

Université de Montréal

Une nouvelle stratégie de vaccination contre *Salmonella*
Enteritidis, chez le poulet de chair:
«Les vésicules externes de membrane bactérienne»

par Lila Maduro

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en sciences vétérinaires
option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Décembre, 2015

©Lila Maduro, 2015

Résumé

La consommation de viande de poulet est considérée comme un facteur de risque important des épisodes de toxi-infections alimentaires à *Salmonella enterica* serotype Enteritidis (SE). Dans la perspective de contribuer au contrôle de SE chez la volaille, nous avons envisagé d'utiliser les vésicules externes de membrane bactérienne (VEMB) comme vaccin. En effet, des études ont montré que des VEMB peuvent être immunogènes et qu'elles ont été utilisées comme stratégie vaccinale. L'objectif du projet a été de produire, d'isoler et de purifier de telles vésicules à partir d'une souche de SE provenant du terrain et isolée au Québec, puis d'en faire une première caractérisation. La production des VEMB a été réalisée en conditions normales et en conditions de stress. Le stress a consisté à l'ajout d'un antibiotique dans un milieu nutritif et la croissance dans un milieu minimal acide. Les observations en microscopie électronique, ont confirmé la présence des VEMB dans toutes ces conditions. Le protocole de production en conditions normales de croissance a été ensuite retenu pour l'isolement des vésicules, et leur purification a été réalisée par gradient de densité. La caractérisation initiale des VEMB a été faite par migration sur gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) et leur profil protéique a été comparé à celui du lysat de cellules entières et aux protéines de la membrane externe de SE. Enfin, la quantification de leur contenu en lipopolysaccharides (LPS) a été évaluée. Nous avons produit, isolé et purifié des VEMB avec un protocole nous permettant d'obtenir un produit prêt à utiliser afin de vérifier leur immunogénicité et protection dans des conditions *in vivo* chez le poulet.

Mots-clés : *Salmonella* Enteritidis (SE), Vésicules externes de membrane bactérienne (VEMB), Vaccin, Volaille.

Abstract

Chicken meat consumption is considered as an important risk factor in *Salmonella* Enteritidis foodborne outbreaks. To better control SE in poultry, we are suggesting outer membrane vesicles (OMVs) as a potential vaccine. Previous studies have indeed shown that OMVs can be immunogenic and they have been used as vaccines. The objective of this project was to produce, isolate and purify such vesicles from a SE field strain, isolated from the province of Québec, then to do a first characterization. OMVs production was performed in normal growth conditions and under stress conditions. Stress consisted of antibiotic addition to the growth medium as well as growth in an acid minimal medium. Examination of the resulting supernatants by electron microscopy confirmed the presence of OMVs in all growth conditions. The production protocol in normal growth conditions was chosen for isolation, and purification of the vesicles was then performed by density gradient. Initial characterization of OMVs was made by migration on an electrophoresis gel (SDS-PAGE) and their protein profile was compared with the SE whole-cell lysate and SE outer membrane proteins (OMPs). Finally, quantification in lipopolysaccharides content (LPS) was done. We have produced, isolated and purified OMVs ready to be tested *in vivo* to verify for their immunogenic and protective effects in chickens.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis (SE), Outer Membrane Vesicles (OMVs), Vaccination, Poultry.

Table des matières

Résumé.....	i
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des abréviations.....	viii
Dédicace.....	ix
Remerciements.....	x
Introduction.....	1
1 Recension de littérature.....	5
1.1 <i>Salmonella</i>	5
1.1.1 <i>Salmonella</i> spp.....	5
1.1.2 <i>Salmonella</i> chez l'humain	6
1.1.2.1 Généralités	6
1.1.2.2 Prévalence	7
1.1.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis chez la volaille	9
1.1.3.1 Sources d'infection à <i>Salmonella</i> Enteritidis chez l'humain	9
1.1.3.1.1 Œufs en coquille	10
1.1.3.1.2 Viande	11
1.1.4 Contrôle de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	12
1.1.4.1 Biosécurité et mesures d'hygiène	13
1.1.4.2 La vaccination comme méthode de contrôle de SE	14
1.2 Vésicules de membrane externe bactérienne (VEMB)	16
1.2.1 Caractéristiques générales des VEMB	16
1.2.2 Rôle des VEMB.....	20
1.2.2.1 Mécanisme de sécrétion et de transport	20
1.2.2.2 Défense et résistance.....	21
1.2.2.3 Acquisition de nutriments	21

1.2.2.4	Communication cellulaire et formation de biofilm.....	22
1.2.3	Biogénèse des VEMB.....	23
1.2.3.1	Modulation des liaisons de l'enveloppe bactérienne	26
1.2.3.2	Lipides et molécules de liaison de lipides.....	27
1.3	Les VEMB comme plateforme vaccinale	28
1.4	Les VEMB et <i>Salmonella</i>	29
2.	Méthodologie	32
2.1	Production et isolement des VEMB	32
2.1.1	Production des VEMB dans des conditions normales de croissance bactérienne	32
2.1.2	Production des VEMB en conditions de stress.....	33
2.1.2.1	Croissance en présence d'antibiotique.....	33
2.1.2.2	Croissance bactérienne en milieu minimal	34
2.2	Purification des VEMB	34
2.3	Caractérisation des VEMB.....	37
2.3.1	Observation des VEMB par Microscopie électronique à transmission (MET).....	37
2.3.2	Quantification des VEMB	38
2.3.3	Extraction des protéines totales de <i>Salmonella</i> Enteritidis SHY 04 1540.....	38
2.3.4	Extraction des protéines de membrane externe de <i>Salmonella</i> Enteritidis SHY 04 1540	39
2.3.5	Extraction du lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe de <i>Salmonella</i> Enteritidis SHY 04 1540.....	40
2.3.6	Extraction du LPS des VEMB de <i>Salmonella</i> Enteritidis SHY 04 1540	41
2.3.7	Quantification du LPS	42
2.3.8	Électrophorèses sur gel de polyacrylamide (PAGE)	43
2.3.8.1	Électrophorèses des protéines sur gel de polyacrylamide (PAGE)	43
2.3.8.2	Électrophorèses du LPS sur gel de polyacrylamide (PAGE).....	43
3.	Exposé et analyse des résultats	44
3.1	Production et isolement des VEMB	44
3.1.1	Production des VEMB dans des conditions normales de croissance	44

3.1.2 Production des VEMB en conditions de stress.....	45
3.1.2.1 Ajout de gentamicine	45
3.1.2.2 Croissance en milieu minimal.....	48
3.2 Caractérisation des VEMB.....	50
3.2.1 Observation des VEMB par microscopie électronique à transmission (MET)	50
3.2.1.1 Observation MET des VEMB obtenues à partir des protocoles en conditions normales et sous stress, avant l'étape de purification sur gradient	50
3.2.1.2 Observations au MET des VEMB obtenues à partir d'un protocole de croissance en conditions normales et purifiées par gradient de densité.....	53
3.2.2 Quantification des protéines	56
3.2.2.1 Quantification des protéines des VEMB de Salmonella Enteritidis SHY 04 1540.....	56
3.2.2.2 Quantification des protéines totales et des protéines de membranes externes de Salmonella Enteritidis SHY 04 1540.....	56
3.2.3 Électrophorèses des protéines sur gel de polyacrylamide (PAGE)	56
3.2.4 Quantification du LPS	57
3.2.5 Électrophorèses du LPS sur gel de polyacrylamide (PAGE)	57
4. Discussion générale	59
Conclusion	66
Bibliographie	68

Liste des tableaux

Tableau I. Vaccins contre <i>Salmonella</i> Enteritidis homologués au Canada	16
Tableau II. Données des courbes de croissance de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) SHY-O4-1540 en conditions normales de croissance dans le milieu LB	44
Tableau III. Données des courbes de croissance de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) SHY-O4-1540 et <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST) ATCC 14028 en conditions de croissance normales dans le milieu TSB	46
Tableau IV. Données de la courbe de croissance de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) SHY-O4-1540 en conditions de croissance sous stress dans le milieu minimal acide (AMM).....	49

Liste des figures

Figure 1 Composition de l'enveloppe des bactéries à coloration Gram négatif.....	19
Figure 2 Modèles proposés pour la biogenèse des VEMB des bactéries à coloration Gram négatif	25
Figure 3. Gradient de densité OptiPrep™	35
Figure 4. Schéma général du protocole de production, d'isolement et de purification des VEMB.....	36
Figure 5. Courbe et phases de croissance de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) SHY-O4-1540 en conditions normales dans le milieu LB.....	45
Figure 6. Courbe de croissance de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) SHY-O4-1540 en conditions de croissance normales, dans le milieu TSB	47
Figure 7. Courbe de croissance de <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST) ATCC 14028 en conditions de croissance normales dans le milieu TSB.....	48
Figure 8. Courbe de croissance de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) SHY-O4-1540 en conditions de croissance sous stress dans le milieu minimal acide (AMM).....	49
Figure 9. Image obtenue par microscopie électronique à transmission	51
Figure 10. Images obtenues par microscopie électronique à transmission.....	52
Figure 11. Image obtenue par microscopie électronique à transmission	53
Figure 12. Images obtenues par microscopie électronique à transmission.....	55
Figure 13. SDS-PAGE de protéines de SE SHY-O4-1540	57
Figure 14. SDS-PAGE de LPS	58

Liste des abréviations

CMI : Concentration minimale inhibitrice

h : Heure(s)

L: Litre

Lpp : lipoprotéine de Braun

LPS : Lipopolysaccharide

ME : Membrane externe

mg: Milligramme

min: Minute

mL: Millilitre

mM: Millimolaire

nm : Nanomètre

OMVs : Outer membrane vesicles

OmpA : Protéine A de la membrane externe

OMPs: Outer membrane proteins

PG: Peptidoglycane

PQS : *Pseudomonas* Quinolone Signal

VEMB : Vésicules externes de membrane bactérienne

SE : *Salmonella* Enteritidis

°C: Degré Celsius

µl : Microlitre

µg : Microgramme

µm : Micromètre

Dédicace

A mon conjoint Juan Manuel, grâce à ses encouragements, à son soutien moral et économique, il a pu créer le climat propice à la poursuite de mes études.

A ma fille Antonia, toujours tendre et compréhensive pour le temps que me demandaient les études, elle a été le moteur principal de mon projet de faire une maîtrise.

A mes parents qui m'ont donné l'exemple et enseigné qu'il n'est jamais trop tard pour poursuivre ses rêves.

A ma sœur Taty qui est toujours là pour m'encourager.

A Suzanne Bourbeau et Michel Lamarre, qui ont eu la gentillesse de lire et corriger mes travaux universitaires, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect et mes profonds sentiments envers eux.

*“Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes”
“J'ai vu plus loin que les autres parce que je me suis juchée sur les épaules de géants.”
Isaac Newton*

Remerciements

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à la réussite de ces formidables années universitaires :

Je tiens à remercier sincèrement la Docteure Martine Boulianne qui, comme directrice de maîtrise, s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce projet.

Mes remerciements s'adressent également à la Docteure Sylvette Laurent-Lewandoswki pour ses conseils précieux et sa générosité à transmettre ses connaissances ainsi que pour la grande patience dont elle a fait preuve à mon égard.

J'aimerais exprimer aussi ma gratitude à la Docteure Ann Letellier pour avoir cru en moi et m'avoir ouvert la porte qui m'a donné l'opportunité de poursuivre à la maîtrise.

Un grand merci à Nicole Trottier qui est un soutien moral incomparable, et finalement grâce à qui j'ai eu l'occasion de connaître et d'apprécier les chercheurs avec qui j'ai travaillé.

Merci au ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) d'avoir financé ce projet de maîtrise.

Enfin merci à Yun Cui, Katleen Sary et à tous mes camarades de Maîtrise, à tous les membres du laboratoire de la Chaire de recherche en salubrité de viandes (CRSV) et du groupe de recherche et d'enseignement en salubrité alimentaire (GRESA), avec qui les échanges ont été enrichissants pendant ces années universitaires. Un mot spécial pour Jorge Davila, son soutien informatique a été crucial tout au long de ma maîtrise.

Introduction

Salmonella est une des premières causes de toxi-infections d'origine alimentaire. Certains cas peuvent provenir des animaux domestiques, des reptiles ou de l'eau contaminée, cependant le pourcentage de transmission par l'aliment est estimé à 95 % (Silue, 2005). Ces toxi-infections d'origine alimentaire causées par les salmonelles montrent que la surveillance doit être permanente, compte tenu des pertes sociales et économiques engendrées.

Divers sérotypes sont responsables de ces toxi-infections mais parmi les plus pathogènes associés au cas pour les humains, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis (SE) se distingue. En effet, en 1988 ce sérotype a été responsable en Grande-Bretagne d'un des plus grands épisodes de toxi-infection alimentaire pour un pays industrialisé, avec plus 30 000 cas et 60 décès pour une seule année.

Au Canada, le nombre de toxi-infections à SE s'est accru depuis 2005, et le taux annuel d'incidence nationale pour SE a triplé entre 2003 et 2008 (Landry et Dutil, 2010). Ainsi pour 2012, SE était le sérotype le plus fréquemment observé chez les humains, suivi de *Salmonella* Heidelberg, puis de *Salmonella* Typhimurium (Gouvernement du Canada, 2012; Santé Canada, 2015)

Les toxi-infections alimentaires causées par SE sont le plus souvent liées à la consommation d'œufs, d'ovo-produits mais aussi à la consommation de viande de volaille (Geng et al., 2015).

Dans le cadre du programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA), il a été remarqué que les mêmes lysotypes de SE ont été isolés chez les humains et chez les poulets de chair (Landry et Dutil, 2010).

Au Québec, la Fédération des producteurs d'œufs a mis en place, en collaboration avec ses partenaires gouvernementaux, un programme québécois de surveillance et d'éradication pour

SE chez la poule pondeuse et ce, depuis 1996. Malgré ce programme, et similairement à ce qui a été rapporté à l'échelle canadienne, une augmentation des cas de SE chez les humains a aussi été observée au Québec au cours des dernières années (Landry et Dutil, 2010).

Ceci est probablement la conséquence de contamination croisée entre la filière des poulets de chair et celle des pondeuses commerciales. Cette contamination résulte vraisemblablement de l'échange de matériel d'emballage contaminé, insuffisamment nettoyé et désinfecté d'un producteur à l'autre, par l'intermédiaire du classificateur ou du transformateur. Ceci a d'ailleurs été démontré par une enquête épidémiologique lors d'une éclosion de SE chez les poules pondeuses en 2004 (Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation MAPAQ, 2005). Ces épisodes, tout en étant très coûteux pour l'industrie, sont sources de stress pour les producteurs affectés. Ceux-ci doivent se soumettre à diverses mesures sévères de biosécurité, adopter un protocole de lavage et désinfection très rigoureux, contrôler les rongeurs, tester à répétition l'environnement et le troupeau suivant pour le dépistage de SE. Malheureusement, l'expérience montre qu'il y a près de 50% de chance pour que le prochain troupeau de pondeuses soit aussi positif à SE et ce, malgré toutes les précautions prises. Comme il a été démontré que la vaccination diminue le risque d'obtenir des œufs positifs d'oiseaux exposés à SE, il pourrait être avantageux d'ajouter la vaccination au programme québécois de prévention pour les troupeaux précédemment affectés par SE. La vaccination des poulets reproducteurs de la filière des poulets de chair pourrait même être considérée. Cependant, des études passées nous ont montré que les vaccins commercialement disponibles n'offrent pas de protection complète car ils stimulent essentiellement l'immunité humorale et non l'immunité mucoale. Cette dernière est importante lors de la contamination à SE (Tran, 2010), compte tenu de l'infection par voie orale et que l'intestin est l'endroit privilégié pour la

colonisation et la persistance des salmonelles chez la volaille des élevages (Virlogeux-Payant, Lalmanach, Beaumont, Hirt et Velge, 2012).

Un vaccin à VEMB utilisé en médecine humaine a démontré non seulement son innocuité, mais aussi son efficacité. Il s'agit du vaccin VEMB contre les méningites à *Neisseria meningitidis* chez les humains, qui a été homologué (Holst et al., 2009). Les VEMB sont des structures complexes, que l'on retrouve chez toutes les bactéries à Gram négatif, et qui ont des rôles encore non complètement élucidés: voie de sécrétion de certaines protéines, implication dans le transport inter-cellulaire de facteurs de virulence, système de survie attesté par leur augmentation de nombre en présence de stressseurs (comme des conditions de température ou de pH extrêmes), formation de biofilms, etc.(Kulp et Kuehn, 2010). Fait intéressant, il a été montré qu'elles peuvent stimuler le système immunitaire de l'hôte grâce aux lipopolysaccharides, phospholipides, protéines, composantes périplasmiques et ADN qu'elles recèlent. Ainsi, les VEMB de la bactérie Gram négative *Vibrio cholerae*, ont induit une réponse immunitaire avec activité vibriocide, lorsqu'administrées par voie nasale chez la souris (Schwechheimer et Kuehn, 2015). De nombreuses études de protéomique de ces VEMB montrent qu'elles contiennent des protéines dont le potentiel immunogène a été observé (Lee, Choi, Kim et Gho, 2008).

En ce qui a trait à *Salmonella*, il a été démontré que les VEMB de *Salmonella* Typhimurium peuvent activer les cellules dendritiques et stimuler l'immunité protectrice *in vivo* chez la souris (Alaniz, Deatherage, Lara et Cookson, 2007). De plus, il a été montré que des protéines de VEMB de *Salmonella* Enteritidis sont reconnues par des sérums provenant de poules naturellement infectées par ce pathogène (Ochoa-Reparaz et al., 2004). Ces diverses observations conduisent à faire l'hypothèse que les vésicules de membranes externes

bactériennes seraient des candidates intéressantes pour la mise au point d'un vaccin contre *Salmonella* Enteritidis; elles pourraient être administrées par voie orale/intranasale à des fins de vaccination de masse et ce à coût minime.

Notre objectif a donc été de produire, d'isoler et de purifier des VEMB provenant de la souche de terrain SHY-04-1540 de *Salmonella* Enteritidis, puis de les caractériser visuellement par microscopie électronique, enfin à les quantifier au niveau de leur contenu protéique. Toutes ces étapes ont fait l'objet d'optimisation et de standardisations rigoureuses afin que le produit final soit reproductible. En effet, c'est ce produit qui sera testé pour son efficacité à générer une réponse immunitaire protectrice chez le poussin.

