and 14028 both contain Gifsy-1 and Gifsy-2, but not Fels-1 and Fels-2 (Figuroa-Bossi *et al.*, 2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi harbours seven distinct prophage-like elements, spanning > 180 kb, that are generally conserved between strains (Fig. 2) (Thomson *et al.*, 2004). The modular nature of prophage genomes makes a significant contribution to serovar variation and comprises most of the variation in gene content among strains of the same serovar (Boyd *et al.*, 2003; Vernikos *et al.*, 2007).

## SPIs

*Salmonella* has many virulence-associated genes found within clusters in its genome, which are known as SPIs (Mills *et al.*, 1995). Virulence factors encoded by SPI genes tamper with host cellular mechanisms and are thought to dictate the host specificity of the different *S. enterica* serovars (Eswarappa *et al.*, 2008). Many of the SPIs are found next to a tRNA gene (Supporting Information, Fig. S1) and their G+C content differs from the rest of the genome (Fig. 2). Hence, such genomic islands were most likely inserted into the DNA of *Salmonella* by horizontal transfer events, although this explanation remains uncertain (Amavisit *et al.*, 2003). Twenty-one SPIs are known to date in *Salmonella* (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001; Chiu *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2005; Vernikos & Parkhill, 2006; Fuentes *et al.*, 2008; Blondel *et al.*, 2009). The *S. Typhimurium* and *S. Typhi* genomes contain 11 common SPIs (SPIs-1 to 6, 9, 11, 12, 13 and 16) (Fig. 2). SPIs-8 and 10 were initially found in *S. Typhi*, and considered as absent in *S. Typhimurium*. However, at both locations in *S. Typhimurium*, there is a completely different set of genes. There is only one SPI specific to *S. Typhimurium*, SPI-14 (Shah *et al.*, 2005), and four SPIs are specific to *S. Typhi* (SPIs-7, 15, 17 and 18) (Fig. 2). SPIs-19, 20 and 21 are absent in both of these serovars and will not be discussed further (Blondel *et al.*, 2009). Even if many of these islands are found in both serovars, differences emerge when comparing equivalent SPIs. In the following section, the genomic differences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi* are described for each SPI using *S. Typhimurium* strain LT2 and *S. Typhi* strain CT18 as the genomic references. Amino acid alignments of SPIs between these strains were performed using the XBASE software (Chaudhuri & Pallen, 2006) and can be seen in Fig. S1.

*SPI-1* is a 40 kb locus located at centisome 63 encoding a type three secretion system (T3SS) (Mills *et al.*, 1995) and the *sit* metal transport system (Janakiraman & Slauch, 2000). The T3SS is involved in the invasion of nonphagocytic cells and proinflammatory responses (Galán & Curtiss, 1989; Mills *et al.*, 1995; Galán & Collmer, 1999). T3SS are used by the

bacteria to inject proteins, called effectors, directly inside the host cells that will act as mediators of cell invasion and modifications contributing to intracellular growth. Effectors can be encoded by genes located inside or outside SPI-1. Genomic comparison confirmed a high degree of identity between the two serovars and revealed the presence of four additional ORFs in *S. Typhimurium*, including the bacterial effector *avrA* (Hardt & Galán, 1997) and three distal ORFs (STM2901, STM2902 and STM2903) encoding putative cytoplasmic proteins (Fig. S1a) (Parkhill *et al.*, 2001). In *S. Typhi*, a partial insertion sequence and transposase are present at the end of the locus. Therefore, the major difference in SPI-1 between both serovars may be at the functional level, as some genes coding effectors located outside SPI-1 are missing (*sspH1*, *steB*) or are pseudogenes (*sopA*, *sopE2* and *slrP*) in *S. Typhi*. All known SPI-1 and SPI-2 effectors of the two serovars are listed in Table S1. Amino acid substitutions in the SipD translocon and the SptP effector were identified between these serovars and may reflect a potential functionality difference (Eswarappa *et al.*, 2008).

*SPI-2* is a 40 kb locus inserted next to the *valV* tRNA gene at centisome 30 and encodes a second T3SS, which is involved in intracellular survival (Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998). Using comparative genomics, no major differences in SPI-2 were observed between both serovars (Fig. S1b). Three ORFs (STY1735, STY1739 and STY1742) are pseudogenes in *S. Typhi*. These ORFs, however, are not part of the T3SS, but part of a tetrathionate reductase complex. As with SPI-1, some genes encoding effectors in *S. Typhimurium* that are located outside SPI-2 are missing (*sseI*, *sseK1*, *sseK2* and *sseK3*) or are pseudogenes (*sopD2*, *sseJ*) in *S. Typhi* (Table S1). Molecular differences were observed in translocon genes *sseC* and *sseD*, and effectors *sseF* and *sifA* (Eswarappa *et al.*, 2008), reflecting a probable difference in functionality between these serovars.

*SPI-3* is a 36 kb locus inserted next to the *selC* tRNA gene located at centisome 82, is involved in intracellular survival and encodes a magnesium transporter (Blanc-Potard & Groisman, 1997). SPI-3 shows extensive variations in its structure in various *S. enterica* serovars and can be divided into three regions (Fig. S1c) (Blanc-Potard *et al.*, 1999; Amavisit *et al.*, 2003). The region found next to the *selC* tRNA gene is where variations between *S. Typhimurium* and *S. Typhi* are the highest, including deletions and insertions. This region contains many pseudogenes in *S. Typhi*: STY4024 (*cigR*), STY4027 (*marT*), STY4030 (*misL*), STY4034, STY4035 and STY4037. A few more pseudogenes in *S. Typhi* are found in the second and third portions of SPI-3, including STY4012, STY4007 and STY4003 (Fig. S1c). In brief, the autotransporter MisL involved in intestinal colonization (Dorsey *et al.*, 2005), its regulator MarT (Tükel *et al.*, 2007) and an unknown putative transcriptional regulator (STY4012) are inactivated in *S. Typhi*.