1 Recension de littérature

1.1 *Salmonella*

1.1.1 *Salmonella* spp

Salmonella est une bactérie à coloration Gram négatif, en forme de bâtonnet, dont la taille varie entre 2 et 5 µm de longueur sur 0,7 à 1,5 µm de largeur (Silue, 2005). Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les membres du genre *Salmonella* sont anaérobies facultatifs, non fermenteurs de lactose, oxydase négatifs, uréase négatifs, utilisateurs du citrate, acétylméthyle carbinol négatifs et cyanure de potassium négatifs. Les salmonelles, à l'exception de *Salmonella Gallinarum*, sont généralement mobiles avec flagelle (Agbaje, Begum, Oyekunle, Ojo et Adenubi, 2011).

Le genre *Salmonella* se divise en deux espèces soit *bongori* et *enterica*. L'espèce *bongori* est commensale des animaux à sang froid (Hansen-Wester, Chakravortty et Hensel, 2004). L'espèce *enterica* est subdivisée en six sous-espèces: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) et *indica* (VI) (Patrick et Weill, 2007). L'habitat commun de la sous-espèce *enterica* (I) est représenté par les animaux à sang chaud (Su et Chiu, 2007) tandis que les sous-espèces II, IIIa, IIIb, IV et VI se retrouvent chez les animaux à sang froid et dans l'environnement (Patrick et Weill, 2007). La sous-espèce *enterica* de *Salmonella enterica* comprend 2610 sérotypes différents, les plus connus étant Typhi, Paratyphi, Enteritidis, Typhimurium et Choleraesuis (Su et Chiu, 2007). Les sérotypes sont classifiés selon le système de Kauffmann-White qui utilise une combinaison des trois antigènes de surface: l'antigène flagellaire «H», l'antigène oligosaccharidique «O» et

l'antigène polysaccharidique «Vi» (découvert dans les sérotypes Typhi et Paratyphi) (Agence de la santé publique du Canada, 2010; Bronze et Greenfield, 2005).

1.1.2 Salmonella chez l'humain

1.1.2.1 Généralités

Les sous-espèces de *Salmonella enterica* sont généralement des agents pathogènes acquis par voie orale. Ces sous-espèces peuvent causer un des quatre grands syndromes suivants: fièvre entérique (typhoïde), gastro-entérite, bactériémie et portage asymptomatique chronique. La manifestation de la maladie dépend à la fois de la sensibilité de l'hôte et du sérotype infectieux. Chez l'humain, les sérotypes Typhi, Paratyphi et Sendai causent une fièvre entérique, tandis que la plupart des autres sérotypes provoquent une gastro-entérite (Agence de la santé publique du Canada, 2010). Les infections entériques dues à *Salmonella* sont généralement désignés par le terme «salmonellose » quand elles sont dues à *Salmonella* autres (non-Typhi) que *Salmonella* Typhi et Paratyphi (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015).

Plusieurs sérotypes dont Choleraesuis et Dublin, sont plus communément associés à une bactériémie chez l'humain. Le sérotype Typhi est restreint à l'homme, tandis que les autres sérotypes sont plus largement adaptés à l'hôte et provoquent une infection naturelle chez les animaux.

Les sérotypes Dublin, Typhimurium et Choleraesuis peuvent causer des maladies chez les humains et les animaux, mais ils causent des syndromes distincts chez les différents hôtes. Le sérotype Dublin provoque une maladie intestinale inflammatoire, une bactériémie et des avortements chez les bovins. Le sérotype Typhimurium provoque une maladie systémique chez la souris; et le sérotype Choleraesuis cause une septicémie chez le porc (Coburn, Grassl

et Finlay, 2006). Les sérotypes Gallinarum biovar Gallinarum et biovar Pullorum) sont étroitement adaptés à leurs hôtes, et notamment les poules chez lesquelles ils possèdent la capacité de provoquer une maladie septicémique spécifique, la typhose et la pullorose respectivement (Setta, Barrow, Kaiser et Jones, 2012). Chez l'homme, la fièvre entérique (typhoïde) et la maladie intestinale diarrhéique représentent les syndromes les plus courants associés à l'infection à *S. enterica* (Coburn et al., 2006).

La grande majorité des infections à *Salmonella* chez l'homme sont d'origine alimentaire, *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium étant les sérotypes les plus couramment retrouvés (Terrestrial Animal Health Code, 2010).

1.1.2.2 Prévalence

Salmonella spp est responsable de 93,8 millions de cas de gastroentérites humaines et de 155 000 morts par année à travers le monde (Elgroud et al., 2015).

Au Canada, *Salmonella* spp s'avère un des microorganismes le plus couramment associé aux cas de toxi-infections alimentaires qui requièrent une hospitalisation et qui peuvent être mortelles. La moyenne annuelle d'hospitalisations et de morts, causées par *Salmonella* spp., non Typhi, est estimée à 857 et 16 respectivement (Thomas et al., 2015).

Au Québec, entre 2012 et 2013, les signalements de salmonellose reçus par le MAPAQ ont concerné des toxi-infections alimentaires contractées au domicile des consommateurs pour 52,1% des cas rapportés. De tous les événements de salmonellose signalés, 36% étaient liés à la consommation de poulet, soit une augmentation de 21% par rapport aux résultats de l'année 2011-2012 (Le ministère de l'Agriculture, 2014).

Aux États-Unis, il est estimé que *Salmonella* est l'agent causant de 9,4 millions de cas de toxi-infections alimentaires par année, dont *Salmonella* non-Typhi est responsable. Environ 11% de ces cas (1 million) provoquent 19586 hospitalisations et 378 morts (Rodriguez, Fandino, Donado, Guzman et Verjan, 2015).

Dans l'Union européenne, plus de 100 000 cas de salmonellose ont été signalés en 2003 au réseau international pour la surveillance des infections gastro-intestinales humaines (EnterNet) (Fisher et Meakins, 2006) et plus de 90 000 cas en 2012. Même si les cas humains de salmonellose ont diminué régulièrement depuis 2005, *Salmonella* est toujours un problème majeur de santé publique dans les pays en développement (Elgroud et al., 2015).

Salmonella sérotype Enteritidis (SE) est apparu comme une cause répandue de salmonellose humaine au Canada et à l'échelle mondiale dans les années 1980. SE a été classé parmi les trois principaux sérotypes non-Typhi, allant de 12% à 27 % de toutes les infections à *Salmonella* rapportées au Canada entre 1999 et 2006 (Nesbitt et al., 2012).

Selon FoodNet (Foodborne Diseases Active Surveillance from EEUU), les cas d'incidents annuels de *Salmonella* Enteritidis (le sérotype le plus fréquent), ont augmenté de 44% depuis les années 1990, d'une moyenne de 1,9 cas pour 100 000 habitants à 2,8 cas par 100 000 habitants en 2008 (Cummings et al., 2015).

Ainsi au cours des deux dernières décennies, SE a émergé comme le sérotype le plus fréquemment associé à la plupart des épidémies humaines, avec des implications en santé publique et en conséquences économiques importantes et ce, à l'échelle mondiale (Adesiyun et al., 2014).

1.1.3 *Salmonella* Enteritidis chez la volaille

Les signes cliniques de *Salmonella* Enteritidis (SE), ne sont généralement pas visibles chez les poulets, mais ils peuvent être observés chez les jeunes oiseaux. Chez le poussin, les signes d'infection sont non spécifiques et comprennent la dépression, un retard de croissance, de la faiblesse et de la diarrhée, avec des mortalités ne survenant habituellement que dans les premières semaines de vie. Les poussins sont extrêmement sensibles à la colonisation par SE, car ils ne possèdent pas de microbiote établi au niveau des intestins (Mitchell, Buhr, Berrang, Bailey et Cox, 2002).

Le développement d'une septicémie peut n'entraîner aucun ou peu de signes cliniques, et une mortalité élevée chez les poussins. L'infection du poussin survient habituellement suite à une transmission horizontale, plus souvent par la consommation d'une substance contaminée plutôt que par inhalation et aussi verticalement par la mère contaminée. L'infection des jeunes oiseaux est particulièrement préoccupante étant donné qu'il a été démontré que le poulet est en mesure d'abriter et d'excréter SE pendant plus de six mois après l'exposition (Mitchell et al., 2002).

Des études ont constaté que SE était présent dans de nombreux cas de péricardite dans les carcasses de poulets condamnés et qu'elle a également été trouvée dans un certain nombre de cas de périhépatite. À l'exception des poussins, SE est généralement indétectable chez les poulets, et il faut recourir à des analyses microbiologiques (incluant le pre-enrichissement en milieu non sélectif et enrichissement en milieux sélectifs) pour la détecter car il est rare que SE produise des signes cliniques chez le poulet et les volailles adultes (Keery, 2010).

1.1.3.1 Sources d'infection à *Salmonella* Enteritidis chez l'humain

Les sérotypes de *Salmonella enterica* colonisent le tractus intestinal des animaux et des oiseaux et sont transmis à l'homme par la consommation d'aliments qui sont directement ou indirectement contaminés par des excréments d'animaux infectés.

Les sources d'infection à *Salmonella* chez l'humain sont fréquemment associées à la consommation d'œufs (et produits dérivés contaminés) et de viande contaminée (principalement la volaille) (Elgroud et al., 2015; Geng et al., 2015). Le poulet cru doit être manipulé avec précaution afin d'éviter les contaminations croisées. Cela peut arriver si le poulet cru ou ses sucs sont mis en contact avec des aliments cuits ou crus (salade). Par exemple, cela arrive si l'on coupe des tomates, qui seront consommés, sur une planche à découper non nettoyée sur laquelle on a préalablement découpé du poulet cru (Silue, 2005).

Des études menées par le Service d'inspection et de contrôle de la sécurité sanitaire des denrées alimentaires du département de l'Agriculture des États-Unis, ont montré que sur des poulets de chair échantillonnés, un sur huit était contaminé par *Salmonella*, et que près de 60% des isolats de SE (non humains) provenaient du poulet (Geng et al., 2015).

Les données de surveillance du Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA) et de C-EnterNet (Programme national de surveillance intégrée des agents entéropathogènes du Canada, actuellement FoodNet), présentées pendant un atelier canadien de contrôle de SE au Canada en 2010, ont montré que l'incidence de SE chez le poulet et chez les humains a augmenté depuis 2004. Les lysotypes prédominants détectés à la ferme, à l'abattoir et dans des échantillons de poulet au détail, étaient les mêmes que ceux les plus fréquemment trouvés chez l'homme (Landry et Dutil, 2010).

1.1.3.1.1 Œufs en coquille

Les œufs constituent un vecteur majeur de SE pour les humains. La plupart des sérotypes de *Salmonella* contaminent les œufs en coquille sur leur surface extérieure, puis pénètrent dans leur contenu par les fissures de la coquille ou en raison d'autres facteurs susceptibles d'entraîner la pénétration de la coquille de l'œuf (*p. ex.*, durée et/ou température d'entreposage inadéquates, lavage inadéquat de l'œuf). SE est réputée pour constituer un important problème d'innocuité alimentaire dans les œufs en coquille en raison de sa capacité à être présente dans le contenu de l'œuf. Il y a deux voies possibles de contamination à *Salmonella* dans des œufs intacts, soit par transmission horizontale, où *Salmonella* pénètre à travers la coquille, ou par transmission verticale qui se produit à la suite d'un dépôt transovarien des bactéries directement dans le contenu de l'œuf associé aux tissus reproducteurs infectés des poules pondeuses. Les poules pondeuses sont le plus souvent infectées par SE sans présenter de signes de maladie. À ce jour, la voie la plus importante pour la contamination par *Salmonella*, notamment SE, du contenu de l'œuf, n'est pas clairement établie (Howard, O'Bryan, Crandall et Ricke, 2012).

Une fois que SE a contaminé l'œuf, le danger est aggravé lorsque les œufs contaminés ne sont pas réfrigérés, permettant aux microorganismes d'accéder au jaune d'œuf et à ceux déjà présents dans le jaune d'y croître rapidement. Lorsqu'un œuf est touché par une contamination interne à SE, la plupart des préparations à base d'œufs sont suffisamment cuites pour inactiver la bactérie. Toutefois, SE pourrait être présente dans des préparations à base d'œufs crus ou insuffisamment cuits (DeWinte, Ross, Couture et Farber, 2011; Howard et al., 2012).

1.1.3.1.2 Viande

La contamination de la viande survient habituellement à l'abattoir au moment de l'éviscération, par exemple, lorsque le contenu intestinal contamine la surface des carcasses, et

par la suite par contamination croisée (contact entre carcasses, manipulation etc.) (Van Immerseel et al., 2005). Même si la viande de poulet est un préoccupation de contamination par SE (contamination croisée du produit cru avec d'autres aliments et surfaces), la viande est généralement bien cuite avant la consommation, tandis que les œufs sont encore utilisés dans de nombreux plats crus, ce qui fait qu'ils soient une cause majeure de poussées épidémiques de SE dans les populations humaines (Keery, 2010).

1.1.4 Contrôle de *Salmonella* Enteritidis

La consommation de poulet demeure un important facteur de risque malgré les interventions pour contrôler l'infection à SE à la ferme. Des souches de SE associées à l'infection humaine ont été récupérées à partir d'isolats de volaille provenant de la ferme, de l'abattoir et de la viande vendue au détail.

Pour résoudre ce problème au Canada, un groupe national de travail sur SE a été composé, par l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA), l'Agence de santé publique du Canada (ASPC), Santé Canada, Agriculture et agroalimentaire Canada, les ministères de la santé et de l'agriculture provinciaux, et les organisations de la volaille : Producteurs de poulet de Canada (PPC), Producteurs d'œufs du Canada (POC), Producteurs d'œufs d'incubation de Canada (POIC), Conseil canadien des transformateurs d'œufs et de volailles (CCTOV), TFC (Turkey farmers of Canada) et CHF (Canadian hatchery federation) en mars 2012 (Brett, 2014).

Les membres de ce groupe de travail conjoint «industrie-gouvernement» ont fait des recommandations visant à corriger les lacunes observées dans les secteurs de la volaille, (soit du poulet et du dindon), et des œufs. Ces recommandations visent à améliorer le contrôle de SE d'origine alimentaire et dont l'objectif ultime est de réduire les cas de maladie chez l'humain provoquée par SE provenant des produits de la volaille.

Les priorités sont: le contrôle et la surveillance de SE dans la volaille et les sous-produits de volaille; l'intégration des données issues des activités de contrôle et de surveillance de SE chez la volaille vivante, dans les aliments et chez l'humain; les stratégies de contrôle à la ferme et au sein de l'industrie; les interventions réglementaires/stratégiques visant à améliorer le contrôle de SE dans les secteurs de la volaille et l'éducation en matière de salubrité alimentaire (Santé Canada, 2015).

Les secteurs de la volaille opèrent sous la législation relative à la santé animale. En ce qui concerne la législation provinciale sur la santé animale, le signalement de SE est exigé en Alberta et au Manitoba. Le Québec est également en voie d'ajouter *Salmonella* spp. (y compris SE) sur la liste provinciale des maladies à déclaration obligatoire. Les laboratoires seront tenus de rendre compte des résultats d'analyses au ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ).

Les Producteurs de poulets du Canada ont élaboré un programme obligatoire, fondé sur le système HACCP appelé «Votre propre poulet», qui établit des pratiques sanitaires et de gestion visant le cycle de production. Ce programme repose sur l'analyse des risques biologiques, chimiques et physiques que comporte la production de poulets (Santé Canada, 2015).

Présentement, l'adoption de la vaccination et d'autres mesures en matière de gestion des risques de la production de volaille aident à la réduction et/ou au contrôle du nombre d'infections à *Salmonella enterica* sérotype Enteritidis.

1.1.4.1 Biosécurité et mesures d'hygiène

Dans le secteur des couvoirs et de la reproduction (poulet de chair, pondeuse et dindon), les producteurs doivent faire la surveillance du triage et de la qualité des œufs, le contrôle de

parasites et rongeurs, le nettoyage et la désinfection pendant et entre les cycles de production, le contrôle des matériaux reçus, et strictement appliquer les règles de biosécurité. Des auditeurs procèdent à des vérifications pour évaluer la biosécurité à la ferme, révisent annuellement les dossiers et les procédures normales d'exploitation, et identifient au besoin les demandes de mesures correctives (Santé Canada, 2015).

Si SE est détectée en routine lors des prises d'échantillons de l'environnement, il est possible d'identifier les facteurs de risque d'augmentation de SE et des mesures d'action peuvent être mises en place afin d'éviter la propagation de *Salmonella* en élevage de volailles (Kinde et al., 2015). Aussi des interventions au niveau des troupeaux de reproducteurs aident à diminuer la transmission de *Salmonella* aux couvoirs, et possiblement réduire les niveaux de contamination dans la chaîne de production avicole (Sivaramalingam, McEwen, Pearl, Ojkie et Guerin, 2013).

Au Québec, une surveillance sanitaire des agents zoonotiques isolés dans tous les laboratoires du MAPAQ est faite et dédiée à la santé animale,. Des échantillons peuvent être soumis à ces laboratoires pour la détection de SE (Santé Canada, 2015).

1.1.4.2 La vaccination comme méthode de contrôle de SE

Pour réduire les sources de risque biologique, en particulier SE, l'industrie avicole a créé des programmes de salubrité des aliments à la ferme ainsi que des mesures préventives comme la vaccination. Programmes qui ont été mis en œuvre à l'échelle provinciale, la plupart au cours des dernières années. En Colombie-Britannique, Alberta, Saskatchewan, Manitoba et Ontario les troupeaux de poulets de chair reproducteurs sont vaccinés contre SE (Santé Canada, 2015) (voir tableau I).

À ce jour, trois catégories de vaccins contre *Salmonella* spp chez la volaille ont été testés: Vivants atténués, inactivés et sous unitaires (Desin, Koster et Potter, 2013).

Vaccins vivants-atténués: Il s'agit d'une souche bactérienne avec des mutations ou des délétions dans les gènes qui sont essentiels pour le métabolisme, la virulence ou la survie dans l'organisme hôte. Le principal inconvénient de cette classe de vaccins est que la souche vivante peut persister pendant de longues périodes tant dans les poulets que dans leur environnement, représentant une menace potentielle pour la santé humaine. Toutefois, la persistance de la souche vivante atténuée serait propice pour le transfert horizontal de l'immunité entre les oiseaux pour lesquelles la vaccination individuelle n'est pas une option. D'autres inconvénients des vaccins de souche vivante atténuée sont une crainte de retour à la virulence et la possible interférence avec les tests de dépistage de *Salmonella* (Tan, Gyles et Wilkie, 1997). C'est pour cette raison que ce type de vaccins n'est pas utilisé au Canada.

Vaccins inactivés: Ces vaccins sont en fait la bactérie complète qui est inactivée par différentes méthodes, soit la chaleur, la formaline, l'acétone ou autres traitements. La plupart des vaccins inactivés contre *Salmonella* sont administrés par voie intramusculaire ou sous-cutanée. L'avantage de ces vaccins consiste en l'absence du microorganisme vivant, qui pourrait demeurer dans l'environnement et causer des problèmes pour la santé humaine. Un désavantage est que les vaccins inactivés peuvent être éliminés par l'hôte dans de courtes périodes de temps (Barrow, 2007).

Vaccins sous unitaires: Les vaccins sous-unitaires sont composés soit d'un ou de plusieurs antigènes définis (principalement des protéines). Ces composants sont présents à la surface de la cellule bactérienne et ils ont d'importantes caractéristiques de virulence. La plupart des vaccins sous-unitaires sont administrés par voie sous-cutanée ou intramusculaire à moins qu'ils

soient formulés de façon appropriée pour une administration orale, pour stimuler l'immunité mucoale. Ces formulations doivent alors minimiser la dégradation de l'antigène. Il n'y a pas de complications associées aux vaccins sous-unitaires, néanmoins ils sont généralement faiblement immunogènes, exigeant une formulation avec un adjuvant approprié (Mutwiri et al., 2011).

Tableau I. Vaccins contre *Salmonella* Enteritidis homologués au Canada(Compendium of Veterinary Products, 2016)

<i>Laboratoire pharmaceutique</i>	Nom commercial	NEWCASTLE (Virus tué)	BRONCHITIS (Virus tué)	<i>Salmonella</i> Enteritidis (Inactivée)	Administration Intramusculaire	Administration sous-cutanée
LOHMANN ANIMAL HEALTH INTERNATIONAL	AviPro® 109 SE4 Conc			X		X
CEVA ANIMAL HEALTH	Layermune® SE (0.25)			X		X
CEVA ANIMAL HEALTH	Layermune® SE (0.50)			X		X
ZOETIS CANADA INC.	Poulvac® SE			X		X
MERCK ANIMAL HEALTH	SE Guard™			X		X
LOHMANN ANIMAL HEALTH INTERNATIONAL	AviPro® 329 ND-IB2-SE4 Conc	X	X	X	X	X
MERCK ANIMAL HEALTH	Bron-Newcavac™-SE	X	X	X		X
CEVA ANIMAL HEALTH	Layermune® 3 (0.25)	X	X	X		X
CEVA ANIMAL HEALTH	Layermune® 3 (0.50)	X	X	X		X
ZOETIS CANADA INC.	Poulvac® SE-ND-IB	X	X	X		X

1.2 Vésicules de membrane externe bactérienne (VEMB)

1.2.1 Caractéristiques générales des VEMB

Dans les trois domaines de la vie (Eukarya, Archaea et Bacteria), les cellules produisent et libèrent dans l'espace extracellulaire du matériel lié à la membrane. Ce matériel est souvent appelé soit vésicules membranaires, vésicules de membrane externe, microvésicules,

exosomes, tolérasomes, agrosomes ou particules pseudo-virales. Les vésicules de la membrane externe bactérienne (VEMB) (en anglais; Outer Membrane Vesicles - OMVs), sont dérivées de l'enveloppe cellulaire des bactéries à coloration Gram négatif (Silhavy, Kahne et Walker, 2010).

Les VEMB ont été observées et étudiées depuis des décennies. Toutes les bactéries à coloration Gram négatif produisent des VEMB (Schwechheimer, Sullivan et Kuehn, 2013) et ce, dans une variété d'environnements y compris les cultures planctoniques, l'eau douce et l'eau salée, les biofilms, à l'intérieur des cellules eucaryotes et au sein d'hôtes mammifères (Schertzer et Whiteley, 2012).

Les VEMB sont des nanostructures sphériques entourées par une double couche lipidique, mesurant entre 20 et 250 nm (Kaparakis-Liaskos et Ferrero, 2015). Elles sont excrétées dans le milieu extracellulaire à partir de l'enveloppe cellulaire des bactéries à coloration Gram négatif, et leur composition est donc très similaire à celle de l'enveloppe: elles contiennent du LPS sur la bicouche lipidique, des phospholipides et des protéines de membrane externe, ainsi que des protéines du périplasma qui ont été entraînées lors de la formation de la vésicule (Kadurugamuwa et Beveridge, 1996; Veith et al., 2015). Il est important de considérer l'architecture unique de cette enveloppe des bactéries à Gram négatif, afin de comprendre les mécanismes qui sont impliqués dans le bourgeonnement et le détachement des VEMB.

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est constituée de deux membranes, soit la membrane externe et la membrane cytoplasmique, séparées par un espace périplasmique qui contient une couche de peptidoglycane (PG). La membrane externe est composée d'un feuillet interne de phospholipides et d'un feuillet externe de lipopolysaccharides (LPS); également connu sous le nom d'endotoxine. La membrane cytoplasmique se compose d'une bicouche phospholipidique

qui sert de barrière électrochimique. Le périplasme est un environnement oxydatif qui favorise le repliement des protéines. Le PG du périplasme donne aux bactéries leur forme et il leur confère une protection contre la pression et les changements osmotiques. Les protéines de l'enveloppe sont soit solubles (protéines périplasmiques), soit associées à la membrane, comme partie intégrante ou ancrées à la membrane par l'intermédiaire de lipides (lipoprotéines) liés de manière covalente (Silhavy et al., 2010).

Pour la plupart des bactéries à coloration Gram négatif, la stabilité de l'enveloppe résulte de ses différentes liaisons: le lien covalent de la lipoprotéine de Braun (Lpp) dans la partie externe membranaire avec le PG; le lien non-covalent entre le PG et la protéine A (OmpA), qui est une porine de la membrane externe, et les liens non-covalents entre le PG et le complexe Tol -Pal (lipoprotéine associée au peptidoglycane) (Voir figure 1) (Schwechheimer et Kuehn, 2015).

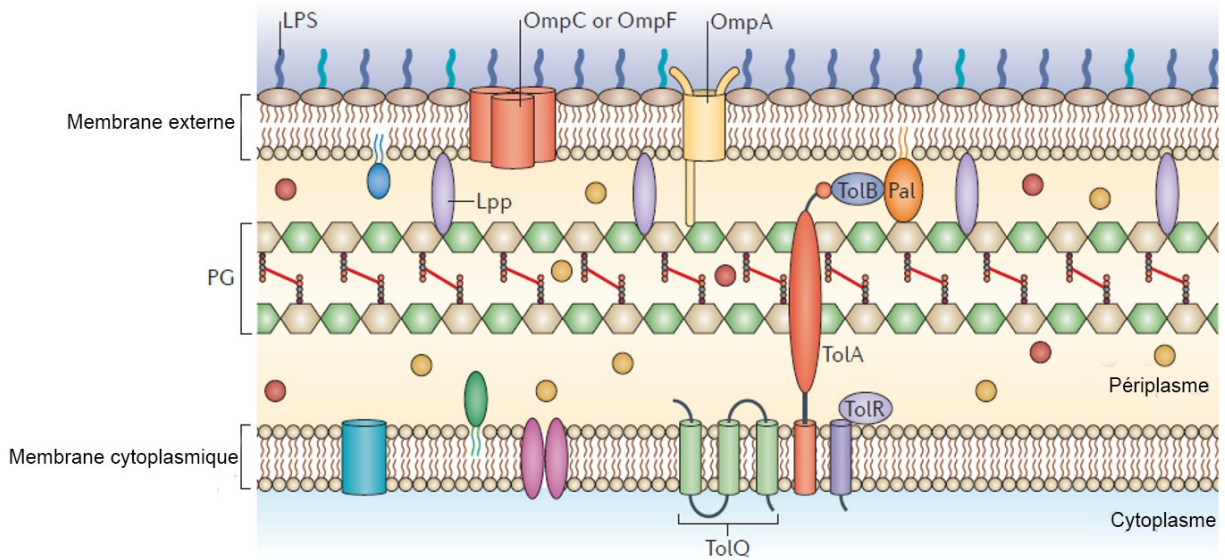


Figure 1 Composition de l'enveloppe des bactéries à coloration Gram négatif.

Figure modifiée à partir de (Schwechheimer et Kuehn, 2015). L'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif est constituée de deux membranes, la membrane externe et la membrane cytoplasmique. La membrane cytoplasmique est composée d'une double couche de phospholipides, alors que la membrane externe comprend un feuillet interne de phospholipides et un feuillet externe de lipopolysaccharides (LPS). Entre les deux membranes se trouve l'espace périplasmique, qui contient le peptidoglycane (PG) et des protéines périplasmiques. Les protéines de l'enveloppe peuvent être solubles, périplasmiques (sphères oranges et rouges), protéines transmembranaires (ovales roses et cylindre bleu) ou protéines ancrées dans le feuillet lipidique par des liaisons covalentes (lipoprotéines; ovales vertes et bleues). La stabilité de l'enveloppe est assurée par diverses liaisons transversales: une liaison covalente de la lipoprotéine de Braun (Lpp) dans la membrane externe avec le PG; les interactions non covalentes entre le PG et la OmpA; et les interactions non-covalentes entre le PG et le complexe Tol-Pal, qui est composé de cinq protéines: TolA, TolB, TolQ, TolR et Pal (peptidoglycan-associated lipoprotein : lipoprotéines associées au peptidoglycane).

Les VEMB ne sont pas le produit de la dégradation ou de l'instabilité de la membrane externe (ME) (McBroom, Johnson, Vemulapalli et Kuehn, 2006). Elles sont produites (vésiculation) pendant toutes les phases de croissance de la bactérie, mais leur production est maximale pendant la phase exponentielle de croissance (Kulp et Kuehn, 2010).

Les niveaux de vésiculation peuvent être altérés par différents facteurs tels que la température (Katsui et al., 1982), la disponibilité des nutriments (Kulp et Kuehn, 2010), l'oxydation, le quorum sensing (Collins, 2011) et la présence d'antibiotiques qui affectent la synthèse de la paroi bactérienne (tels que la gentamicine)(Manning et Kuehn, 2011).

À ce jour, aucune condition de croissance et aucune mutation, n'ont pu être identifiées qui puissent inhiber la production des VEMB (Kulp et Kuehn, 2010).

1.2.2 Rôle des VEMB

Les VEMB ont divers rôles; elles font partie de l'arsenal de transport et du système de survie de la bactérie (Collins, 2011). Elles participent à plusieurs processus normaux de la bactérie.

1.2.2.1 Mécanisme de sécrétion et de transport

Les VEMB permettent la libération de lipides, de protéines hydrophobes ancrées à la ME et d'autres composants insolubles de la bactérie. Par exemple *Porphyromonas gingivalis* libère, via les VEMB, des protéines de la ME appelées adhésines qui contribuent à la formation de la plaque dentaire (Inagaki, Onishi, Kuramitsu et Sharma, 2006). Les VEMB libèrent des molécules solubles qui leur sont associées, de façon telle que ces molécules restent protégées. Ainsi des molécules peu stables ou sensibles aux protéases peuvent alors rester intactes dans l'espace extracellulaire, par exemple c'est le cas pour quelques toxines, ex. toxine thermosensible (LT) d'*E. Coli* ETEC (Kesty, Mason, Reedy, Miller et Kuehn, 2004). Elles

peuvent aussi transporter des facteurs de virulence à des bactéries adjacentes ou à de cellules eucaryotes (Yoon, Ansong, Adkins et Heffron, 2011).

Ces vésicules peuvent transporter du contenu génétique (ADN et ARN) entre espèces bactériennes. Des études ont montré que des VEMB de *Escherichia coli* O157:H7 ont aidé au transfert de gènes associés à la virulence, vers de bactéries réceptrices telles que SE ou *E.coli* JM109, ce qui a augmenté la pathogénie de ces bactéries (Yaron, Kolling, Simon et Matthews, 2000).

Les VEMB non seulement facilitent la diffusion de facteurs pathogènes, mais elles permettent aussi la libération de ceux-ci de façon concentrée dans l'espace extracellulaire.

1.2.2.2 Défense et résistance

Des résultats d'études avec *E. coli* démontrent que les VEMB, représentent un mécanisme de défense face à des facteurs de stress agissant comme agresseurs de la membrane, par adsorption de composés extérieurs tels que des peptides antimicrobiens (Manning et Kuehn, 2011).

Des recherches ont montré que les VEMB sont impliquées dans la pathogénie de diverses bactéries, en produisant un effet lytique face à d'autres microorganismes (Kadurugamuwa et Beveridge, 1996). Les VEMB de *P. aeruginosa* contiennent des molécules qui facilitent l'élimination d'organismes compétiteurs (Mashburn et Whiteley, 2005).

1.2.2.3 Acquisition de nutriments

Plusieurs études ont montré que les VEMB contiennent des enzymes et des récepteurs qui peuvent contribuer à l'acquisition de nutriments pour la bactérie. Des enzymes comme une aminopeptidase de *P. aeruginosa* sont excrétées via les VEMB et elle peut ainsi se retrouver dans le milieu extracellulaire. Cela permet d'augmenter la concentration d'acides aminés

autour de la bactérie (Bauman et Kuehn, 2006; Vasilyeva, Tsfasman, Suzina, Stepnaya et Kulaev, 2008).

1.2.2.4 Communication cellulaire et formation de biofilm

Il est reconnu qu'aussi bien dans les environnements naturels qu'au cours des infections, les bactéries émettent des signaux chimiques pour communiquer et moduler l'expression de gènes spécifiques en réponse à ces signaux. Ces systèmes de détection du quorum («quorum sensing» QS) permettent aux bactéries de contrôler et coordonner leurs activités (Parsek et Greenberg, 2000).

Les VEMB permettent le mouvement des signaux dans le milieu extracellulaire. Par exemple, des molécules hydrophobes (exemple: 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) et 3-oxo-dodecanoyl homosérine lactone) de signalisation primaire «cellule-cellule», ont été retrouvées dans les VEMB de *P. aeruginosa* (Mashburn et Whiteley, 2005).

En outre, il est considéré que la plupart des bactéries forment des biofilms, lesquels sont définis comme des communautés de cellules adhérees à une surface et entourées d'une matrice polymérique extracellulaire qui leur est propre (Hall-Stoodley, Costerton et Stoodley, 2004).

Des VEMB ont été observées par microscopie électronique dans la matrice extracellulaire de biofilms extraits de différents milieux naturels. La présence des VEMB dans la formation de biofilms a été largement étudiée chez *P. aeruginosa*. Il a été déterminé que 52% du LPS présent dans les biofilms de *P. aeruginosa*, provient des VEMB qui sont totalement associées à la matrice des biofilms (Schooling et Beveridge, 2006).

Il a aussi été démontré qu'après l'ajout de VEMB à des cultures de *Helicobacter pylori*, la production de biofilms est stimulée (Yonezawa et al., 2009).

1.2.3 Biogénèse des VEMB

Le mécanisme de vésiculation n'est pas encore très clair. En principe, pour qu'une VEMB puisse se former, une protubérance apparaît dans la membrane externe bactérienne qui n'inclut pas le PG. Ainsi les VEMB se forment quand les lipoprotéines d'union entre la ME et le PG sont brisées ou manquantes (Ellis et Kuehn, 2010; Kulp et Kuehn, 2010). Cette protubérance se forme donc à partir de la couche sous-jacente du PG et la ME doit s'incurver vers l'extérieur jusqu'à ce qu'elle se fissure et qu'une vésicule se détache. Dans les cas où il y a rupture de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne due à la présence d'antibiotiques, les VEMB libérées peuvent contenir des fragments de PG et même des protéines de liaison entre ME et le PG (Kadurugamuwa et Beveridge, 1996).

Trois modèles de mécanisme de vésiculation sont actuellement proposés. Le premier modèle suggère que la formation des VEMB est due à la perte de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne, du fait que la ME se dilate plus rapidement que la couche sous-jacente de PG (Lee et al., 2008).

Le deuxième modèle propose qu'il y a une augmentation de la turgescence dans certains points de la ME, en raison de l'accumulation de protéines ou de molécules de PG qui produisent une courbure dans la membrane, induisant la formation de VEMB (Kadurugamuwa et Beveridge, 1995).

Le troisième modèle implique la molécule PQS, qui est une quinolone auto-inductrice du système de quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*; PQS déstabiliserait les ponts ioniques entre les ions Ca^{+2} et Mg^{+2} avec le LPS, en augmentant alors la répulsion anionique, ce qui stimulerait la libération de VEMB (Mashburn et Whiteley, 2005).

Pour expliquer la biogenèse des VEMB, il existe aussi des facteurs spécifiques au microorganisme, tels que la modulation des liaisons de l'enveloppe bactérienne, des lipides et des molécules de liaison de lipides (Voir figure 2).