*SPI-4* is a 24 kb fragment located next to a potential tRNA-like gene at centisome 92 (Fig. S1d) and involved in adhesion to epithelial cells (Wong *et al.*, 1998). *SPI-4* harbours the *siiABCDEF* gene cluster encoding a type one secretion system (T1SS) for SiiE, a giant nonfimbrial adhesin of 595 kDa (Morgan *et al.*, 2004; Gerlach *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2007). SiiE mediates a close interaction with microvilli found on the apical side of epithelial cells, thereby aiding efficient translocation of *SPI-1* effectors required for apical membrane ruffling (Gerlach *et al.*, 2008). SiiE is encoded by one ORF in *S. Typhimurium* (STM4261), but is segmented into two ORFs in *S. Typhi* (STY4458 and STY4459) because of a stop codon, also present in *S. Typhi* strain Ty2 (Fig. S1d) (Deng *et al.*, 2003). This suggests that *siiE* is a pseudogene in *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2004), which correlates with a loss of function for an adhesin that contributes to intestinal colonization by *S. Typhimurium* (Morgan *et al.*, 2007).

*SPI-5* is an island < 8 kb in size, inserted next to the *serT* tRNA gene at centisome 25, and is required for enteropathogenicity (Wood *et al.*, 1998). *SPI-5* encodes effectors of both *SPI-1* and *SPI-2*. No difference is observed between the two serovars, except that an additional ORF (STY1114) is predicted to encode a transposase in *S. Typhi* (Fig. S1e).

*SPI-6* is located next to the *aspV* tRNA gene at centisome 7 and is a 47 kb island in *S. Typhimurium* (Folkesson *et al.*, 1999; Folkesson *et al.*, 2002), whereas it is rather 59 kb in *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001). It was previously shown that the complete deletion of this island reduced the entry of *S. Typhimurium* in Hep2 cells (Folkesson *et al.*, 2002). Located on this island are a type six secretion system (T6SS), the *safABCD* fimbrial gene cluster and the invasin *pagN* (Lambert & Smith, 2008), all present in both serovars (Folkesson *et al.*, 1999; Townsend *et al.*, 2001; Porwollik & McClelland, 2003). A 10 kb fragment downstream of the *saf* operon is found only in *S. Typhi*, and includes probable transposase remnants (STY0343 and STY0344, both pseudogenes), the fimbrial operon *tcfABCD* and genes *tinR* (STY0349) and *tioA* (STY0350) (Fig. S1f) (Folkesson *et al.*, 1999; Townsend *et al.*, 2001; Porwollik & McClelland, 2003). The T6SS of *S. Typhi* contains two pseudogenes, *scil* (STY0298) and *scis* (STY0308), and some ORFs are missing or divergent, probably rendering its T6SS nonfunctional. Interestingly, *scis* was shown to limit the intracellular growth of *S. Typhimurium* in macrophages at a late stage of infection and to decrease virulence in mice (Parsons & Heffron, 2005).

*SPI-7* remains the largest island identified to date and is absent in *S. Typhimurium*, but present in *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001; Pickard *et al.*, 2003; Bueno *et al.*, 2004). In *S. Typhi*, it is 134 kb in size, corresponding to approximately 150 genes inserted between duplicated *pheU* tRNA sequences (Hansen-Wester & Hensel, 2002; Pickard *et al.*, 2003). This island contains the Vi capsule biosynthesis genes (Hashimoto *et al.*,

1993), whose production is associated with virulence (see section below), a type IVB pilus operon (Zhang *et al.*, 2000) and the *SopE* prophage (ST44) encoding the *SPI-1* effector *SopE* (Miroid *et al.*, 1999). *SopE* is also encoded in *S. Typhimurium*'s genome, but within the temperate *SopE* prophage (Hardt *et al.*, 1998) located at a different location (*sopE* is absent in most *S. Typhimurium* strains, including *S. Typhimurium* strain LT2, but present and located on a prophage in *S. Typhimurium* strains SL1344 and 14028) (Hardt *et al.*, 1998; Miroid *et al.*, 1999; Pelludat *et al.*, 2003). At the *SPI-7* location in *S. Typhimurium* LT2, we find a single complete *pheU* tRNA sequence and STM4320 (a putative *merR* family bacterial regulatory protein) (Fig. S1g).

*SPI-8* is an 8 kb DNA fragment found next to the *pheV* tRNA gene that is part of *SPI-13* and will be discussed in that section (Fig. S1l) (Parkhill *et al.*, 2001; Hensel, 2004).

*SPI-9* is a 16 kb locus present in both serovars (Fig. S1h). This island contains three genes encoding for a T1SS and one for a large protein, sharing an overall 40% nucleotide identity to *siiCDEF* genes from *SPI-4* (Morgan *et al.*, 2004, 2007). The large protein-coding ORF (STM2689) in *S. Typhimurium* strain LT2 was first suggested to be a pseudogene (McClelland *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2004). However, a subsequent study showed an undisrupted gene coding a putative 386 kDa product renamed BapA (Latasa *et al.*, 2005).

*SPI-10* is an island found next to the *leuX* tRNA gene at centisome 93. This locus is completely different in each serovar and has been termed *SPI-10* only in *S. Typhi*. In *S. Typhimurium*, it is substituted by a 20 kb uncharacterized island without any *SPI* annotation (Fig. S1i), comprising functionally unrelated genes that share little homology to sequences from the genomic databases (Edwards *et al.*, 2001; Bishop *et al.*, 2005). However, a possible relationship of these genes with DNA repair has been proposed (Porwollik & McClelland, 2003). Deletion of this island in *S. Typhimurium* strain 14028 caused attenuation of virulence in mice (Haneda *et al.*, 2009). In *S. Typhi*'s genome, this island corresponds to a 33 kb fragment (Parkhill *et al.*, 2001) carrying a full P4-related prophage, termed ST46 (Edwards *et al.*, 2001; Thomson *et al.*, 2004; Bishop *et al.*, 2005). ST46 harbours the *prpZ* cluster as cargo genes encoding eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases involved in *S. Typhi* survival in macrophages (Faucher *et al.*, 2008). There is also a complete, but inactivated *sefABCDR* (*S. Enteritidis* fimbriae) fimbrial operon (Fig. S1i). Many pseudogenes are found in *S. Typhi*: STY4835 (*IS1230*), STY4836 (*sefA*), STY4839 (*sefD*), STY4841 (*sefR*), STY4845 (a thiol:disulphide interchange protein) and STY4848 (putative transposase) (Fig. S1i). Interestingly, ORFs STY4842–4846 of *S. Typhi* are homologues to *S. Typhimurium* genes located on the virulence plasmid, including *srgA* (Rodríguez-Peña *et al.*, 1997). *srgA* encodes a functional disulphide oxidoreductase in *S. Typhimurium* and is a

pseudogene in *S. Typhi* (STY4845) (Bouwman *et al.*, 2003). It was shown that *SrgA* acts in concert with *DsbA*, another disulphide oxidoreductase, to target *SipA* (a SPI-2 effector), and that an *srgA dsbA* double mutant had a stronger attenuation than either single mutants, with a level of attenuation similar to a SPI-2 mutant (Miki *et al.*, 2004).

*SPI-11* was initially identified in the genome sequencing of serovar *Choleraesuis* as a 14 kb fragment inserted next to the Gifsy-1 prophage (Chiu *et al.*, 2005). This SPI is shorter in *S. Typhimurium* (6.7 kb) and in *S. Typhi* (10 kb) (Fig. S1j). *SPI-11* includes the *phoP*-activated genes *pagD* and *pagC* involved in intramacrophage survival (Miller *et al.*, 1989; Gunn *et al.*, 1995). The putative envelope lipoprotein *envF* is absent in *S. Typhi*, while six additional ORFs (STY1884–1891), including the typhoid toxin *cdtB*, are present in *S. Typhi* (Fig. S1j) (Spanò *et al.*, 2008).

*SPI-12*, located next to the *proL* tRNA gene at centisome 48, is 15.8 kb long in *S. Typhimurium* and 6.3 kb long in *S. Typhi* (Fig. S1k) (Hansen-Wester & Hensel, 2002). It contains the effector *SspH2* (Miao *et al.*, 1999). The additional 9.5 kb fragment in *S. Typhimurium* contains 11 ORFs, which include some putative and phage-associated genes as well as *oafA*, encoding a *Salmonella*-specific gene for O-antigen acetylase (Fig. S1k) (Slauch *et al.*, 1996; Hansen-Wester & Hensel, 2002). *SPI-12* was shown to be required for systemic infection of mice in *S. Typhimurium* strain 14028 (Haneda *et al.*, 2009). In *S. Typhi*, three ORFs are pseudogenes (STY2466a, STY2468 and STY2469), leaving only the *sspH2* gene as functional on this island.

*SPI-13* was initially identified in serovar *Gallinarum* (Shah *et al.*, 2005). This 25 kb gene cluster is found next to the *pheV* tRNA gene at centisome 67 in *S. Typhimurium* and in *S. Typhi*. However, an 8 kb portion is different in each serovar and corresponds to SPI-8 only in *S. Typhi* (Fig. S1l). In *S. Typhimurium*, this region contains the ORFs STM3117 to STM3123, a cluster unique to *S. Typhimurium*, coding genes for a putative lyase, hydrolase, oxidase, arylsulphatase and arylsulphatase regulator as well as two putative LysR family transcriptional regulators (Fig. S1l). In strain *S. Typhimurium* 14028, STM3117–STM3121 are novel virulence-associated genes, as they were shown to be involved in systemic infection of mice (Haneda *et al.*, 2009) and replication inside murine macrophages (Shi *et al.*, 2006). In *S. Typhi*, the virulence function of SPI-8 is unknown and it harbours two bacteriocin immunity proteins (STY3281 and STY3283) and four pseudogenes (Fig. S1l) (Parkhill *et al.*, 2001). The 17 kb conserved portion of SPI-13 has not been shown to contribute to virulence (Haneda *et al.*, 2009).

*SPI-14* corresponds to 9 kb present in *S. Typhimurium* at centisome 19 and is absent in *S. Typhi* (Shah *et al.*, 2005; Morgan, 2007). It harbours seven ORFs encoding putative cytoplasmic proteins (Fig. S1m). The function of genes on this island is unknown, but gene upregulation was observed

in macrophages infected by *S. Typhimurium* strain SL1344 (Eriksson *et al.*, 2003).

*SPI-15* is a 6.5 kb island of five ORFs encoding hypothetical proteins, is inserted near the *glyU* tRNA gene in *S. Typhi* and is absent in *S. Typhimurium* (Fig. S1n) (Vernikos & Parkhill, 2006). Different genes are found at the same location in *S. Typhi* strain Ty2 (Fig. S1n) (Vernikos & Parkhill, 2006). *SPI-15*, as well as *SPI-16* and *17*, were identified by bioinformatic work (Vernikos & Parkhill, 2006).

*SPI-16* is found in *S. Typhimurium* and *S. Typhi* as a 4.5 kb fragment inserted next to an *argU* tRNA site, and encodes five or seven ORFs, respectively, four of which are pseudogenes in *S. Typhi* (Fig. S1o). The three remaining ORFs show a high level of identity with P22 phage genes involved in seroconversion (Vernikos & Parkhill, 2006) and were suggested to mediate O-antigen glycosylation (Mavris *et al.*, 1997; Guan *et al.*, 1999) and cell surface variation (Allison & Verma, 2000; Bogomolnaya *et al.*, 2008). These ORFs (genes *yfdH*, *rfbI* and STM0557) were required for the intestinal persistence of *S. Typhimurium* in mice (Bogomolnaya *et al.*, 2008).

*SPI-17* is a 5 kb island encoding six ORFs inserted next to an *argW* tRNA site and is absent in *S. Typhimurium*, but present in *S. Typhi* (Fig. S1p) (Vernikos & Parkhill, 2006). Seroconversion genes homologous to P22 phage are present and showed high homology to genes of *SPI-16*, including a putative lipopolysaccharide modification acyltransferase. Most of these genes (four) are pseudogenes in *S. Typhi* (Fig. S1p).

*SPI-18* was recently identified in *S. Typhi* as a 2.3 kb fragment harbouring only two ORFs: STY1498 and STY1499 (Fig. S1q) (Fuentes *et al.*, 2008). *clyA* (STY1498), also known as *hlyE* or *sheA*, encodes a 34 kDa pore-forming secreted cytolysin found in *E. coli* and *S. enterica* serovars *Typhi* and *Paratyphi A* (del Castillo *et al.*, 1997; Green & Baldwin, 1997; Oscarsson *et al.*, 1999, 2002). *clyA* is important for invasion of human epithelial cells *in vitro*, with its heterologous expression in *S. Typhimurium* leading to colonization of deep organs in a murine model (Fuentes *et al.*, 2008). *taiA* (STY1499) is a secreted 27 kDa invasin that increases bacterial uptake by human macrophages (Faucher *et al.*, 2009). Both genes are part of a common operon and are controlled by the virulence-related regulator *PhoP* (Faucher *et al.*, 2009).