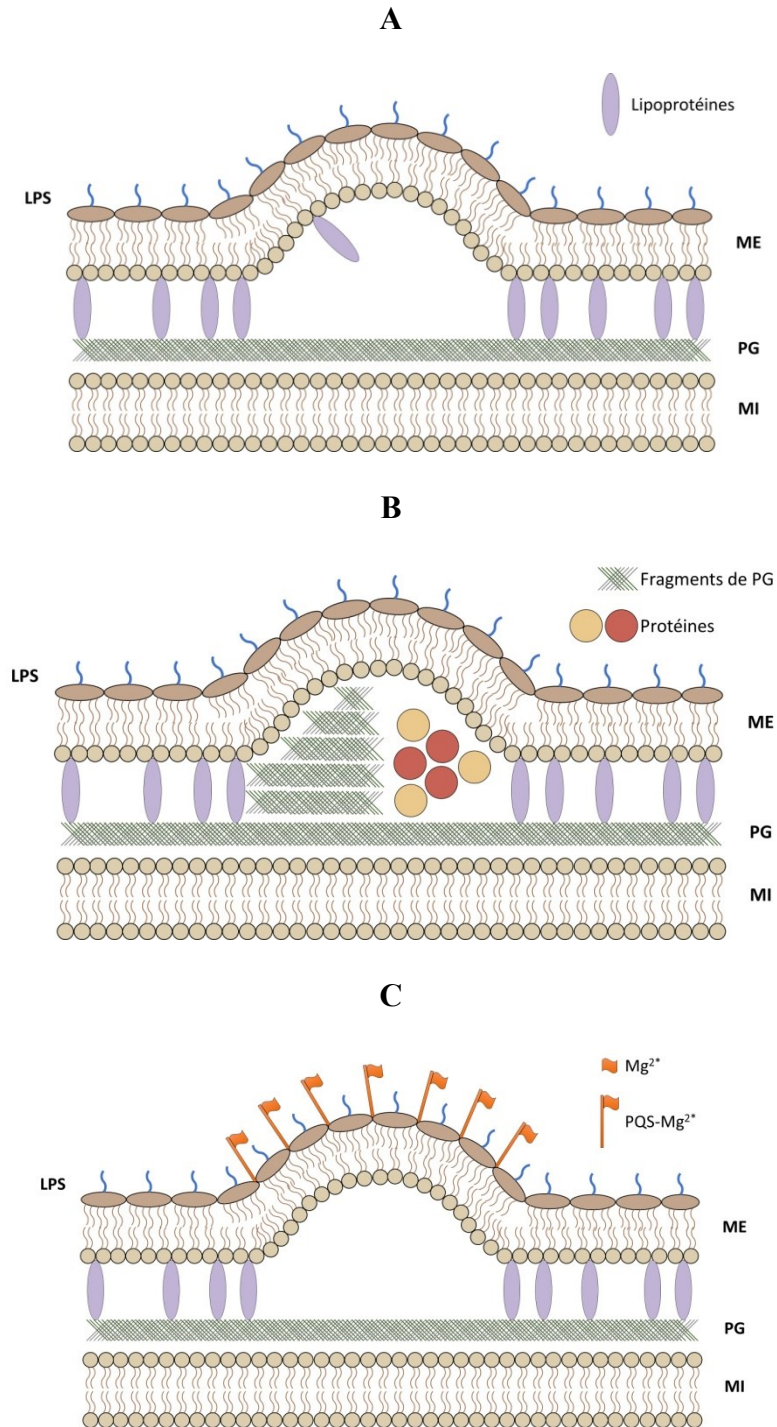


Figure 2 Modèles proposés pour la biogenèse des VEMB des bactéries à coloration Gram négatif. Figure modifiée à partir de (Lee et al., 2008). (A) Modèle 1 : Les VEMB sont libérées de régions spécifiques de la surface de la cellule où les lipoprotéines associées à des peptidoglycanes sont absentes en raison à l'expansion rapide de la membrane externe par

rapport à la couche sous-jacente de peptidoglycane. (B) Modèle 2 : Augmentation de la turgescence de la ME due à l'accumulation de protéines ou de fragments du PG qui causent un bourgeonnement de la membrane externe. Modèle 3: Dans la ME de *P. aeruginosa* PQS séquestre la charge positive de Mg^{+2} augmentant alors la répulsion anionique entre l'ion Mg^{+2} et le LPS, ce qui stimulerait la libération de VEMB.

1.2.3.1 Modulation des liaisons de l'enveloppe bactérienne

Des mutants dépourvus de la protéine A(OmpA) d'*E. coli*, *Salmonella* spp. et *Acinetobacter baumannii* voient leur production de VEMB augmenter, probablement suite à la diminution des liaisons entre le PG et la membrane externe (Schwechheimer et Kuehn, 2015).

Ce type de modulation des liaisons de l'enveloppe semblerait également conduire à une hypervésiculation chez des mutants de *P. aeruginosa* qui manquent d'OprF (une protéine homologue à OmpA). Dans ce cas, l'hypervésiculation serait la conséquence de l'augmentation des niveaux de PQS qui stimule la production de VEMB chez *P. aeruginosa* (Wessel, Liew, Kwon, Marcotte et Whiteley, 2013).

Schwechheimer et col. ont retrouvé de l'hypervésiculation, chez une souche d'*E. coli* mutante par l'absence de NlpI (NlpI est une lipoprotéine, ancrée à la membrane externe, qui a été associée à la division cellulaire, mais sa fonction précise n'a pas encore été déterminée). En l'absence de NlpI, la bactérie semble augmenter la synthèse de PG et diminuer les liaisons entre Lpp et PG, ce qui semble augmenter la production de VEMB (Schwechheimer, Rodriguez et Kuehn, 2015). En revanche, la perte des liaisons peptidiques DAP-DAP (DAP:acide diaminopimélique) a augmenté les niveaux de liaisons Lpp-PG et cela semble avoir entraîné un hypovésiculation (Schwechheimer, Kulp et Kuehn, 2014).

Bien que Lpp semble jouer un rôle crucial dans la régulation de la biogenèse des VEMB, il a été démontré que dans les cas d'hypervésiculation chez *E. coli*, il n'y avait pas toujours des

variations dans la quantité totale de liaisons Lpp-PG. Les résultats suggèrent qu'il existe une deuxième voie pour la biogénèse des VEMB dans laquelle la production des VEMB est indépendante du niveau total des liaisons Lpp-PG (Schwechheimer et Kuehn, 2015).

1.2.3.2 Lipides et molécules de liaison de lipides

Les caractéristiques biophysiques des lipides déterminent la fluidité et la plasticité de la membrane plasmique, il est donc probable que les lipides jouent un rôle clé dans la biogénèse des VEMB. Toutefois, l'identification du rôle des lipides dans la production des VEMB est compliquée par les défis techniques qui se présentent lors des études *in vitro*.

Cependant, lorsque la teneur en lipides de la membrane externe est altérée par des modifications génétiques, il y a un effet indirect considérable de la composition et des propriétés biophysiques de la membrane et des protéines associées à la membrane (Schwechheimer et Kuehn, 2015).

En particulier, les différences dans la production de VEMB dépendantes de la température sont susceptibles de refléter la modulation de la dynamique des lipides dans la membrane, mais ces effets sont spécifiques à certaines espèces. Chez *E. coli*, lorsque la température augmente, la vésiculation est augmentée (McBroom et Kuehn, 2007), tandis que chez *Bartonella henselae*, des températures plus basses favorisent la production de VEMB (Roden, Wells, Chomel, Kasten et Koehler, 2012).

L'implication de certains types de lipides dans la biogénèse de VEMB a été proposée sur la base de leur contenu dans les VEMB. Par exemple, chez *Pseudomonas syringae*, des acides gras ont été fréquemment retrouvés dans les VEMB qui ont le même nombre de carbones que ceux trouvés dans la membrane de la bactérie, lesquels représentent 80% des acides gras des VEMB. Ceci est en accord avec l'hypothèse que l'augmentation de la flexibilité de la

membrane, à partir de zones riches en ces lipides, peut avoir un rôle dans la biogenèse de VMEB (Chowdhury et Jagannadham, 2013). Cependant, la présence de ces acides gras insaturés à chaîne ramifiée dans les VEMB de *P. syringae*, suggère que ces lipides qui augmentent la fluidité de la membrane seraient éliminés via la production de VEMB (Kulkarni, Swamy Ch et Jagannadham, 2014).

De plus, certains sous-types de LPS pourraient influencer directement ou indirectement la courbure de la membrane externe ainsi que la composition des VEMB. À ce jour, chez *P. aeruginosa*, deux sous-types de LPS peuvent être retrouvés: une forme neutre et une forme de polysaccharide chargé, qui ont été aussi trouvés dans les VEMB (Li, Clarke et Beveridge, 1996). Les altérations du LPS affectent à la fois la taille et le profil protéique de VEMB de *P. aeruginosa*. Les cellules qui expriment seulement le LPS neutre produisent des VEMB plus petites, avec une composition protéique qui diffère davantage du type sauvage, que celle des VEMB produites par des cellules qui expriment seulement le LPS chargé (Murphy et al., 2014).

1.3 Les VEMB comme plateforme vaccinale

Les VEMB sont des candidates intéressantes pour être utilisées comme plateforme vaccinale et ce, grâce à leurs caractéristiques et à leurs propriétés immunogènes. En effet, ces vésicules ont la capacité d'être absorbées par des cellules de mammifères et peuvent agir comme auto-adjuvant (Collins, 2011). Ces qualités d'ailleurs ont été exploitées avec succès lors du développement d'un vaccin VEMB contre le sérotype B de *Neisseria meningitidis* chez les humains. Ce vaccin s'est ainsi révélé être un vaccin sécuritaire et efficace pour contrôler des épidémies provoquées par *N. meningitidis* de sérotypes B et C. Plus de 55 millions de doses

ont été administrées, par voie parentérale, dans 15 pays entre 1990 et 2006 (Sotolongo et al., 2007).

Plusieurs autres études ont démontré que les VEMB sont de candidates prometteuses pour des vaccins. Par exemple, l'efficacité des VEMB de *Bordetella pertussis* a été démontrée comme immunogène protecteur, contre la coqueluche dans un modèle souris (Asensio et al., 2011). Également, un effet protecteur a été observé lors d'une immunisation avec les VEMB chez des poissons plats, qui ont alors montré un meilleur taux de survie contre les infections à *Edwardsiella tarda* (Park et al., 2011). De plus, dans un modèle souris, après administration intramusculaire de VEMB de *Brucella melitensis*, les animaux ont été capables de surmonter l'infection par une souche pathogène de *B. melitensis* comparativement à un groupe non immunisé (Avila-Calderon et al., 2012). Plus récemment, en 2014, un brevet a été déposé pour un vaccin de VEMB, d'administration orale et/ou intranasale, qui confère une protection contre les infections causées par les membres de la famille *Pasteurellaceae* chez l'humain et chez les animaux (Schild, Roier et Reidl, 2014).

1.4 Les VEMB et *Salmonella*

Plusieurs études des VEMB de *Salmonella* ont montré qu'elles contribuent à la pathogénie de la bactérie, et que ces vésicules ont la capacité d'être reconnues par des cellules T et de stimuler la production de cytokines.

Les VEMB de *Salmonella* Typhimurium sont considérées comme des facsimilés, ayant de propriétés pro-inflammatoires et immunogènes, de la bactérie dont elles proviennent (Alaniz et al., 2007).

Lors d'analyses du profil protéique de *Salmonella* Typhimurium, un total de 245 protéines associées aux VEMB ont été trouvées (Bai, Kim, Ryu et Yoon, 2014).

Des études qui envisagent d'utiliser les VEMB de *Salmonella* en vaccination, ont exposé que les vésicules de *Salmonella* Typhimurium activent puissamment les cellules dendritiques, et stimulent l'immunité protectrice *in vivo* chez la souris, et que des facteurs de virulence de *Salmonella* Typhimurium ont été transférés via des VEMB aux macrophages de la souris (Yoon et al., 2011).

Des chercheurs ont démontré que les VEMB de *Salmonella* Typhimurium stimulent les cellules T CD4⁺ et les récepteurs de type Toll (TLRs) de souris, suite à une infection avec cette bactérie (Bergman et al., 2005).

Ochoa-Reparaz et col. ont observé une réponse immunitaire humorale chez des poules, infectées naturellement par *Salmonella* Enteritidis, contre les protéines de membrane externe et d'autres antigènes structurels de surface, dont les VEMB (Ochoa-Reparaz et al., 2004).

Les études ci-haut mentionnées, suggèrent qu'une réponse immunitaire innée aux VEMB pourrait résulter de la combinaison de motifs PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) reconnus dans leur contexte naturel où les VEMB agissent comme protéoliposomes. On peut se questionner quant au risque que pourrait poser le LPS contenu dans les VEMB si celles-ci sont utilisées comme vaccin. Tout d'abord, il semblerait que la composition des LPS des VEMB n'est pas nécessairement similaire au LPS bactérien dont il provient. Chez *N. meningitidis* il a été estimé que le LPS lié à la membrane est cent fois moins toxique que le LPS libre (Tsai, Frasch, Rivera et Hochstein, 1989). Il a aussi été démontré qu'il est possible de réduire substantiellement (près de cinq fois) le contenu en LPS des VEMB par l'utilisation d'une méthode d'extraction par détergent (déoxicholate) (Holst et al., 2009).

L'objectif du projet auquel appartient cette maîtrise est de tester une preuve de concept, soit le développement d'un vaccin contre SE, à base de VEMB, pour administration orale et pour utilisation chez le poulet de chair.

Pour débiter le projet, il fallait mettre au point une standardisation rigoureuse d'un protocole de production et de purification des VEMB afin que le produit final soit reproductible. Cet objectif a été le fil conducteur du projet de maîtrise.

2. Méthodologie

2.1 Production et isolement des VEMB

La souche utilisée a été *Salmonella* Enteritidis SHY-04-1540 (SE) isolée d'un cas clinique du Laboratoire d'épidémiologie animale du Québec. La Chaire en recherche avicole s'est par ailleurs servi de cette souche et de son potentiel pathogène pour identifier et caractériser des protéines immunogènes de *Salmonella* telles que la GAPDH (Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), l'enolase, la LpdA (Lipoamide dehydrogenase), la Dps (*DNA protection during starvation protein*) et EF-Tu (Elongation factor-Tu) (Cui, 2013; Tran, 2010).

Afin d'identifier les diverses phases de croissance de la souche, nous avons établi des courbes de croissance par densité optique: population viable en fonction du temps (Augustin, 2005), dans trois différentes conditions de culture de la bactérie.

Trois protocoles ont ainsi été évalués pour la production des VEMB, selon les conditions suivantes: conditions normales de croissance et conditions de stress, en considérant qu'il est rapporté dans la littérature que la production des VEMB est augmentée dans des conditions de stress (Collins, 2011; Lee et al., 2008; Schwechheimer et Kuehn, 2015). Les conditions de stress étaient: la croissance dans un milieu contenant un antibiotique (Alaniz et al., 2007) et la croissance en milieu minimal acide (Yoon, McDermott, Porwollik, McClelland et Heffron, 2009).

2.1.1 Production des VEMB dans des conditions normales de croissance bactérienne

À partir d'une gélose sang, trois colonies de la souche, SE SHY-04-1540, ont été transférées dans 10mL de milieu LB (extrait de levure 5g, peptones de caséine 10g, chlorure de sodium

10g, pH7.0) (Fisher, Cat.#1426-500), cette suspension a été incubée 18h à 37°C sous agitation à 150 RPM (Incubateur ThermoScientific MAXQ4000). Cinq mL de cette culture ont été transférés dans 500 mL de milieu LB et incubés à 37°C sous agitation à 150 RPM. La lecture de la densité optique (DO) a été suivie pendant plus de 12h, à intervalles de 30 min. À chaque prise de DO (à 600 nm), des décomptes bactériens ont été faits afin de procéder au calcul de la population bactérienne viable. Une fois établie la courbe de croissance, nous avons laissé pousser les cultures jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance pour procéder au retrait des cellules bactériennes par centrifugation, récupérer le surnageant et continuer avec l'étape de purification des VEMB.

2.1.2 Production des VEMB en conditions de stress

2.1.2.1 Croissance en présence d'antibiotique

Pour la production des VEMB en conditions de stress par l'ajout d'antibiotique, le milieu de culture Trypticase soya broth (TSB) (Cat.BD#211825) a été utilisé dans le but de reproduire le protocole d'Alaniz et Deatherage, avec la souche *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (ST). Ce protocole a été utilisé comme contrôle de notre méthode de production de VEMB.

Afin d'identifier les phases de croissance des souches SE SHY-04-1540 et ST ATCC 14028 dans le milieu TSB, des courbes de croissance ont été faites et suivies, par la lecture de DO et de décomptes de population viable et ce, pendant 8 heures.

Conformément au protocole d'Alaniz, les cultures bactériennes (500mL de milieu TSB) des souches SE SHY-04-1540 et ST ATCC#14028 ont été stimulées à produire davantage de VMEB, par ajout de gentamicine au milieu de la phase exponentielle de croissance, à une concentration finale de 50µg/ml pendant 30 minutes et immédiatement après cette étape, les cellules bactériennes ont été enlevées par centrifugation (Alaniz et al., 2007).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la gentamicine a été calculée par la méthode de microplaque (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) pour la souche SE SHY-04-1540 ainsi que pour ST ATCC 14028 afin de connaître le rapport entre la dose stimulante de gentamicine à administrer pour augmenter la production de VMEB et la CMI des souches en question.

2.1.2.2 Croissance bactérienne en milieu minimal

La deuxième méthode de condition de stress a été appliquée en faisant croître la souche SE SHY-04-1540 dans le milieu minimal acide AMM (acid minimal media) (Yoon et al., 2011). À cet effet, une courbe de croissance de SE SHY-04-1540, dans le milieu AMM, a été établie afin d'identifier la phase exponentielle de croissance pour isoler les VEMB.

Dans les trois conditions (conditions de stress et condition normale de croissance) les cellules bactériennes ont été enlevées par centrifugation (Rotor F12 Sorvall™, 6000 x g, 60min, 4°C). Le surnageant a été filtré sur 0.2 µm (ThermoScientific™ Cat. #5954520) puis concentré par ultrafiltration sur membrane de cellulose de « cut-off » de 100kDa (EMD Millipore Ultracel™ Ultrafiltration Disc Cat. #PLHK07610) dans une cellule à agitation (8400 AMICON™). Les VMEB ont été isolées par ultracentrifugation (Rotor SW32 Ti, Beckman Coulter™, 132952 g pendant 120 min à 4°C). Après ultracentrifugation, le surnageant a été délicatement aspiré pour laisser les VEMB dans un volume de ±1mL.

2.2 Purification des VEMB

Afin d'éviter toute complication inhérente à l'utilisation d'agents stresseurs (difficulté à contrôler l'impact de l'agent stressant sur la composition des VEMB), il a été décidé de produire les VMEB suivant des conditions normales de croissance bactérienne. Après

identification des phases de croissance de SE SHY-04-1540, les VEMB ont été isolées à partir d'un surnageant provenant d'une culture en fin de phase exponentielle. La purification des VMEB a été faite sur gradient de densité «OptiPrep» (iodixanol) (Sigma Cat. # D1556), suivant la méthode de Muralinath et col (Muralinath, Kuehn, Roland et Curtiss, 2011). Le gradient de densité étant basé sur la séparation des particules en suspension selon leur densité de flottaison.

Brièvement, différentes concentrations d'Optiprep (préparées avec 30mM HEPES 0,85%NaCl pH 7.4) ont été ajoutées sur une phase à 45% correspondant à 3mL de VEMB ajoutés à 9mL d'OptiPrep 60%. Les solutions d'OptiPrep ont été ajoutées dans l'ordre suivant : 40%, 30%, 28%, 26%, 24%, à raison de 1mL de chaque concentration (Voir figure 3). Le gradient contenant les VEMB a été ultracentrifugé (Rotor SW32.1 Ti, Beckman Coulter™, 149648 g pendant 20hrs à une température de 4°C).

Les fractions de 1mL ont par la suite été récupérées pour procéder à l'observation en microscopie électronique.