Other pathogenicity islands are found in the *S. Typhimurium* and *S. Typhi* genomes and have not been identified as SPIs, but encode genes responsible for virulence in the host, such as CS54. The CS54 island is a 25 kb region found between *xseA* and *yfgJ* at centisome 54 in *S. Typhimurium* (Kingsley *et al.*, 2003) and *S. Typhi* (Fig. S1r). Five genes are found within this island, which are *shdA*, *ratB*, *ratA*, *sinI* and *sinH* (*sivH*). In *S. Typhimurium*, *ShdA* was shown to be an outer membrane protein of the autotransporter family that binds fibronectin, *RatB* is a predicted secreted protein of unknown function and *SinH* is a putative outer membrane

protein (Kingsley & Bäumlér, 2002; Kingsley *et al.*, 2003; Abd El Ghany *et al.*, 2007). *shdA*, *ratB* and *sinH* (*sivH*) are all implicated in intestinal colonization of BALB/c mice by *S. Typhimurium*, but are all pseudogenes in *S. Typhi* (Kingsley *et al.*, 2003).

## Other virulence factors

### Fimbriae

Fimbriae or pili are proteinous structures found on bacteria that can mediate interaction with cells. Fimbriae are normally specific to a receptor and can be used at different critical times during the infection. Each serovar harbours a unique combination of fimbrial operons (Fig. 2). Whole-genome sequence analysis revealed eight putative fimbrial operons shared by both *S. Typhimurium* and *S. Typhi* [*bef*, *csf* (*agf*), *fim*, *saf*, *stb*, *stc*, *std*, *sth*] (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* possesses five unique fimbrial sequences known as *lpf*, *stf*, *pef*, *sti* and *stj* (McClelland *et al.*, 2001). These unique fimbriae were not involved in systemic colonization of the spleen, and *Lpf* was shown to be involved in intestinal colonization of mice (Weening *et al.*, 2005). A type IVB pilus located on SPI-7 is only found within the *S. Typhi* genome, along with five other unique fimbrial operons (*sef*, *sta*, *ste*, *stg* and *tcf*) (Parkhill *et al.*, 2001). For the majority of these fimbriae, little is known about their true function, expression conditions or their importance for virulence during infection. Type IV pili are used by *Typhi* for adhesion to human monocytes and epithelial cells by interaction with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator receptor (Pier *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Tsui *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2005). *Tcf* was recognized by human sera from patients with typhoid (Harris *et al.*, 2006) and *Stg* mediates adherence to epithelial cells and reduces phagocytosis (Forest *et al.*, 2007). All fimbrial operons are intact in *S. Typhimurium* strain LT2, although pseudogenes are found within six fimbrial operons of *S. Typhi* strain CT18 (*fimI*, *safE*, *sefA*, *sefD*, *befC*, *steA*, *stgC*, *sthE*) (Townsend *et al.*, 2001) (<http://www.pseudogene.org/cgi-bin/db-gen.cgi?type=Prokaryote>). The unique repertoire of fimbrial adhesion systems may explain in part some differences observed between the host tropism colonization niches of these two serovars.

### Flagella

In *Salmonella*, the major subunit of flagella is usually encoded by *fliC* or *fljB*, which correspond to the H1 and H2 variants of the H antigen, respectively (Silverman & Simon, 1980). Only one type of flagellin can be expressed at a specific time by a mechanism known as phase variation (Lederberg & Iino, 1956; Simon *et al.*, 1980). This antigenic

variation can be observed in *S. Typhimurium*, but most *S. Typhi* strains are considered monophasic, as they lack a corresponding *fljB* locus (Frankel *et al.*, 1989). However, some *S. Typhi* isolates from Indonesia contain a linear plasmid encoding a novel flagellin, *fljB*<sup>z66</sup>, but reversion to *fliC* is considered irreversible due to a deletion (Baker *et al.*, 2007a). *fliB*, involved in methylation of the flagellin in *S. Typhimurium*, is a pseudogene in *S. Typhi* (Parkhill *et al.*, 2001).

### Vi antigen

The Vi antigen is a polysaccharidic capsule absent in *S. Typhimurium* and present in *S. Typhi*. Vi is important for virulence and is controlled by two loci: *viaA* and *viaB* (Kolyva *et al.*, 1992). The *viaB* locus located on SPI-7 is composed of two operons: *tviABCDE* and *vexABCDE*. The Vi capsule causes several differences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi* at the level of the host's response to infection. The Vi capsule is associated with inhibition of complement activation, resistance to serum and to phagocytosis and is involved in survival inside phagocytes (Looney & Steigbigel, 1986; Hirose *et al.*, 1997; Miyake *et al.*, 1998). The *viaB* locus lowers the invasiveness of the bacteria towards epithelial cells, as *viaB* mutants are superinvasive (Arricau *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001), and *S. Typhimurium* harbouring the *viaB* locus is less invasive (Haneda *et al.*, 2009). *TviA* avoids interleukin-8 production in the intestinal mucosa by repressing flagellin secretion, which reduces the recognition and activation of Toll-like receptor (TLR)-5 (Raffatellu *et al.*, 2005; Winter *et al.*, 2008). Vi also prevents the recognition of lipopolysaccharide by TLR-4 and reduces inflammation in the intestinal mucosa (Sharma & Qadri, 2004; Wilson *et al.*, 2008). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* sets off an immune response, which causes inflammation characterized by an important neutrophil influx that may be the result of its lack of capsule. Thus, Vi allows *S. Typhi* to disseminate systemically in its human host by crossing intestinal cells without activating the immune response, promotes resistance to killing by serum and contributes to survival inside phagocytes (Raffatellu *et al.*, 2006). Vi is a protective antigen and the actual constituent of the parenteral typhoid fever vaccine.

## Conclusions

Acquisition and loss of genetic material play an important role in bacterial evolution. Here, we have described the major genetic differences between *S. Typhimurium* and *S. Typhi*, two important *S. enterica* serovars associated with distinct diseases in humans (Fig. 1). Gene degradation in *S. Typhi* may be responsible for its human host restriction, but factors contributing to its systemic dispersion and survival during typhoid may be multiple and scattered, which

complicates the identification of genomic regions that reflect differences in habitat and lifestyle.

Each serovar is distinguished by its own repertoire of virulence factors, whether surface expressed or secreted, that leads to specific diseases or hosts. The bacterial cell surface is different between the two serovars, as represented by various O:H:K antigens. Lipopolysaccharide differences (O antigen) allowed the classification of *S. Typhimurium* in serogroup B, while *S. Typhi* belongs to serogroup D. Only *S. Typhimurium* is capable of phase variation of its H antigen, by differential expression of two flagella subunits. The most important feature is undoubtedly the presence of a polysaccharidic capsule (K antigen) specific to *S. Typhi*, the Vi antigen. However, it is also interesting to note that some *S. Typhi* strains and *S. Paratyphi A* lack the Vi antigen, but both cause a disease very similar to *S. Typhi* in the human host (McClelland *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2005).

Virulence factors can be secreted using the general secretion machinery of the bacteria or by specific systems, such as the T3SS used to inject proteins directly into the host. No major differences were observed in both T3SS (Fig. S1a,b), but some of the effectors were missing in *S. Typhi* (Table S1). However, the T6SS included on SPI-6 is probably inactivated in *S. Typhi* by the presence of pseudogenes. Some toxins were specific to *S. Typhimurium*, such as SpvB present on the virulence plasmid. On the other hand, the CdtB and ClyA toxins are only produced by *S. Typhi*.

Interestingly, most of the genes involved in intestinal colonization identified in *S. Typhimurium* are inactivated in *S. Typhi*. These genes encode autotransporters MisL and ShdA, adhesin SiiE, secreted protein RatB, putative outer membrane protein SinH and Lpf fimbriae (Fig. 1), suggesting that they are not needed by *S. Typhi* in the human host. This particular divergence is further acknowledged when looking at some work involving vaccine development (DiPetrillo *et al.*, 1999; Angelakopoulos & Hohmann, 2000; Hindle *et al.*, 2002). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *S. Typhi* live-attenuated vaccine strains, both modified with the same genetic deletions, did not show the same level of intestinal colonization when administered orally to human volunteers. Prolonged bacterial shedding by the host was observed over time with *S. Typhimurium*, but not with *S. Typhi*. Thus, precautions must be taken when extrapolating the *S. Typhimurium* data to *S. Typhi*. Many clinical trials investigating novel *S. Typhi* vaccine strains harbouring mutations that render *S. Typhimurium* avirulent and immunogenic in mice led to disappointing results at the attenuation level when administered to humans (Hone *et al.*, 1988; Tacket *et al.*, 1992a, b).

The completion of additional genome sequencing projects of other *Salmonella* serovars or strains will contribute considerably to our understanding of niche adaptation and bacterial evolution in general, as well as conceiving the

molecular basis of epidemics and how new virulent strains emerge. However, the availability of whole-genome sequences of several strains of different *S. enterica* serovars has not revealed any explanation that correlates with their specific niches and fitness, which suggests that the answer is probably already under our noses . . .

## Acknowledgements

The authors would like to thank Charles M. Dozois and Frédéric Douesnard-Malo for critical comments concerning this manuscript. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) grant number 251114-06. S.C.S. was supported by a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). C.G.F. and J.M.L. were supported by scholarships from NSERC. C.G.F. was also supported by a scholarship from the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP).

## References

- Abd El Ghany M, Jansen A, Clare S, Hall L, Pickard D, Kingsley R & Dougan G (2007) Candidate live, attenuated *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* vaccines with reduced fecal shedding are immunogenic and effective oral vaccines. *Infect Immun* **75**: 1835–1842.
- Achtman M (2008) Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens (review). *Annu Rev Microbiol* **62**: 53–70.
- Ahmer B, Tran M & Heffron F (1999) The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol* **181**: 1364–1368.
- Allison G & Verma N (2000) Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends Microbiol* **8**: 17–23.
- Alokam S, Liu S, Said K & Sanderson K (2002) Inversions over the terminus region in *Salmonella* and *Escherichia coli*: IS200s as the sites of homologous recombination inverting the chromosome of *Salmonella enterica* serovar *typhi*. *J Bacteriol* **184**: 6190–6197.
- Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF & Markham PF (2003) Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J Bacteriol* **185**: 3624–3635.
- Angelakopoulos H & Hohmann E (2000) Pilot study of phoP/phoQ-deleted *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Infect Immun* **68**: 2135–2141.
- Arricau N, Hermant D, Waxin H, Ecobichon C, Duffey P & Popoff M (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.