Figure 3. Gradient de densité OptiPrep™

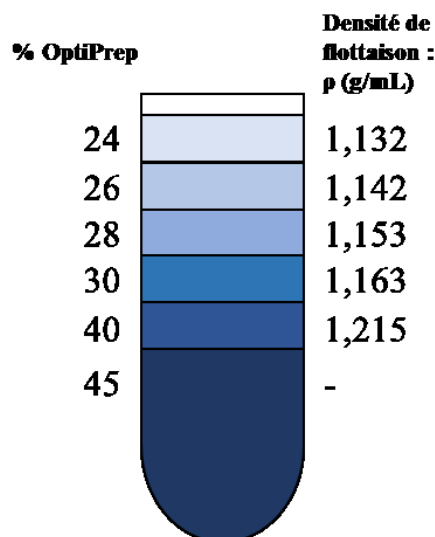
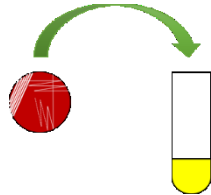


Figure 4. Schéma général du protocole de production, d'isolement et de purification des VEMB



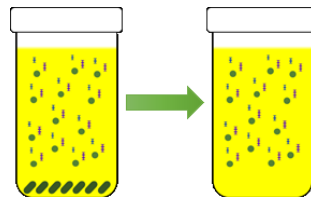
1. Ensemencement de trois colonies de la souche dans 10mL de milieu LB. Incubation 18h à 37°C.



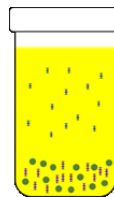
2. Transfer de 5mL de la culture initiale dans 500mL de milieu LB. Incubation entre 5h et 6h jusqu'à obtention d'une densité optique de 1.2.



3. Séparation des cellules bactériennes par centrifugation (6500 g 60 min à 4°C) afin de récupérer le surnageant et le filtrer à 0,2µm.

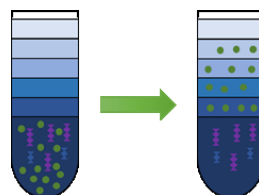


4. Ultracentrifugation du surnageant (132952 g 120 min à 4°C) afin de faire l'isolement des VEMB dans le culot.



5. Préparation d'un gradient de densité, pour séparer les VEMB des impuretés (protéines sécrétées, débris bactériens, etc). Le culot contenant les VEMB (1mL) est mis dans un tube avec 3mL de milieu Optiprep 60% afin d'obtenir une fraction à une concentration de 45% d'optiprep et procéder à l'ajout des autres concentrations d'optiprep (40%, 30%, 28%, 26%, 24%) et ultracentrifugation (149648 g 20h à 4°C)

6. Récupération des fractions contenant les VEMB, puis pool et lavage dans du PBS (149648 g 3h à 4°C)



2.3 Caractérisation des VEMB

2.3.1 Observation des VEMB par Microscopie électronique à transmission (MET)

Trois observations au MET, par coloration négative avec PTA (acide phosphotungstique) ont été faites sur 3 préparations de VEMB successivement. La coloration négative consiste à imprégner l'échantillon d'un corps chimique opaque aux électrons, ce qui permettra d'observer les structures d'intérêt en clair par simple contraste.

Brièvement, 10 μ L de la suspension des VEMB ont été déposés sur une grille formvar-carbone pour 5 à 10 min. La suspension a ensuite été retirée à l'aide d'un papier filtre et la grille a été lavée 3 fois avec de l'eau bi-distillée, puis l'excédent d'eau a été retiré avec un papier filtre. Dix microlitres de PTA 2% dans de l'eau bi-distillée, pH 7.2 ont été ajoutés et l'excédent retiré avec du papier filtre. La grille a été laissée à sécher pendant la nuit avant l'observation au microscope électronique (Phillips CM100, du département de Pathologie et Biologie Cellulaire de l'Université de Montréal).

La première observation a été faite à l'étape suivant la première ultracentrifugation (Voir figure 4) pour confirmer la présence des VEMB avant de passer à l'étape de purification par gradient de densité. La deuxième observation des particules a été faite sur chaque fraction du gradient de densité, afin d'identifier les fractions les plus riches en contenu de VEMB.

Finalement, la troisième observation au MET a été faite pour confirmer la reproductibilité du protocole de purification. Une fois identifiées, les fractions contenant des VEMB ont été poolées et lavées, avec un volume de \pm 37 mL du PBS, puis récupérées par ultracentrifugation (Rotor SW32 Ti, Beckman CoulterTM, 149648 g durant 90min à 4°C) puis conservées à une température de 4°C.

2.3.2 Quantification des VEMB

Le contenu en protéines des VMEB a été estimé avec le kit Thermoscientific Pierce™ BCA (Cat.#23227), en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard.

Cette méthode combine la réduction du Cu^{+2} en Cu^{+1} par les protéines en milieu alcalin (Réaction de biuret) avec la détection colorimétrique très sensible et sélective du cation cuivreux (Cu^{+1}) en utilisant un réactif spécifique qui est l'acide bicinchoninique (bicinchoninic acid BCA). Une réaction de couleur violette se produit par la chélation d'un ion cuivreux (Cu^{+1}) par deux molécules de BCA et ce complexe possède une forte absorbance à 562nm.

Afin de comparer le profil protéique des VEMB à celui de lysat de cellules entières, et de protéines de ME, nous avons procédé aux extractions décrites ci-après:

2.3.3 Extraction des protéines totales de *Salmonella* Enteritidis SHY 04 1540

Les protéines totales ont été extraites suivant le protocole modifié de Chart (Chart, 1994a). Une culture (450 mL de milieu LB) de SE SHY 04 1540 a été incubée à 37°C sous agitation, 150 RPM. Après 18hrs, la culture a été centrifugée (Rotor GH 3.8 Beckman Coulter™, 3293 g pendant 45 min à 4°C) dans le but d'isoler les cellules bactériennes. Chaque culot provenant de 150 mL de culture a été resuspendu dans 5 mL de tampon (25mM Tris-HCl, pH 7.4 1mM EDTA-Na). Les bactéries ont été brisées par sonication (Sonicateur Fisher scientific FB120) à 0°C (dans la glace) 120W, 100% d'amplitude, avec des intervalles de 30 sec pour un temps total de 3min de sonication.

Une fois les cellules brisées, 20 mL de tampon (25mM Tris-HCl, pH 7.4) ont été ajoutés à chaque 5 mL de cellules brisées provenant de 150 mL de culture. Une centrifugation a suivi

(Rotor GH 3.8 Beckman Coulter™, 3293 g, pendant 50 min à 4°C) pour enlever les bactéries demeurées intactes et récupérer le surnageant (\pm 60 mL) contenant les protéines totales de SE SHY-04-1540. Le contenu en protéines de ce surnageant a été quantifié avec le kit Pierce™ BCA (Cat: #23227)

2.3.4 Extraction des protéines de membrane externe de *Salmonella* Enteritidis SHY 04 1540

L'extraction des protéines externes de membrane bactérienne a été réalisée par une méthode adaptée de deux références, soit Dubreuil et col 1988 (Dubreuil et al., 1988) et Arockiasamy et col (Arockiasamy et Krishnaswamy, 2000). Brièvement, une culture d'un litre de SE SHY 04 1540 dans du milieu LB (Fisher, Cat.#1426-500), incubée 18 h à 37°C sous agitation 150 RPM, a été utilisée pour obtenir des cellules bactériennes par centrifugation (Rotor TX-400 Sorvall Legend X1/X1R, 2400 g, pendant 20 min à 4°C). Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec 20 mL de PBS (Rotor TX-400 Sorvall Legend X1/X1R, 2400 g pendant 20 min à 4°C).

Le poids des cellules lavées a été déterminé et un tampon glycine ajouté (0.2M glycine, pH2.2 sous agitation 200 RPM pendant 20 min, à température ambiante) avec un ratio de 100 mL de tampon par 3g de cellules. Le tout a été centrifugé (Rotor SW32 Ti, Beckman Coulter™, 11766 g pendant 15 min à 4°C). Le surnageant contenant les protéines de membrane externe a été récupéré et ajusté à un pH de 7.0 avec du NaOH 1N puis filtré à 0.2 μ m. Un inhibiteur de sérine protéases à une concentration finale de 0.1mM a été ajouté et le tout agité 30 min à température ambiante. Une dialyse pendant 18 h, dans de l'eau distillée, avec changement d'eau 1 h et 12 h après le départ a par la suite été effectuée. Les protéines de membrane externe ont été lyophilisées et conservées à -20°C.

Le contenu protéique du lyophilisat a été quantifié à l'aide du kit Pierce™ BCA (Cat.# 23227) Tel qu'évoqué précédemment, le LPS étant un facteur important dans le rôle immunogène des VEMB, nous avons voulu quantifier le contenu en LPS des VEMB purifiées et comparer le profil de ce LPS avec celui de la bactérie. L'extraction du LPS de la bactérie et celle des VEMB ont été réalisés, selon de protocoles expliqués ci-après.

2.3.5 Extraction du lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe de *Salmonella* Enteritidis SHY 04 1540

Pour réaliser l'extraction du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe de la bactérie SE SHY 04 1540, le protocole adapté de Chart a été utilisé (Chart, 1994b).

Une suspension de ±60 mL de protéines totales telles que décrites préalablement au point 2.3.3 a été centrifugée (Rotor SW32 Ti, Beckman Coulter™, 45000 g pendant 60 min à 4°C) afin de sédimenter les enveloppes bactériennes et de les séparer des protéines cytoplasmiques. Vingt mL d'un tampon (25mM Tris-HCl, pH7.4) ont été ajoutés au culot obtenu.

Pour faire la solubilisation sélective des protéines de membrane interne, 20 µL de sarcosyl 20% (P/V) par mg de protéine (quantification des protéines faite à l'aide du ThermoScientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer, lecture à 280nm), ont été ajoutés aux enveloppes bactériennes, et le tout a été incubé 45 min sous agitation 200 RPM à température ambiante.

Afin de séparer les membranes externes, la suspension a été centrifugée (Rotor SW32 Ti, Beckman Coulter™, 45000 g, 60 min à 4°C) et le culot resuspendu dans 30 mL de 25mM Tris-HCl, pH7.4. Enfin, une deuxième centrifugation a été effectuée dans les mêmes conditions. Le culot a été conservé dans 600 µL du tampon (25mM Tris-HCl, pH7.4) et gardé à -20°C. Le lendemain, de l'eau ultrapure a été ajoutée jusqu'à compléter 5 mL. De la RNase et de la DNase (Sigma R4875 et DN25), à une concentration finale de 0.1 mg/mL chaque, ont

été ajoutées à la suspension contenant les membranes externes et le tout a été incubé 3 h à 37°C. Enfin, 1 mg de protéinase K (Fisher BP1700, 30 unités/mg) a été ajouté et le tout incubé pendant 120 min à 56-60°C sous agitation horizontale 100 RPM.

Par la suite, une purification avec le protocole phénol-eau de Westphal a été réalisée (Westphal, 1965).

En bref, l'extraction précédente a été mise dans 5 mL de phénol (préalablement chauffé à 68°C). Une incubation au bain-marie à 68°C pendant 15 min a suivi. Après refroidissement de ce mélange (extrait de membranes externes et phénol) sur la glace, celui-ci a été centrifugé (Rotor GH 3.8 Beckman Coulter™, 3293 g 45 min à 4°C).

Suite à la centrifugation et au refroidissement, trois phases sont obtenues: une phase aqueuse supérieure contenant le LPS, une phase intermédiaire constituée d'un résidu eau/phénol et une phase phénolique inférieure.

La phase aqueuse a été soigneusement prélevée, à l'aide d'une pipette Pasteur, sans toucher à l'interphase. Au reste de la phase phénolique nous avons ajouté 5 mL d'eau ultra pure, et une centrifugation a suivi (Rotor GH 3.8 Beckman Coulter™, 3293 g, 45 min à 4°C) pour récupérer la phase aqueuse.

Pour enlever la contamination de phénol, les 10 mL de phase aqueuse récupérés, ont été soumis à une dialyse pendant 24 h dans de l'eau ultra pure avec 5 changements d'eau (1, 2, 3, 18 et 24 h). Le LPS a été conservé à -20°C.

2.3.6 Extraction du LPS des VEMB de *Salmonella Enteritidis* SHY 04 1540

Pour extraire le LPS des VEMB, nous avons suivi la méthode phénol-eau décrite par Westphal (Westphal, 1965).

L'extraction a eu lieu à partir de 5 mL d'une suspension purifiée de VEMB, suspension provenant directement du gradient de densité, tel que réalisé au point 2.2. Cette suspension a été lavée dans l'eau et ultracentrifugée (Rotor SW32 Ti, Beckman Coulter™ 149648 g, 90 min, 4°C).

De la RNase et de la DNase (Sigma R4875 et DN25), à une concentration finale de 0.1 mg/mL, chaque, ont été ajoutées et le tout a été incubé 3 h à 37°C. Après l'incubation de la suspension avec la RNase et la DNase, 1 mg de protéinase K (Cat.Fisher #BP1700, 30 unités/mg) a été ajouté et le tout incubé pendant 120 min à 56-60°C sous agitation horizontale 100 RPM. Cette suspension des VEMB traitée avec les enzymes, tel que décrit ci-dessus, a été déposée sur 5 mL de phénol préalablement chauffé à 68°C et le même protocole que celui au point 2.3.5 a été suivi.

2.3.7 Quantification du LPS

La quantification du LPS a été réalisée en utilisant le «Purpald Assay» (Lee et Tsai, 1999). Cette méthode utilise l'oxydation de groupes vicinaux glycol terminaux du 2-kéto-3-déoxyoctonate (KDO) des molécules de LPS, avec conséquemment la libération de formaldéhyde. Le formaldéhyde est quantifié à 550nm par réaction avec le réactif de Purpald grâce à une oxydation avec le périodate de sodium (NaIO₄).

Nous avons adopté cette méthode et établi une courbe standard, en faisant des dilutions d'un LPS commercial de *Salmonella* Enteritidis de poids connu (Sigma #L6011) afin d'obtenir les concentrations suivantes: 3,9-7,8-11,0-31,0-62,5-125 et 250 ng/μL.

Pour finalement procéder aux comparaisons du profil protéique et de LPS des VEMB avec les protéines et le LPS de la bactérie, nous avons fait des électrophorèses de ces deux composants sur gel de polyacrylamide (PAGE).

2.3.8 Électrophorèses sur gel de polyacrylamide (PAGE)

2.3.8.1 Électrophorèses des protéines sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Les protéines totales des VEMB, ainsi que les protéines totales et de membranes externes de SE SHY-04-1540 ont été analysées par migration sur gel SDS avec le système Mini Protean III (PowerPac™Bio-Rad), gels 12.5% et 0.75 mm d'épaisseur avec une source d'alimentation électrique à 100V pendant 2h.

Les gels ont été colorés avec du nitrate d'argent en suivant le protocole de Sasse et Gallagher (Sasse et Gallagher, 2001).

2.3.8.2 Électrophorèses du LPS sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Le LPS des VEMB et de *Salmonella* Enteritidis SHY 04 1540 a été analysé avec le système Mini Protean III (PowerPac™Bio-Rad) gel 15% et 0.75 mm d'épaisseur avec une source d'alimentation électrique 150 V pendant 4h.

Les gels ont été colorés au nitrate d'argent en suivant le protocole de Sasse et Gallagher (Sasse et Gallagher, 2001).

3. Exposé et analyse des résultats

3.1 Production et isolement des VEMB

3.1.1 Production des VEMB dans des conditions normales de croissance

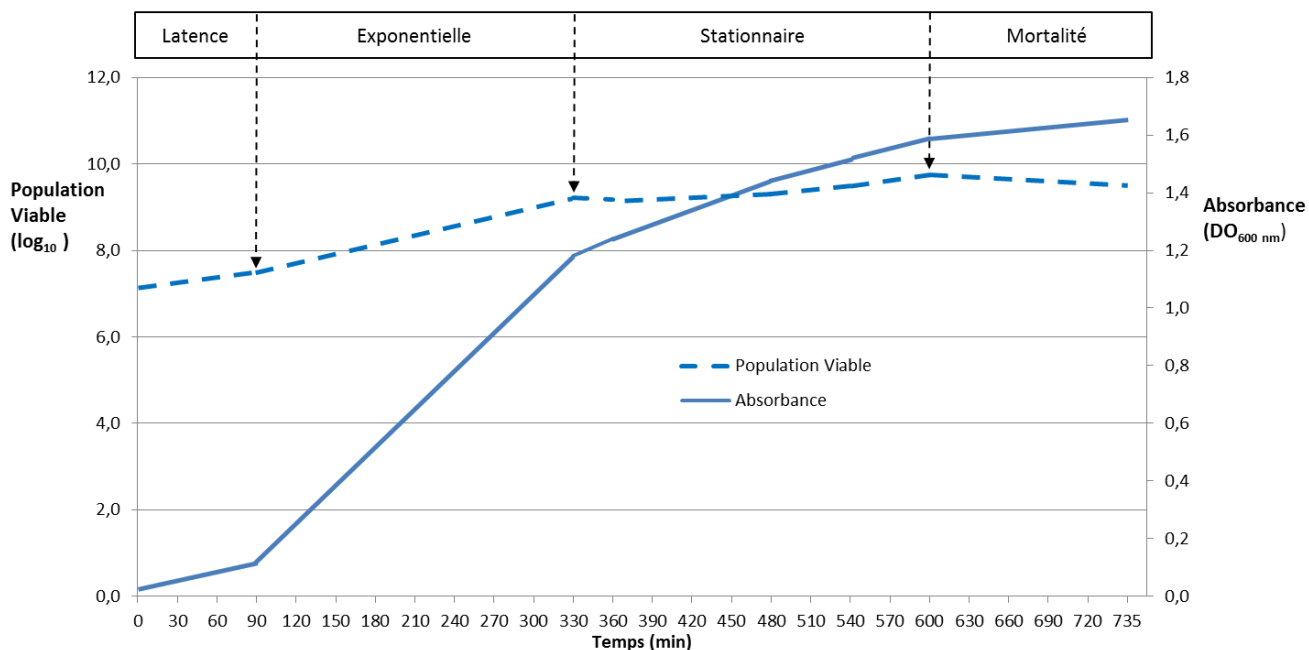
Les phases de croissance de SE ont été identifiées sur la courbe de croissance tracée : population bactérienne viable (logarithme décimal) en fonction du temps.