- Baker S & Dougan G (2007) The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin Infect Dis* **45** (suppl 1): S29–S33.
- Baker S, Sarwar Y, Aziz H, Haque A, Ali A, Dougan G, Wain J & Haque A (2005) Detection of Vi-negative *Salmonella enterica* serovar typhi in the peripheral blood of patients with typhoid fever in the Faisalabad region of Pakistan. *J Clin Microbiol* **43**: 4418–4425.
- Baker S, Hardy J, Sanderson KE, Quail M, Goodhead I, Kingsley RA, Parkhill J, Stocker B & Dougan G (2007a) A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella* Typhi. *PLoS Pathog* **3**: e59.
- Baker S, Holt K, Whitehead S *et al.* (2007b) A linear plasmid truncation induces unidirectional flagellar phase change in H:z66 positive *Salmonella* Typhi. *Mol Microbiol* **66**: 1207–1218.
- Bishop A, Baker S, Jenks S *et al.* (2005) Analysis of the hypervariable region of the *Salmonella enterica* genome associated with tRNA(leuX). *J Bacteriol* **187**: 2469–2482.
- Blanc-Potard A & Groisman E (1997) The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* **16**: 5376–5385.
- Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J & Groisman EA (1999) The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **181**: 998–1004.
- Blondel C, Jimenez J, Contreras I & Santiviago C (2009) Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics* **10**: 354.
- Bogomolnaya L, Santiviago C, Yang H, Baumler A & Andrews-Polymenis H (2008) ‘Form variation’ of the O12 antigen is critical for persistence of *Salmonella* Typhimurium in the murine intestine. *Mol Microbiol* **70**: 1105–1119.
- Bossi L & Figueroa-Bossi N (2005) Prophage arsenal of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology* (Waldor M, Friedman DI & Adhya SL, eds), pp. 165–186. ASM Press, Washington DC.
- Bouwman C, Kohli M, Killoran A, Touchie G, Kadner R & Martin N (2003) Characterization of SrgA, a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid-encoded paralogue of the disulfide oxidoreductase DsbA, essential for biogenesis of plasmid-encoded fimbriae. *J Bacteriol* **185**: 991–1000.
- Boyd E & Brüssow H (2002) Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol* **10**: 521–529.
- Boyd E, Porwollik S, Blackmer F & McClelland M (2003) Differences in gene content among *Salmonella enterica* serovar typhi isolates. *J Clin Microbiol* **41**: 3823–3828.
- Brüssow H, Canchaya C & Hardt W (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol R* **68**: 560–602.
- Bueno SM, Santiviago CA, Murillo AA *et al.* (2004) Precise excision of the large pathogenicity island, SPI7, in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* **186**: 3202–3213.
- Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M & Parkhill J (2009) DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* **25**: 119–120.
- Chau T, Campbell J, Galindo C *et al.* (2007) Antimicrobial drug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhi in asia and molecular mechanism of reduced susceptibility to the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Ch* **51**: 4315–4323.
- Chaudhuri R & Pallen M (2006) xBASE, a collection of online databases for bacterial comparative genomics. *Nucleic Acids Res* **34**: D335–D337.
- Chiu C, Tang P, Chu C *et al.* (2005) The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res* **33**: 1690–1698.
- Dagan T, Blekhman R & Graur D (2006) The ‘domino theory’ of gene death: gradual and mass gene extinction events in three lineages of obligate symbiotic bacterial pathogens. *Mol Biol Evol* **23**: 310–316.
- del Castillo F, Leal S, Moreno F & del Castillo I (1997) The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol Microbiol* **25**: 107–115.
- Deng W, Liou SR, Plunkett G III *et al.* (2003) Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol* **185**: 2330–2337.
- DiPetrillo M, Tibbetts T, Kleanthous H, Killeen K & Hohmann E (1999) Safety and immunogenicity of *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Vaccine* **18**: 449–459.
- Doolittle R, Feng D, Tsang S, Cho G & Little E (1996) Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science* **271**: 470–477.
- Dorsey C, Laarakker M, Humphries A, Weening E & Bäuml A (2005) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* **57**: 196–211.
- Edwards R, Matlock B, Heffernan B & Maloy S (2001) Genomic analysis and growth-phase-dependent regulation of the SEF14 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Microbiology* **147**: 2705–2715.
- Ehrbar K & Hardt W (2005) Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect Genet Evol* **5**: 1–9.
- Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M & Hinton JC (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**: 103–118.
- Eswarappa S, Janice J, Nagarajan A, Balasundaram S, Karnam G, Dixit N & Chakravorty D (2008) Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*. *PLoS ONE* **3**: e3829.
- Faucher S, Forest C, Béland M & Daigle F (2009) A novel PhoP-regulated locus encoding the cytolysin ClyA and the secreted invasin TaiA of *Salmonella enterica* serovar Typhi is involved in virulence. *Microbiology* **155**: 477–488.

- Faucher SP, Viau C, Gros PP, Daigle F & Le Moual H (2008) The *prpZ* gene cluster encoding eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases is repressed by oxidative stress and involved in *Salmonella enterica* serovar Typhi survival in human macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **281**: 160–166.
- Fica A, Fernandez-Beros ME, Aron-Hott L, Rivas A, D'Ottone K, Chumpitaz J, Guevara JM, Rodriguez M & Cabello F (1997) Antibiotic-resistant *Salmonella typhi* from two outbreaks: few ribotypes and IS200 types harbor Inc HI1 plasmids. *Microb Drug Resist* **3**: 339–343.
- Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Malorli D & Bossi L (2001) Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* **39**: 260–271.
- Folkesson A, Advani A, Sukupolvi S, Pfeifer J, Normark S & Löfdahl S (1999) Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. *Mol Microbiol* **33**: 612–622.
- Folkesson A, Löfdahl S & Normark S (2002) The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol* **153**: 537–545.
- Forest C, Faucher SP, Poirier K, Houle S, Dozois CM & Daigle F (2007) Contribution of the *stg* fimbrial operon of *Salmonella enterica* serovar Typhi during interaction with human cells. *Infect Immun* **75**: 5264–5271.
- Frankel G, Newton S, Schoolnik G & Stocker B (1989) Unique sequences in region VI of the flagellin gene of *Salmonella typhi*. *Mol Microbiol* **3**: 1379–1383.
- Fuentes J, Villagra N, Castillo-Ruiz M & Mora G (2008) The *Salmonella* Typhi *hlyE* gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to *S. Typhimurium* promotes deep organ infection in mice. *Res Microbiol* **159**: 279–287.
- Galán J & Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322–1328.
- Galán J & Curtiss R III (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *P Natl Acad Sci USA* **86**: 6383–6387.
- Gerlach R, Cláudio N, Rohde M, Jäckel D, Wagner C & Hensel M (2008) Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol* **10**: 2364–2376.
- Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, Hardt WD & Hensel M (2007) *Salmonella* pathogenicity island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* **9**: 1834–1850.
- Grassl G & Finlay B (2008) Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Curr Opin Gastroen* **24**: 22–26.
- Green J & Baldwin M (1997) The molecular basis for the differential regulation of the *hlyE*-encoded haemolysin of *Escherichia coli* by FNR and HlyX lies in the improved activating region 1 contact of HlyX. *Microbiology* **143**: 3785–3793.
- Guan S, Bastin D & Verma N (1999) Functional analysis of the O antigen glucosylation gene cluster of *Shigella flexneri* bacteriophage SfX. *Microbiology* **145**: 1263–1273.
- Gulig P, Caldwell A & Chiodo V (1992) Identification, genetic analysis and DNA sequence of a 7.8-kb virulence region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *Mol Microbiol* **6**: 1395–1411.
- Gulig PA & Doyle TJ (1993) The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun* **61**: 504–511.
- Gunn J, Alpuche-Aranda C, Loomis W, Belden W & Miller S (1995) Characterization of the *Salmonella typhimurium* *pagC/pagD* chromosomal region. *J Bacteriol* **177**: 5040–5047.
- Haneda T, Ishii Y, Danbara H & Okada N (2009) Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol Lett* **297**: 241–249.
- Hansen-Wester I & Hensel M (2002) Genome-based identification of chromosomal regions specific for *Salmonella* spp. *Infect Immun* **70**: 2351–2360.
- Haraga A, Ohlson M & Miller S (2008) Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**: 53–66.
- Hardt W & Galán J (1997) A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. *P Natl Acad Sci USA* **94**: 9887–9892.
- Hardt W, Urlaub H & Galán J (1998) A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage. *P Natl Acad Sci USA* **95**: 2574–2579.
- Harris JB, Baresch-Bernal A, Rollins SM et al. (2006) Identification of *in vivo*-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect Immun* **74**: 5161–5168.
- Hashimoto Y, Li N, Yokoyama H & Ezaki T (1993) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of ViB region encoding Vi antigen in *Salmonella typhi*. *J Bacteriol* **175**: 4456–4465.
- Hensel M (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **294**: 95–102.
- Hensel M, Shea J, Waterman S et al. (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* **30**: 163–174.
- Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J et al. (2002) Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. *Infect Immun* **70**: 3457–3467.
- Hirose K, Ezaki T, Miyake M et al. (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.
- Holt K, Parkhill J, Mazzoni C *et al.* (2008) High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. *Nat Genet* **40**: 987–993.
- Holt K, Thomson N, Wain J *et al.* (2009) Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* **10**: 36.
- Hone D, Attridge S, Forrest B *et al.* (1988) A *galeE* via (Vi antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. *Infect Immun* **56**: 1326–1333.
- Janakiraman A & Slauch JM (2000) The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **35**: 1146–1155.
- Jones G, Rabert D, Svinarich D & Whitfield H (1982) Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella typhimurium* with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect Immun* **38**: 476–486.
- Kidgell C, Pickard D, Wain J *et al.* (2002a) Characterisation and distribution of a cryptic *Salmonella typhi* plasmid pHCM2. *Plasmid* **47**: 159–171.
- Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G & Achtman M (2002b) *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect Genet Evol* **2**: 39–45.
- Kingsley R & Bäumlner A (2002) Pathogenicity islands and host adaptation of *Salmonella* serovars. *Curr Top Microbiol* **264**: 67–87.
- Kingsley R, Humphries A, Weening E *et al.* (2003) Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun* **71**: 629–640.
- Kolyva S, Waxin H & Popoff M (1992) The Vi antigen of *Salmonella typhi*: molecular analysis of the *viaB* locus. *J Gen Microbiol* **138**: 297–304.
- Lambert M & Smith S (2008) The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol* **8**: 142.
- Lataca C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo J, Gamazo C, Penadés J & Lasa I (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* **58**: 1322–1339.
- Lederberg J & Iino T (1956) Phase variation in *Salmonella*. *Genetics* **41**: 743–757.
- Le Minor L, Popoff M, Laurent B & Hermant D (1987) Characterization of a 7th subspecies of *Salmonella*: *S. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. nov. *Ann Inst Pasteur Mic* **137B**: 211–217.
- Le T, Fabre L, Roumagnac P, Grimont P, Scavizzi M & Weill F (2007) Clonal expansion and microevolution of quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhi* in Vietnam from 1996 to 2004. *J Clin Microbiol* **45**: 3485–3492.
- Lesnick M, Reiner N, Fierer J & Guiney D (2001) The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **39**: 1464–1470.
- Liu S & Sanderson K (1996) Highly plastic chromosomal organization in *Salmonella typhi*. *P Natl Acad Sci USA* **93**: 10303–10308.
- Liu S-L & Sanderson KE (1995) Rearrangements in the genome of the bacterium *Salmonella typhi*. *P Natl Acad Sci USA* **92**: 1018–1022.
- Looney RJ & Steigbigel RT (1986) Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense *in vitro*. *J Lab Clin Med* **108**: 506–516.
- Maher D & Taylor DE (1993) Host range and transfer efficiency of incompatibility group HI plasmids. *Can J Microbiol* **39**: 581–587.
- Mavris M, Manning P & Morona R (1997) Mechanism of bacteriophage SfiI-mediated serotype conversion in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **26**: 939–950.
- McClelland M, Sanderson K, Spieth J *et al.* (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**: 852–856.
- McClelland M, Sanderson K, Clifton S *et al.* (2004) Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat Genet* **36**: 1268–1274.
- McGhie E, Brawn L, Hume P, Humphreys D & Koronakis V (2009) *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* **12**: 117–124.
- Miao E, Scherer C, Tsois R, Kingsley R, Adams L, Bäumlner A & Miller S (1999) *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* **34**: 850–864.
- Miki T, Okada N & Danbara H (2004) Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *J Biol Chem* **279**: 34631–34642.
- Miller SI, Kukral AM & Mekalanos JJ (1989) A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *P Natl Acad Sci USA* **86**: 5054–5058.
- Mills D, Bajaj V & Lee C (1995) A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* **15**: 749–759.
- Mirold S, Rabsch W, Rohde M *et al.* (1999) Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain. *P Natl Acad Sci USA* **96**: 9845–9850.
- Miyake M, Zhao L, Ezaki T *et al.* (1998) Vi-deficient and nonfimbriated mutants of *Salmonella typhi* agglutinate human blood type antigens and are hyperinvasive. *FEMS Microbiol Lett* **161**: 75–82.
- Monack DM, Bouley DM & Falkow S (2004) *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1* *+/+* mice and