Un temps de croissance de 5 à 6 heures a été requis pour obtenir une DO de 1,2. Cette valeur a été considérée comme représentative de la fin de la phase exponentielle de croissance de la souche. (Voir Tableau II et Figure 5)

Tableau II. Données des courbes de croissance de *Salmonella* Enteritidis (SE) SHY-O4-1540 en conditions normales de croissance dans le milieu LB

<i>Salmonella</i> Enteritidis SHY041540		
Temps (min)	Conditions normales (LB)	
	Absorbance DO _{600nm}	Population viable (log ₁₀)
0	0,018	7,1
90	0,121	7,5
330	1,180	9,2
360	1,241	9,2
480	1,447	9,3
540	1,522	9,5
600	1,592	9,8
735	1,657	9,5

Figure 5. Courbe et phases de croissance de *Salmonella* Enteritidis (SE) SHY-O4-1540 en conditions normales dans le milieu LB.



3.1.2 Production des VEMB en conditions de stress

3.1.2.1 Ajout de gentamicine

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenus ont été de 0.250 et 0.400 $\mu\text{g/mL}$ pour SE SHY-04-1540 et ST ATCC 14028, respectivement. Selon ces résultats, la concentration de gentamicine qui a été ajoutée (50 $\mu\text{g/mL}$), au milieu de la phase exponentielle de croissance des souches, correspond respectivement à 200 fois la CMI de notre souche SE SHY-04-1540 et 125 fois celle de ST ATCC 14028.

Les phases de croissance des deux souches ont été identifiées sur la courbe de croissance tracée: DO en fonction de la population bactérienne viable (logarithme décimal). La gentamicine a été ajoutée au milieu de la phase exponentielle des deux souches. Ce moment a

été identifié autour de 150 minutes après le début de l'incubation lorsque la croissance de la souche a lieu dans du milieu TSB (Voir Tableau III et Figures 6 et 7).

Tableau III. Données des courbes de croissance de *Salmonella* Enteritidis (SE) SHY-04-1540 et *Salmonella* Typhimurium (ST) ATCC 14028 en conditions de croissance normales dans le milieu TSB

Temps (min)	<i>S. Enteritidis</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
	Absorbance DO _{600nm}	Population viable (log ₁₀)	Absorbance DO _{600nm}	Population viable (log ₁₀)
0	0,023	7,47	0,031	7,58
60	0,053	7,43	0,063	7,61
90	0,121	7,73	0,135	7,85
240	1,347	9,34	1,439	9,70
300	1,394	9,39	1,480	9,61
420	1,508	9,48	1,535	9,79
480	1,605	8,68	1,565	9,95

Figure 6. Courbe de croissance de *Salmonella* Enteritidis (SE) SHY-O4-1540 en conditions de croissance normales, dans le milieu TSB.

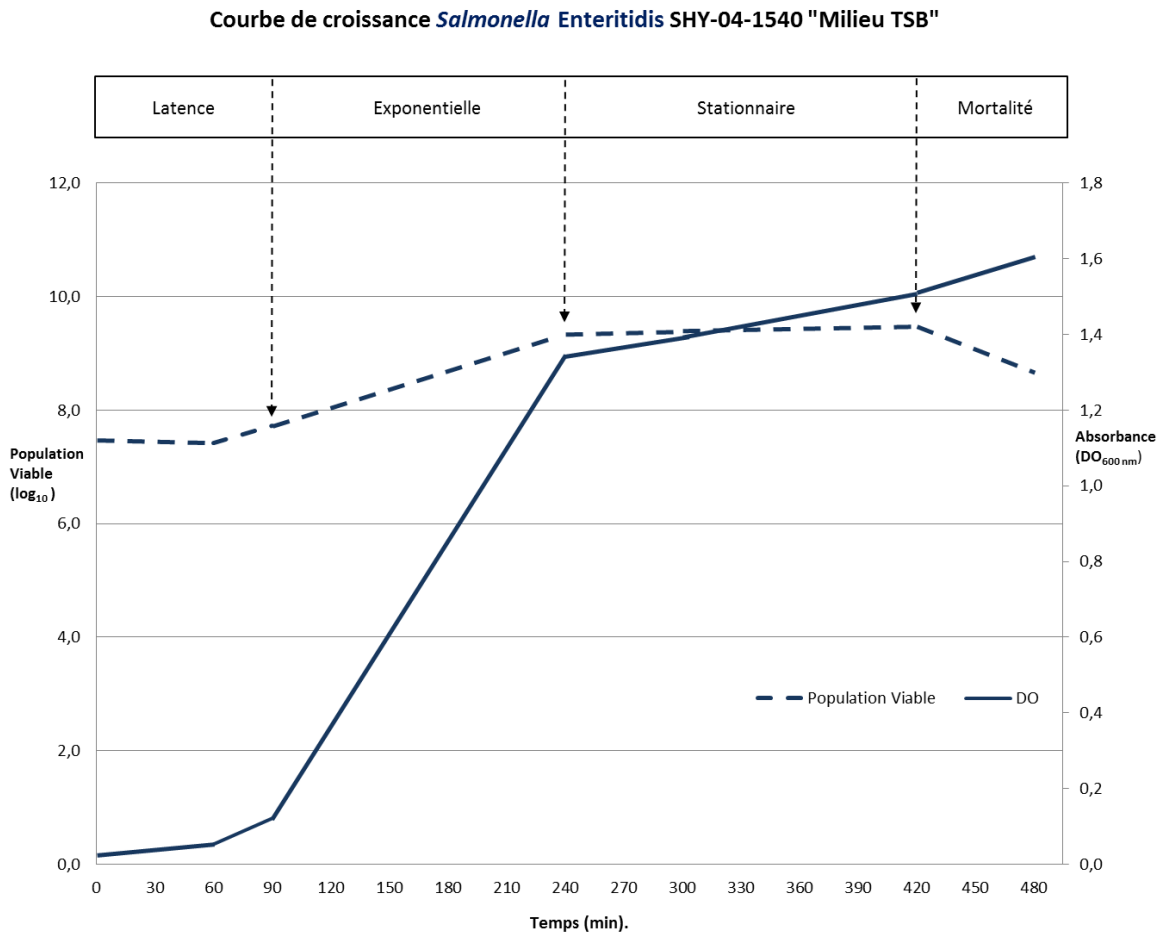
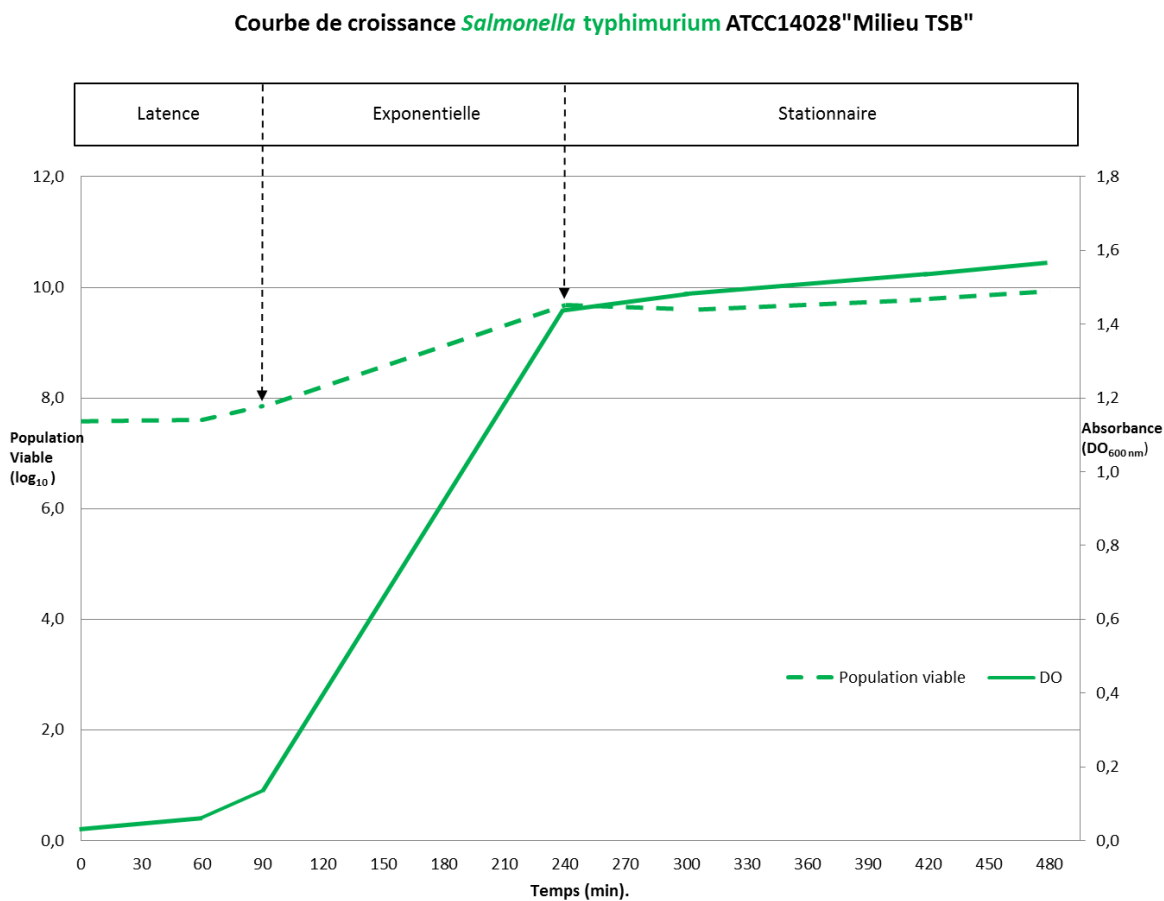


Figure 7. Courbe de croissance de *Salmonella* Typhimurium (ST) ATCC 14028 en conditions de croissance normales dans le milieu TSB.



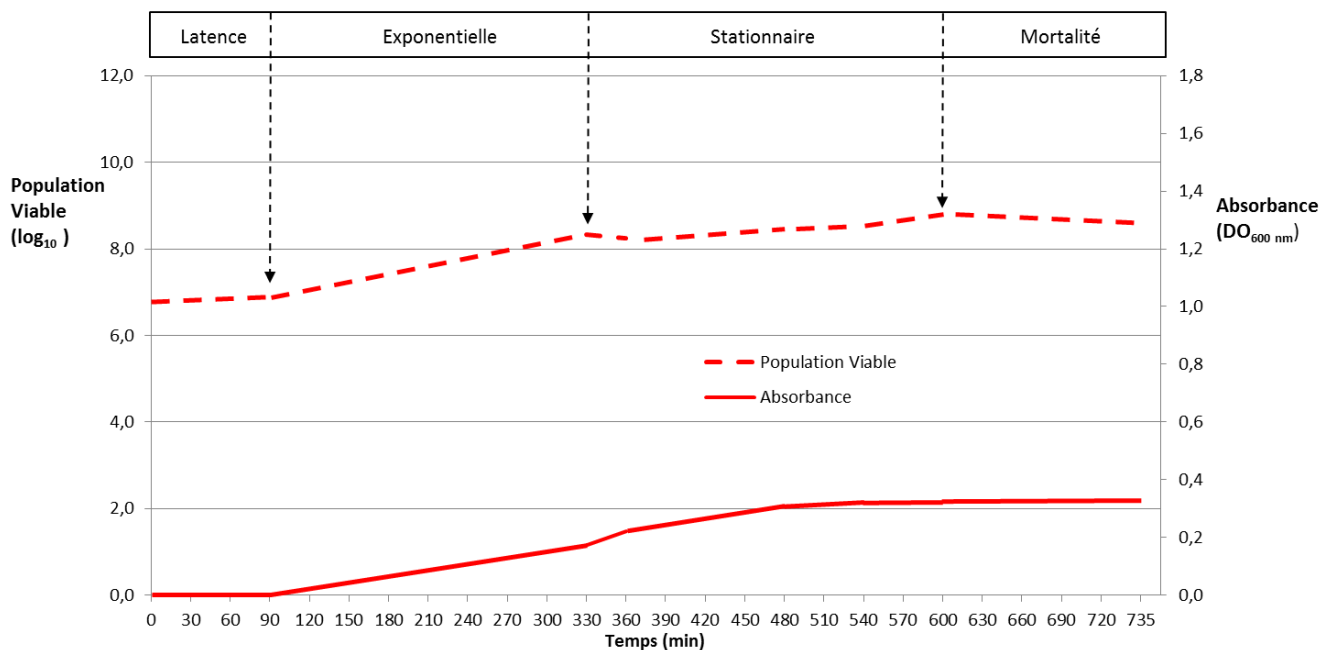
3.1.2.2 Croissance en milieu minimal

Les phases de croissance de la souche SE SHY-O4-1540 ont été identifiées aux mêmes temps que dans la courbe obtenue à partir du milieu de croissance LB, cependant la croissance de la souche s'avère mineure dans le milieu AMM (Voir Tableau IV et Figure 8).

Tableau IV. Données de la courbe de croissance de *Salmonella* Enteritidis (SE) SHY-04-1540 en conditions de croissance sous stress dans le milieu minimal acide (AMM)

Salmonella Enteritidis SHY041540		
Temps (min)	AMM	
	Absorbance DO_{600nm}	Population viable (log₁₀)
0	0,004	6,8
90	0,007	6,9
330	0,174	8,3
360	0,220	8,2
480	0,308	8,5
540	0,319	8,5
600	0,321	8,8
735	0,327	8,6

Figure 8. Courbe de croissance de *Salmonella* Enteritidis (SE) SHY-O4-1540 en conditions de croissance sous stress dans le milieu minimal acide (AMM)



3.2 Caractérisation des VEMB

3.2.1 Observation des VEMB par microscopie électronique à transmission (MET)

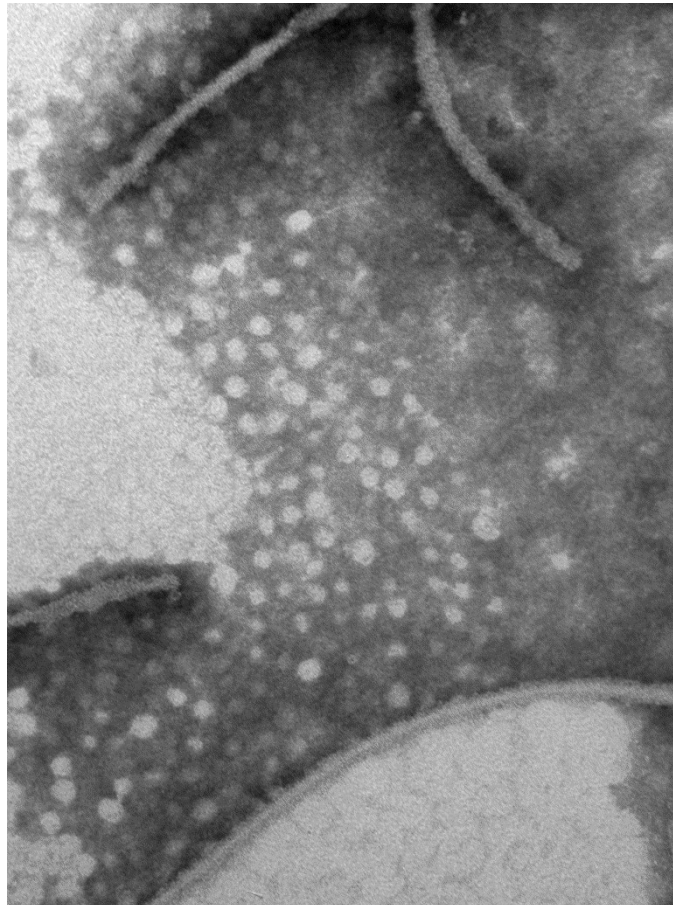
3.2.1.1 Observation MET des VEMB obtenues à partir des protocoles en conditions normales et sous stress, avant l'étape de purification sur gradient

L'objectif de cette observation était de démontrer la présence de VEMB produites par les bactéries en utilisant différents protocoles de production tels que :

- Croissance normale de SE SHY 041540 dans le milieu LB (nutriments suffisants pour une croissance optimale) (Voir figure 9).
- Croissance sous conditions de stress :
 - Croissance de SE SHY 041540 et ST ATCC 14028(souche contrôle) après la stimulation à la gentamicine (Voir figure 10A et 10B).
 - Croissance de SE SHY 041540 dans un milieu minimal (AMM) (Voir figure11).

Dans tous les échantillons soumis en microscopie, les VEMB ont pu être observées. Des contaminants non identifiés ont été également visibles, ce qui a étayé le souci de procéder à une purification subséquente, par gradient de densité.

Figure 9. Image obtenue par microscopie électronique à transmission (130000x) des VEMB produites par SE SHY-04-1540 en conditions normales de croissance dans le milieu LB. Coloration négative PTA.



100 nm

Figure 10. Images obtenues par microscopie électronique à transmission (130000x) des VEMB après stimulation avec de la gentamicine au milieu de la phase exponentielle de croissance. Coloration négative PTA (A) VEMB de SE SHY-04-1540 (B) VEMB de ST ATCC 14028.