- can be reactivated by IFN $\gamma$  neutralization. *J Exp Med* **199**: 231–241.
- Morgan E (2007) *Salmonella* pathogenicity islands. *Salmonella Molecular Biology and Pathogenesis* (Rhen M, Maskell D, Mastroeni P & Threlfall J, eds), pp. 67–88. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Morgan E, Campbell JD, Rowe SC *et al.* (2004) Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **54**: 994–1010.
- Morgan E, Bowen A, Carnell S, Wallis T & Stevens M (2007) SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infect Immun* **75**: 1524–1533.
- Oscarsson J, Mizunoe Y, Li L, Lai XH, Wieslander A & Uhlin BE (1999) Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **32**: 1226–1238.
- Oscarsson J, Westermarck M, Lofdahl S *et al.* (2002) Characterization of a pore-forming cytotoxin expressed by *Salmonella enterica* serovars typhi and paratyphi A. *Infect Immun* **70**: 5759–5769.
- Pan Q, Zhang XL, Wu HY *et al.* (2005) Aptamers that preferentially bind type IVB pili and inhibit human monocytic-cell invasion by *Salmonella enterica* serovar typhi. *Antimicrob Agents Ch* **49**: 4052–4060.
- Parkhill J, Dougan G, James K *et al.* (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**: 848–852.
- Parsons DA & Heffron F (2005) *scsI*, an *icmF* homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun* **73**: 4338–4345.
- Pelludat C, Mirol S & Hardt W (2003) The SopEPhi phage integrates into the *ssrA* gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium A36 and is closely related to the Fels-2 prophage. *J Bacteriol* **185**: 5182–5191.
- Pickard D, Wain J, Baker S *et al.* (2003) Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol* **185**: 5055–5065.
- Pier G, Grout M, Zaidi T *et al.* (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* **393**: 79–82.
- Porwollik S & McClelland M (2003) Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* **5**: 977–989.
- Raffatellu M, Chessa D, Wilson R, Dusold R, Rubino S & Bäumlér A (2005) The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infect Immun* **73**: 3367–3374.
- Raffatellu M, Chessa D, Wilson R, Tükel C, Akçelik M & Bäumlér A (2006) Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun* **74**: 19–27.
- Reeves M, Evins G, Heiba A, Plikaytis B & Farmer J (1989) Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol* **27**: 313–320.
- Rodríguez-Peña J, Alvarez I, Ibáñez M & Rotger R (1997) Homologous regions of the *Salmonella enteritidis* virulence plasmid and the chromosome of *Salmonella typhi* encode thiol: disulphide oxidoreductases belonging to the DsbA thioredoxin family. *Microbiology* **143**: 1405–1413.
- Rotger R & Casadesús J (1999) The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol* **2**: 177–184.
- Roumagnac P, Weill F, Dolecek C *et al.* (2006) Evolutionary history of *Salmonella typhi*. *Science* **314**: 1301–1304.
- Rychlik I, Gregorova D & Hradecka H (2006) Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* **112**: 1–10.
- Selander R, Beltran P, Smith N *et al.* (1990) Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect Immun* **58**: 2262–2275.
- Shah D, Lee M, Park J, Lee J, Eo S, Kwon J & Chae J (2005) Identification of *Salmonella gallinarum* virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **151**: 3957–3968.
- Sharma A & Qadri A (2004) Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *P Natl Acad Sci USA* **101**: 17492–17497.
- Shea J, Hensel M, Gleeson C & Holden D (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *P Natl Acad Sci USA* **93**: 2593–2597.
- Shi L, Adkins JN, Coleman JR *et al.* (2006) Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar typhimurium inside macrophages. *J Biol Chem* **281**: 29131–29140.
- Silverman M & Simon M (1980) Phase variation: genetic analysis of switching mutants. *Cell* **19**: 845–854.
- Simon M, Zieg J, Silverman M, Mandel G & Doolittle R (1980) Phase variation: evolution of a controlling element. *Science* **209**: 1370–1374.
- Slauch J, Lee A, Mahan M & Mekalanos J (1996) Molecular characterization of the *oafA* locus responsible for acetylation of *Salmonella typhimurium* O-antigen: *oafA* is a member of a family of integral membrane trans-acylases. *J Bacteriol* **178**: 5904–5909.
- Spanò S, Ugalde J & Galán J (2008) Delivery of a *Salmonella* Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* **3**: 30–38.
- Tacket C, Hone D, Curtiss R III *et al.* (1992a) Comparison of the safety and immunogenicity of delta *aroC* delta *aroD* and delta *cya* delta *crp* *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infect Immun* **60**: 536–541.

- Tacket C, Hone D, Losonsky G, Guers L, Edelman R & Levine M (1992b) Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine* **10**: 443–446.
- Thomson N, Baker S, Pickard D *et al.* (2004) The role of prophage-like elements in the diversity of *Salmonella enterica* serovars. *J Mol Biol* **339**: 279–300.
- Townsend S, Kramer N, Edwards R *et al.* (2001) *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* **69**: 2894–2901.
- Tsolis R, Young G, Solnick J & Bäumlner A (2008) From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nat Rev Microbiol* **6**: 883–892.
- Tsui IS, Yip CM, Hackett J & Morris C (2003) The type IVB pili of *Salmonella enterica* serovar Typhi bind to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infect Immun* **71**: 6049–6050.
- Tükel C, Akçelik M, de Jong M, Simsek O, Tsolis R & Bäumlner A (2007) MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Bacteriol* **189**: 3922–3926.
- Vernikos G & Parkhill J (2006) Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics* **22**: 2196–2203.
- Vernikos GS, Thomson NR & Parkhill J (2007) Genetic flux over time in the *Salmonella* lineage. *Genome Biol* **8**: R100.
- Vidal S, Tremblay M, Govoni G *et al.* (1995) The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med* **182**: 655–666.
- Wain J, Diem Nga LT, Kidgell C *et al.* (2003) Molecular analysis of incHI1 antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever. *Antimicrob Agents Ch* **47**: 2732–2739.
- Weening EH, Barker JD, Laarakker MC, Humphries AD, Tsolis RM & Baumler AJ (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.
- Wilson RP, Raffatellu M, Chessa D, Winter SE, Tükel C & Baumler AJ (2008) The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cell Microbiol* **10**: 876–890.
- Winter SE, Raffatellu M, Wilson RP, Russmann H & Baumler AJ (2008) The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. *Cell Microbiol* **10**: 247–261.
- Wong K, McClelland M, Stillwell L, Sisk E, Thurston S & Saffer J (1998) Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Infect Immun* **66**: 3365–3371.
- Wood M, Jones M, Watson P, Hedges S, Wallis T & Galyov E (1998) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella enteropathogenicity*. *Mol Microbiol* **29**: 883–891.
- Zhang XL, Tsui IS, Yip CM *et al.* (2000) *Salmonella enterica* serovar Typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **68**: 3067–3073.
- Zhao L, Ezak T, Li ZY, Kawamura Y, Hirose K & Watanabe H (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.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Fig. S1.** Genomic comparison of pathogenicity islands from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 and *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18.

**Table S1.** List of SPI-1 and SPI-2 effectors from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 and *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.