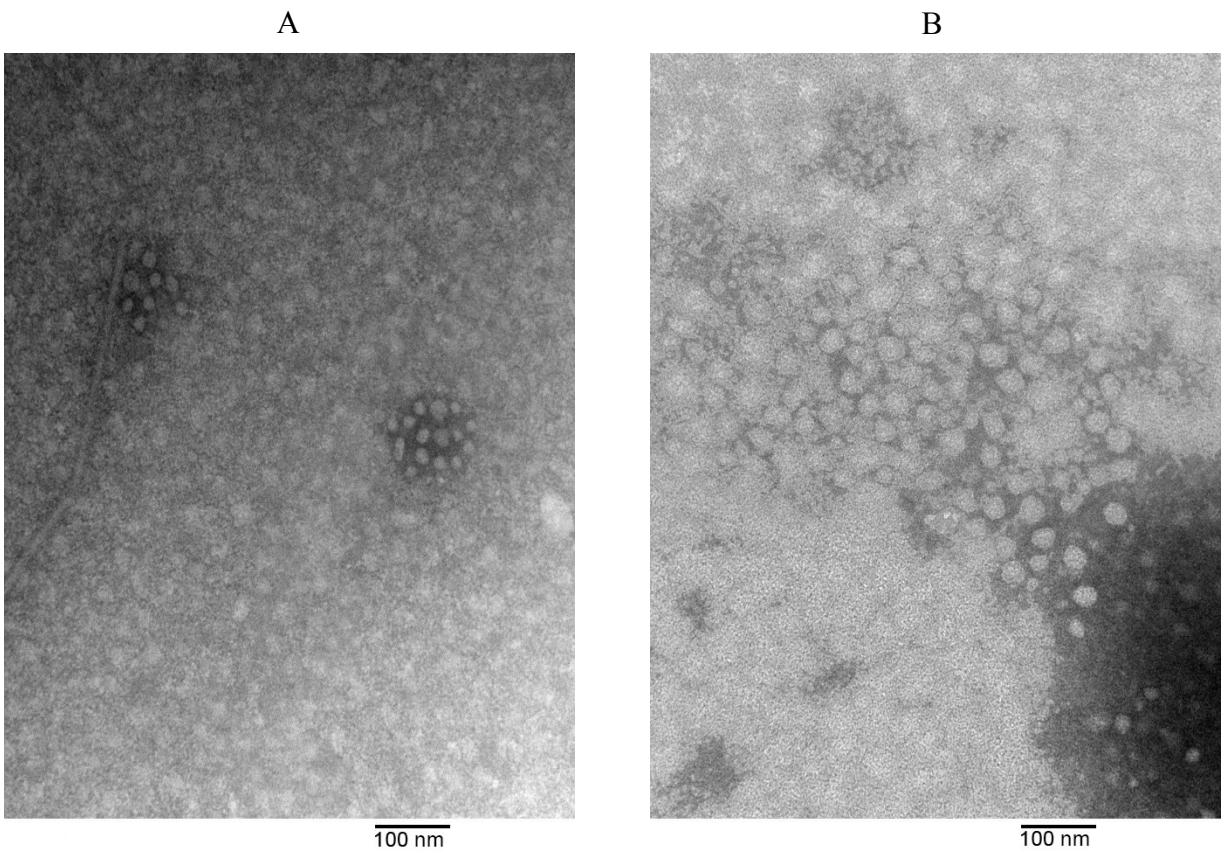
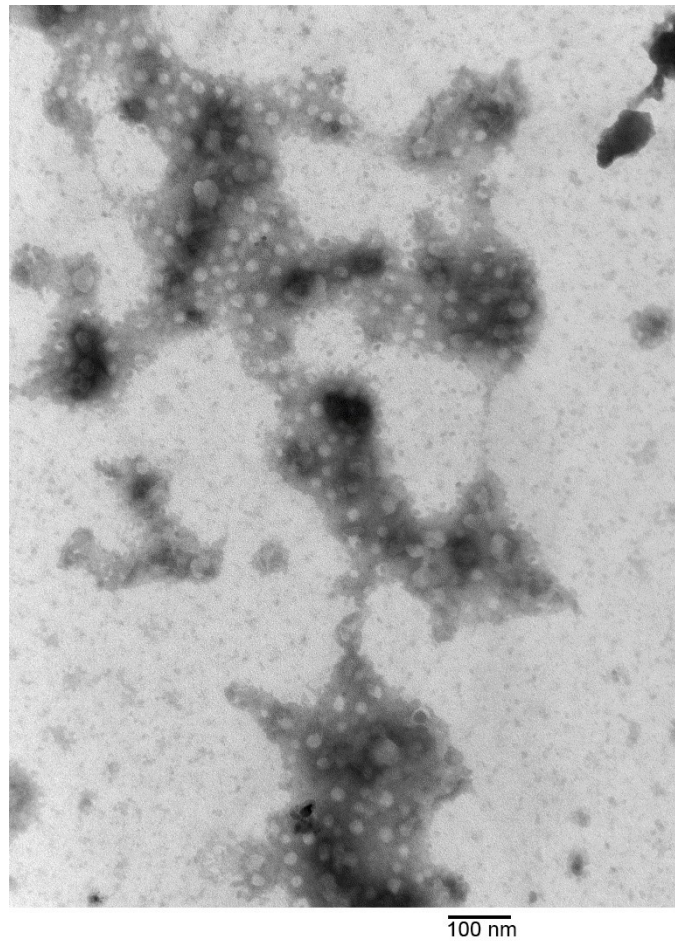


Figure 11. Image obtenue par microscopie électronique à transmission (92000x) des VEMB produites par SE SHY-04-1540 en croissance sous stress en milieu AMM. Coloration négative PTA

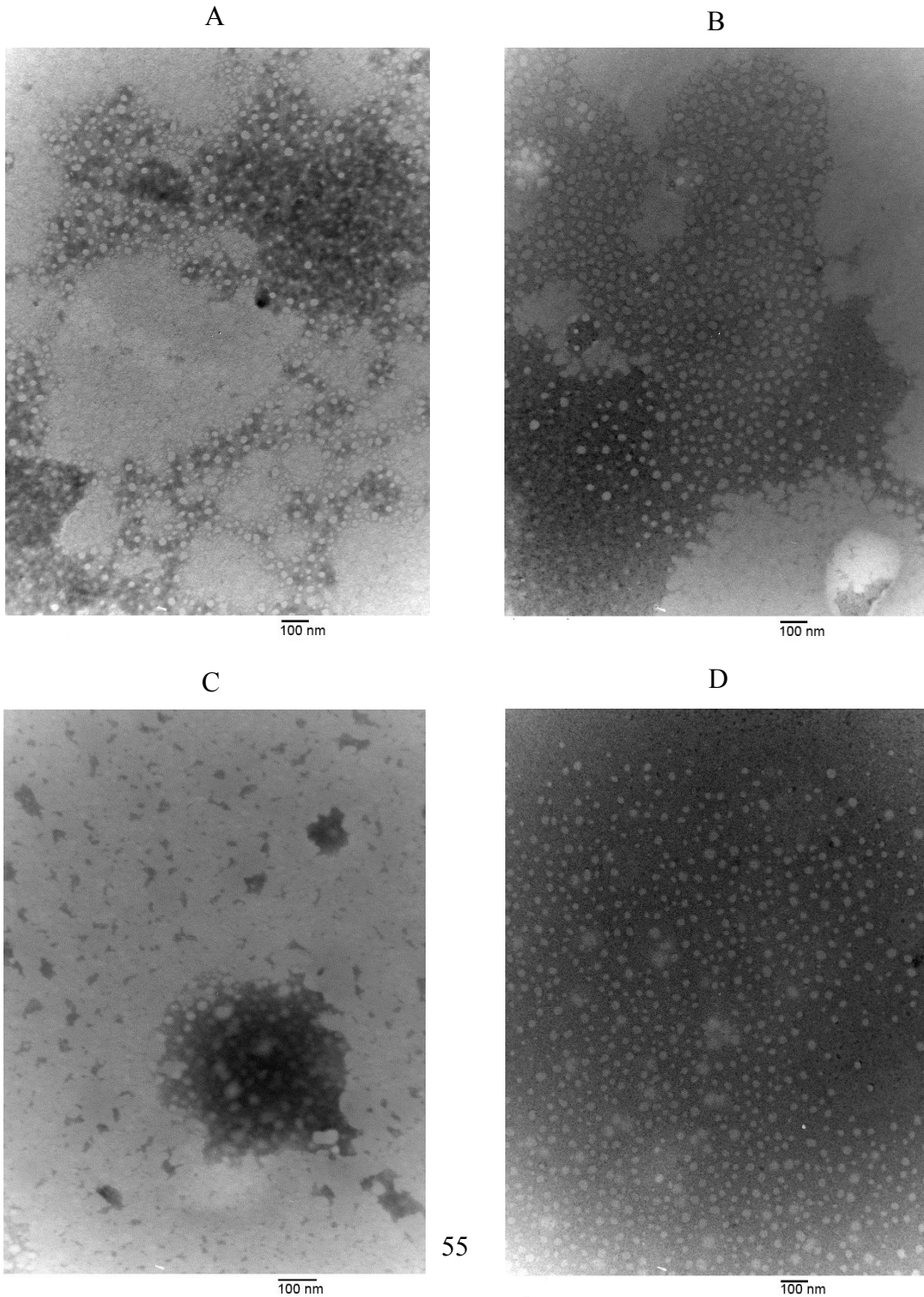


3.2.1.2 Observations au MET des VEMB obtenues à partir d'un protocole de croissance en conditions normales et purifiées par gradient de densité

L'observation par MET, de toutes les fractions du gradient de densité d'OptiPrep, a montré que la répartition des VEMB était prédominante dans les fractions 26%, 28%, 30% et 40% (Voir figure 3). Une deuxième observation par MET a confirmé les résultats obtenus ainsi que

la reproductibilité du protocole. Les caractéristiques des VEMB observées sont des particules sphériques de taille diverse, de diamètre allant de 17 à 67 nm (Voir figure 12).

Figure 12. Images obtenues par microscopie électronique à transmission des VEMB purifiées par gradient de densité «Optiprep» et produites par SE SHY-04-1540 en conditions de croissance normales dans le milieu LB (A) Fraction 26% (64000x) (B) Fraction 28% (64000x) (C) Fraction 30% (92000x) (D) Fraction 40% (64000x). Coloration négative PTA



3.2.2 Quantification des protéines

3.2.2.1 Quantification des protéines des VEMB de *Salmonella* Enteritidis SHY 04 1540

Après la purification par gradient, un dosage de protéines a été fait sur le pool des quatre fractions contenant les VEMB, une quantité de 0.226 mg de protéines a été obtenue. Ce résultat correspond à la quantité de protéines des VEMB qui provenait d'un litre de culture de départ de notre bactérie.

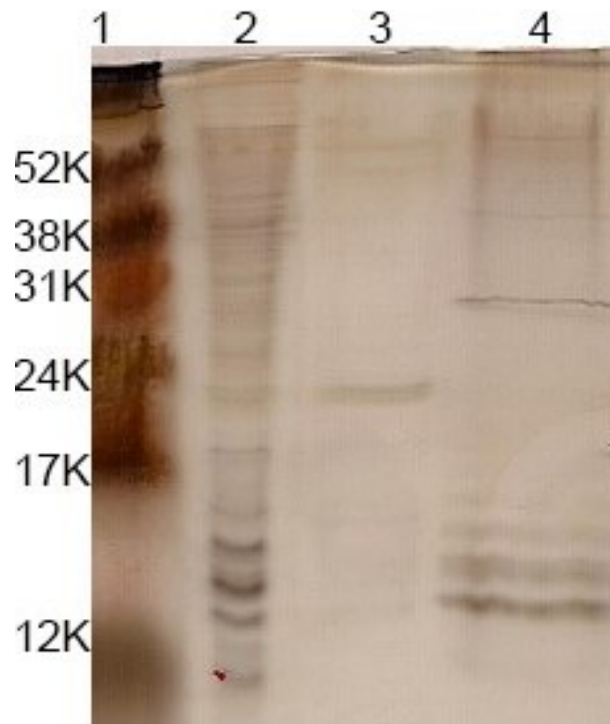
3.2.2.2 Quantification des protéines totales et des protéines de membranes externes de *Salmonella* Enteritidis SHY 04 1540

La quantité de protéines totales et de protéines de membranes externes a été respectivement de 137.28 mg et 1.8 mg à partir d'une culture de la souche de 1L.

3.2.3 Électrophorèses des protéines sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Dans ce gel, il est à noter qu'il y a des protéines des VEMB qui ont des poids moléculaires similaires à quelques protéines totales trouvées entre 12 et 17 kDa. Par contre si l'on compare les protéines de VEMB avec celles de membranes externes, il y aurait plus de similarité dans des bandes protéiques de plus haut poids moléculaire (Voir figure 13).

Figure 13. SDS-PAGE de protéines de SE SHY-04-1540. Coloration au nitrate d'argent. 1 µg de chaque échantillon par puits. 1. Marqueur de poids moléculaire; 2. Protéines totales; 3. Protéines de membrane externe; 4. Protéines de VEMB



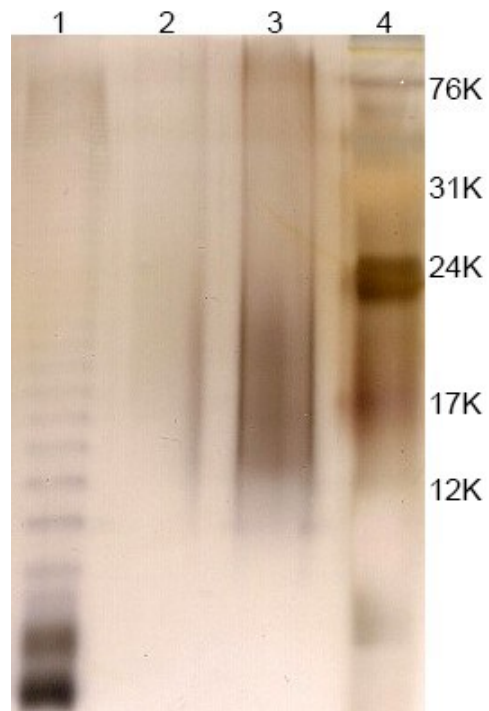
3.2.4 Quantification du LPS

Les quantifications du LPS provenant de SE SHY 041540 et de celui des VEMB, estimés par le protocole de Purlpald a été de 0.27 mg et 0.06 mg respectivement. Ces quantités proviennent d'un litre de culture de départ de la souche.

3.2.5 Électrophorèses du LPS sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Sur gel, le LPS des VEMB et de la bactérie, des bandes de faible poids moléculaire prédominantes dans les deux cas (Voir figure 14).

Figure 14. SDS-PAGE de LPS. Coloration au nitrate d'argent; **1.** 0.25 µg de LPS de *Salmonella* Enteritidis commercial (Sigma, catalogue # L6011); **2.** 0.02 µg de LPS extrait des VEMB; **3.** 0.21 µg de LPS extrait de SE SHY-04-1540; **4.** Marqueur de poids moléculaire (Amersham Rainbow Markers, catalogue# RPN 756E).



4. Discussion générale

Production et purification de VEMB de *Salmonella* Enteritidis SHY-04-1540

Au cours de cette maîtrise, une grande partie des efforts a été consacrée à assurer la qualité et la reproductibilité des diverses productions de VEMB de *Salmonella* Enteritidis SHY-04-1540. Il était en effet de première importance qu'un soin particulier soit apporté à la purification des VEMB en vue des essais ultérieurs sur celles-ci, comme par exemple, pour des études de protéomique du contenu des VEMB ou des essais *in vivo* de leur efficacité vaccinale. Dans ce dernier cas, il deviendra possible d'attester de façon fiable, le niveau d'efficacité des VEMB à générer une réponse immunitaire et à conférer une protection vis-à-vis d'une infection à *Salmonella*.

Au début du projet, nous avons voulu établir divers protocoles de production des VEMB : en conditions normales de croissance de la bactérie (sur milieu LB) ainsi que sous stress, en accordant une importance particulière à la purification des VEMB produites.

La croissance de la souche *Salmonella* Enteritidis SHY-04-1540, sur milieu LB a été suivie pendant plus de 12 h, tandis que sur le milieu TSB elle n'a été suivie que 8 h. En effet dans le cas du TSB, notre intérêt était d'identifier la phase exponentielle pour procéder à l'ajout de l'antibiotique au milieu de cette phase de croissance et ce, dans le but de reproduire, à titre de contrôle, ce qui avait été fait par Alaniz et col avec *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Alaniz et al., 2007). Nous avons observé que la souche a atteint la fin de la phase exponentielle plus vite sur le milieu TSB que sur le milieu LB. À température et vitesse d'aération similaires, la souche sur le milieu LB a pris 90 min de plus que dans le milieu TSB pour terminer sa phase exponentielle de croissance. Ceci est cohérent compte tenu de la quantité plus importante de nutriments qu'offre le TSB, tels que le dextrose (source

d'énergie), la tryptone (digestion pancréatique de caséine) et la soytone (digestion peptique de de soja).

Pour le protocole sous stress antibiotique, avec la gentamicine à une concentration finale de 50µg/mL et administrée au milieu de la phase exponentielle de croissance sur le milieu TSB, nous avons identifié que le rapport entre la CMI des souches, *Salmonella* Enteritidis SHY-04-1540 et *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, correspond à 200 et 125 fois la CMI, respectivement. Le résultat de la CMI de la souche contrôle *Salmonella* Typhimurium ATCC# 14028 correspond à ce qui a été obtenu par Swenson et al. avec la même souche (Swenson, Stewart, Hammett, Fitzsimmons et Ginsberg, 1990).

Quant au stress exercé sur la croissance de la souche sur un milieu acide avec peu de nutriments (AMM), nous avons pu observer une diminution de la population, comparativement à la croissance en milieu normal et ce, tout le long de la phase exponentielle de croissance d'au moins un log₁₀. La terminaison de la phase exponentielle (atteinte sur les deux milieux après 330 min) montre une population viable sur le milieu AMM de 2.13x10⁸ UFC/mL, qui est inférieure à celle de la population viable de la souche en conditions normales sur milieu LB (1.66 x10⁹ UFC/mL).

Bien qu'il soit possible d'obtenir des quantités plus importantes de VEMB dans des conditions de culture « stressantes » (Manning et al. 2011, Kulp et al. 2010. Ellis et al. 2010) nous avons privilégié la production des VEMB dans des conditions normales pour plusieurs raisons, dont une de reproductibilité, compte tenu que l'impact de l'agent stressant pouvait être difficile à contrôler. De plus, il a été montré que les conditions de croissance sont de facteurs qui affectent la composition des VEMB (Kulp et Kuehn, 2010). Il a aussi été démontré que les VEMB produites par stimulation de la bactérie avec un antibiotique peuvent intégrer des

molécules d'antibiotique (Kadurugamuwa et Beveridge, 1997). Ce qui pourrait possiblement contribuer au problème de résistance aux antibiotiques.

La reproductibilité des caractéristiques du produit final a aussi été notre fil conducteur et notre priorité tout au long du projet. Ce facteur est d'autant plus important que le contenu en protéines, dont les protéines immunogènes, des VEMB est spécifique de paramètres précis, comme les conditions de croissance (milieu, pH, température, vitesse d'aération de la culture) (Collins, 2011). Il est aussi attendu que ce contenu protéique dépend de la phase de croissance (latence, croissance exponentielle etc.) à laquelle la production des VEMB est effectuée (McCaig, Koller et Thanassi, 2013).

Une connaissance précise de la courbe de croissance de la souche SHY-04-1540 était donc essentielle aux étapes subséquentes de production et d'isolement des VEMB. En particulier, nous avons étudié et reproduit à trois reprises, la courbe de croissance précise de la population bactérienne au cours du temps, avec l'identification (DO correspondante à la population viable) des phases de croissance dans des conditions de culture bien définies (milieu, température, etc.). Nous avons finalement choisi de produire les VEMB à une DO de 1,2, qui correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance, afin de maximiser la production de VEMB. Une production à une DO de 0,6 par exemple (milieu de la phase exponentielle de croissance) génère moitié moins de VEMB qu'à 1,2, sans toutefois courir le risque de dégradation protéique qui pourrait subvenir à la phase stationnaire de croissance qui suit la phase exponentielle.

Observation des VEMB de *Salmonella* Enteritidis SHY-04-1540 par MET

Les images obtenues en microscopie électronique à transmission (Voir figure 12) ont clairement démontré que les structures obtenues selon nos procédures, sont des VEMB de

Salmonella Enteritidis. L'aspect soit une structure essentiellement sphérique et l'évaluation de leur taille est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature, à savoir des nanostructures de 50 à 250 nm de diamètre, sphériques et séparées de la paroi cellulaire bactérienne (Kulp et Kuehn, 2010). Ces images ont permis de déterminer la localisation des VEMB dans les diverses bandes du gradient de densité mis en œuvre pour leur purification. Les VEMB se sont retrouvées à une densité de flottaison entre 1,14 à 1,21 (fractions 26, 28, 30 et 40 %). Cette distribution est en accord avec des purifications de VEMB provenant d'autres bactéries à Gram négatif où les VEMB se sont retrouvées à une densité de flottaison entre 1,13 et 1,15 g/mL (Axis-Shield, 2011).

Sur ces images, compte tenu de l'absence de structures parasites, le degré de purification des VEMB semble excellent.

Migration des VEMB de *Salmonella* Enteritidis SHY-04-1540 sur gel SDS-PAGE

Dans le but de comparer les protéines des VEMB aux protéines totales et aux protéines de membrane externe de SE SHY-04-1540, nous avons procédé à l'extraction de ces dernières. Nous avons vu que le contenu protéique des VEMB, soit 0,226 mg provenant d'un litre de culture, est plus de 600 fois inférieur au contenu protéique total de la bactérie SE SHY-04-1540 soit 137,28 mg pour un litre de culture de la bactérie. Ces résultats sont cohérents avec la différence de taille entre les VEMB et la bactérie d'où proviennent les protéines quantifiées.

La migration sur SDS PAGE, (figure 13) montre des bandes de poids moléculaires (PM) similaires, entre 12 et 52 kDa, dans les VEMB, les protéines de membrane externe ainsi que dans les protéines totales de *Salmonella* Enteritidis SHY-04-1540. Cho a retrouvé (Cho et al., 2015) des bandes dans le même intervalle de poids moléculaires, qui correspondaient à OmpA de PM entre 28 et 38 kDa, Dps de PM entre 18,42 et 19,72 kDa, protéine W de la ME

(OmpW) de PM 22,59 kDa . Ces protéines ont été trouvées (migration sur SDS-PAGE) et identifiées comme étant des protéines abondantes et immunogènes chez une souche de *Salmonella* Enteritidis d'origine aviaire. Aksakal a comparé les bandes de protéines totales de 35 souches de *Salmonella* pour les suivants serotypes: Enteritidis, Typhimurium, Agona, Corvallis, Virchow, Augustenborg, Anatum, et Saintpaul, et a retrouvé des bandes communes entre 24 et 78,1 kDa, avec prédominance des bandes de 51,2 et 41,5 kDa (Aksakal, 2010). Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier clairement les bandes, ainsi que d'examiner l'efficacité de ces protéines dans la protection contre l'infection à SE dans un modèle animal.

Rendement de protéines des VEMB

À ce jour, les données relatives au rendement des VEMB sont quasiment inexistantes dans la littérature. Seul un groupe de chercheurs a publié la quantité de protéines obtenue des VEMB de *Francisella novicida*. À partir d'un litre de culture cette quantité a été de 0,125 mg (McCaig et al., 2013). Bien que le rendement que nous avons obtenu ait été plus élevé, il est raisonnable de considérer la possibilité de l'améliorer.

LPS et VEMB

L'observation du LPS de *Salmonella* Enteritidis SHY-04-1540 sur gel SDS-PAGE (figure 14), montre plusieurs bandes de poids moléculaires entre 17 et 24 kDa. Ce résultat corrobore ce qui a été observé pour du LPS de SE très pure (macromolécules de 10-24kDa)(Sigma, L6011). La quantité de LPS des VEMB mis sur gel n'est pas suffisante pour faire une comparaison avec le LPS de la bactérie. Selon la littérature, la qualité du LPS des VEMB peut être différente de

celle de la bactérie. Par exemple chez *P.aeruginosa*, seule une bande B du LPS a été retrouvée dans les VEMB (Kadurugamuwa et Beveridge, 1995).

La quantité de LPS contenue dans les VEMB (lors d'utilisation comme produit vaccinal) est un facteur important dans la mesure où le LPS peut-être, selon la dose administrée, un stimulant de la réponse immunologique, mais en même temps le LPS peut aussi provoquer une réaction inflammatoire (endotoxinique) avec fièvre et anorexie, si la quantité administrée est trop élevée (Keestra et van Putten, 2008).

Le contenu protéique des VEMB est considéré comme un indice de la teneur en LPS. La quantité relative de LPS est évaluée à 25 -50% de la quantité des protéines des VEMB (Holst et al., 2009). Nous avons effectivement trouvé un rapport de 26% (0,06 mg de LPS pour 0,226 mg de protéines).

Il est par ailleurs connu que pendant l'élevage, une poule est exposée à une quantité de 1 µg de LPS présentes dans les poussières de son environnement et ce, par jour (Parmentier, Klompen, De Vries Reilingh et Lammers, 2008).

Dans le but d'évaluer les VEMB que nous avons produites, un essai *in vivo* peut être fait, et pour estimer la dose à administrer lors de cet essai, nous pouvons nous appuyer sur diverses études *in vivo* menées chez les oiseaux, qui ont abouti à une dose consensus considérée comme acceptable (c'est-à-dire ne provoquant pas de réactions adverses) de 1 µg de LPS/gramme de poids de poussin, ce LPS étant administré par voie orale/intranasale (Parmentier et al., 2008; Ploegaert et al., 2007).

En prenant la dose la plus sécuritaire, c'est-à-dire en se basant sur l'estimation que le LPS des VEMB représente 50% de la teneur en protéines, il serait possible d'administrer 2 µg (en termes de contenu protéique) de VEMB par gramme de poussin.

En considérant qu'un poussin SPF (*Specific pathogen-free*) pèse en moyenne 50 g lors de l'éclosion et que les poussins sont habituellement immunisés au couvoir, la dose vaccinale à administrer serait au maximum de 100 µg de protéines de VEMB, l'objectif d'administrer cette dose serait simplement de voir s'il y a une réponse immunitaire. Dans un deuxième temps l'ajustement de la dose serait fait.

Il ressort que l'amélioration du rendement de la production de purification des VEMB doit être faite. Des possibilités sont d'augmenter la population de la culture de départ (enrichir le milieu) et de reconsidérer les étapes de purification et de lavages subséquents de façon à minimiser les pertes de produit à chacune de ces étapes. En particulier, une filtration à 0.45 µm (au lieu de 0.2 µm) devrait améliorer le rendement de VEMB, car celles de VEMB de plus grandes tailles risquent moins d'être arrêtées par le filtre.

La production, l'isolement et la purification de VEMB réalisés par notre équipe est intéressante à plusieurs points de vue. Nous sommes les premiers à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, à avoir standardisé un protocole, reproductible, de production de VEMB, ce qui ouvre des possibilités et de l'intérêt pour d'autres étudiants à poursuivre la recherche associée aux VEMB : protéomique, vaccins, biologie bactérienne, etc...

Conclusion

Le but de cette étude était la production, la purification et la caractérisation des VEMB de la souche *Salmonella* Enteritidis SHY-041540.

-Production des VEMB: Après avoir testé trois protocoles différents de production de VEMB avec succès (conditions normales de croissance de la bactérie et sous conditions de stress), nous avons décidé de choisir le protocole de production en conditions normales de croissance de la bactérie, afin d'éviter l'introduction de variations, dans la composition des VEMB, causées par des agents stressseurs. Une fois choisi le protocole de production nous avons procédé à l'étape de purification.

-La purification des VEMB a été faite par gradient de densité à l'aide du milieu Optiprep™, dans ce gradient de densité, nous avons retrouvé quatre couches enrichies en VEMB, correspondant à un intervalle de densité de flottaison de milieu de 1,142 à 1,215(Axis-Shield, 2011).

-Caractérisation des VEMB : Les images de MET réalisées avant l'étape de purification et à partir des productions de VEMB suivant les trois protocoles, ont montré des vésicules de tailles variées (entre 17 et 67 nm), tailles qui sont dans les limites rapportées dans la littérature. Dans les images, avant l'étape de purification, on trouve des artefacts contaminants qui peuvent être des fragments bactériens. Ceux-ci semblent être absents après la purification par gradient de densité.

Le profil de protéines et du LPS par électrophorèses SDS PAGE a été fait sur une quantité insuffisante de matériel, la comparaison avec les protéines et le LPS de la bactérie reste donc à être étudiée.

Comme vous pouvez le constater, les résultats des gels SDS PAGE nous montrent seulement la présence de protéines, ce qui est normal et attendu. La suite à donner, avant un essai *in vivo*, serait de vérifier si ces protéines des VEMB sont reconnues par des sérums identifiés protecteurs, d'animaux infectés naturellement et/ou immunisés avec *Salmonella* Enteritidis, par western blot. Une analyse subséquente, par spectrométrie de masse, des bandes obtenues permettrait finalement d'identifier les protéines immunogènes des VEMB de la souche *Salmonella* Enteritidis SHY-041540.

Bibliographie

- Adesiyun, A., Webb, L., Musai, L., Louison, B., Joseph, G., Stewart-Johnson, A., Rodrigo, S. (2014). Survey of *Salmonella* contamination in chicken layer farms in three Caribbean countries. *J Food Prot*, 77(9), 1471-1480. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-14-021
- Agbaje, M., Begum, R. H., Oyekunle, M. A., Ojo, O. E. et Adenubi, O. T. (2011). Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiol (Praha)*, 56(6), 497-503. doi: 10.1007/s12223-011-0075-4
- Agence de la santé publique du Canada. (2010). *Salmonella enterica* spp. Repéré 15 Novembre 2015 à <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/salmonella-ent-fra.php>
- Aksakal, A. (2010). Analysis of whole cell protein profiles of *Salmonella* serovars isolated from chicken, turkey and sheep faeces by SDS-PAGE. *Veterinari Medicina*, 55(6), 259-263.
- Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C. et Cookson, B. T. (2007). Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella* Typhimurium that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J Immunol*, 179(11), 7692-7701.
- Arockiasamy, A. et Krishnaswamy, S. (2000). Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from *Salmonella* Typhi for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein. *Anal Biochem*, 283(1), 64-70. doi: 10.1006/abio.2000.4634
- Asensio, C. J., Gaillard, M. E., Moreno, G., Bottero, D., Zurita, E., Rumbo, M., Hozbor, D. (2011). Outer membrane vesicles obtained from *Bordetella pertussis* Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine*, 29(8), 1649-1656. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.068
- Augustin, J.-C. (2005). Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (France)). Repéré à http://www.symprevius.net/vars/fichiers/pub_defaut/these_HDR_Jean_Christophe.pdf
- Avila-Calderon, E. D., Lopez-Merino, A., Jain, N., Peralta, H., Lopez-Villegas, E. O., Sriranganathan, N., Contreras-Rodriguez, A. (2012). Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin Dev Immunol*, 2012, 352493. doi: 10.1155/2012/352493
- Axis-Shield. (2011). Axis-Shield Mini-Review Index: MS16 Bacterial and fungal extracellular vesicles. Repéré le 01 Décembre 2014 à <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/minireviews.htm>
- Bai, J., Kim, S. I., Ryu, S. et Yoon, H. (2014). Identification and characterization of outer membrane vesicle-associated proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun*, 82(10), 4001-4010. doi: 10.1128/iai.01416-13

- Barrow, P. A. (2007). *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathol*, 36(1), 1-13. doi: 10.1080/03079450601113167
- Bauman, S. J. et Kuehn, M. J. (2006). Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect*, 8(9-10), 2400-2408. doi: 10.1016/j.micinf.2006.05.001
- Bergman, M. A., Cummings, L. A., Barrett, S. L., Smith, K. D., Lara, J. C., Aderem, A. et Cookson, B. T. (2005). CD4+ T cells and toll-like receptors recognize *Salmonella* antigens expressed in bacterial surface organelles. *Infect Immun*, 73(3), 1350-1356. doi: 10.1128/iai.73.3.1350-1356.2005
- Brett, M. (2014). The National Salmonella Enteritidis working Group. *Chicken Farmer Newsletter*, 16(2). Repéré à <http://www.chickenfarmers.ca/wp-content/uploads/2014/05/Chicken-Farmer-May.pdf>
- Bronze, M. S. et Greenfield, R. A. (2005). *Biodefense: principles and pathogens*. Horizon Bioscience Norfolk (UK).
- Chart, H. (1994a). Bacterial fractionation and membrane protein characterization. *Methods in practical laboratory bacteriology*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 1-10.
- Chart, H. (1994b). Lipopolysaccharide: Isolation and characterization. Dans H. Chart (dir.), *Methods in practical laboratory bacteriology* (p. 11-20). Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Cho, Y., Park, S., Barate, A. K., Truong, Q. L., Han, J. H., Jung, C. H., . . Hahn, T. W. (2015). Proteomic analysis of outer membrane proteins in *Salmonella enterica* Enteritidis. *J Microbiol Biotechnol*, 25(2), 288-295.
- Chowdhury, C. et Jagannadham, M. V. (2013). Virulence factors are released in association with outer membrane vesicles of *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 during normal growth. *Biochim Biophys Acta*, 1834(1), 231-239. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.09.015
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. *CLSI document M07-A9* Repéré à <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf>
- Coburn, B., Grassl, G. A. et Finlay, B. B. (2006). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol*, 85(2), 112-118.
- Collins, B. S. (2011). Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. *Discovery medicine*, 12(62), 7-15.
- Compendium of Veterinary Products. (2016). Chicken Biological Chart. Repéré le 4 Janvier 2016 à <https://pic.naccvp.com/chartindex/main?type=bio&spcsId=4020>
- Cui, Y. (2013). Production and immunogenicity of selected proteins of *Salmonella* Enteritidis. [Montréal] : Université de Montréal.
- Cummings, P. L., Kuo, T., Javanbakht, M., Shafir, S., Wang, M. et Sorvillo, F. (2015). Salmonellosis Hospitalizations in the United States: Associated Chronic Conditions, Costs, and Hospital Outcomes, 2011, Trends 2000-2011. *Foodborne Pathog Dis*. doi: 10.1089/fpd.2015.1969

- Desin, T. S., Koster, W. et Potter, A. A. (2013). *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines*, 12(1), 87-96. doi: 10.1586/erv.12.138
- DeWinte, L. M., Ross, W. H., Couture, H. et Farber, J. F. (2011). Évaluation des risques que comporte la contamination interne des œufs en coquille par *Salmonella* Enteritidis. *International Food Risk Analysis Journal*, 1(1), 82-130.
- Dubreuil, J. D., Logan, S. M., Cabbage, S., Eidhin, D. N., McCubbin, W. D., Kay, C. M., Trust, T. J. (1988). Structural and biochemical analyses of a surface array protein of *Campylobacter fetus*. *J Bacteriol*, 170(9), 4165-4173.
- Elgroud, R., Granier, S. A., Marault, M., Kerouanton, A., Lezzar, A., Bouzitouna-Bentchouala, C., Millemann, Y. (2015). Contribution of Avian *Salmonella enterica* Isolates to Human Salmonellosis Cases in Constantine (Algeria). *Biomed Res Int*, 2015, 352029. doi: 10.1155/2015/352029
- Ellis, T. N. et Kuehn, M. J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(1), 81-94. doi: 10.1128/mmbr.00031-09
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2015). Salmonellosis (non-typhi, non-paratyphi). Repéré le 30 Décembre 2015 à <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/salmonellosis/Pages/index.aspx>
- Fisher, I. S. et Meakins, S. (2006). Surveillance of enteric pathogens in Europe and beyond: Enter-net annual report for 2004. *Euro Surveill*, 11(8), E060824 060823.
- Geng, S., Liu, Z., Lin, Z., Barrow, P., Pan, Z., Li, Q. et Jiao, X. (2015). Identification of *in vivo*-induced genes during infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Res Vet Sci*, 100, 1-7. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.03.028
- Gouvernement du Canada (2012). *Rapport annuel du programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA)* Repéré à http://publications.gc.ca/collections/collection_2014/aspc-phac/HP2-4-2012-2-fra.pdf
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. et Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 95-108. doi: 10.1038/nrmicro821
- Hansen-Wester, I., Chakravorty, D. et Hensel, M. (2004). Functional transfer of *Salmonella* pathogenicity island 2 to *Salmonella bongori* and *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 72(5), 2879-2888.
- Holst, J., Martin, D., Arnold, R., Huergo, C. C., Oster, P., O'Hallahan, J. et Rosenqvist, E. (2009). Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, 27 Suppl 2, B3-12. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.071
- Howard, Z. R., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G. et Ricke, S. C. (2012). *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: current issues and prospects for control. *Food Research International*, 45(2), 755-764.

- Inagaki, S., Onishi, S., Kuramitsu, H. K. et Sharma, A. (2006). *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "*Tannerella forsythia*". *Infect Immun*, 74(9), 5023-5028. doi: 10.1128/iai.00062-06
- Kadurugamuwa, J. L. et Beveridge, T. J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol*, 177(14), 3998-4008.
- Kadurugamuwa, J. L. et Beveridge, T. J. (1996). Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol*, 178(10), 2767-2774.
- Kadurugamuwa, J. L. et Beveridge, T. J. (1997). Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J Antimicrob Chemother*, 40(5), 615-621.
- Kaparakis-Liaskos, M. et Ferrero, R. L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol*, 15(6), 375-387. doi: 10.1038/nri3837
- Katsui, N., Tsuchido, T., Hiramatsu, R., Fujikawa, S., Takano, M. et Shibasaki, I. (1982). Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 151(3), 1523-1531.
- Keery, I. (2010). *Salmonella* Enteritidis control programs in the Canadian poultry industry. British Columbia Ministry of Agriculture and Lands,. Repéré à http://www.agf.gov.bc.ca/lhmr/pubs/se_control_programs0910.pdf
- Keestra, A. M. et van Putten, J. P. (2008). Unique properties of the chicken TLR4/MD-2 complex: selective lipopolysaccharide activation of the MyD88-dependent pathway. *J Immunol*, 181(6), 4354-4362.
- Kesty, N. C., Mason, K. M., Reedy, M., Miller, S. E. et Kuehn, M. J. (2004). Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J*, 23(23), 4538-4549. doi: 10.1038/sj.emboj.7600471
- Kinde, H., Goodluck, H. A., Pitesky, M., Friend, T. D., Campbell, J. A. et Hill, A. E. (2015). Validation of Single and Pooled Manure Drag Swabs for the Detection of *Salmonella* Serovar Enteritidis in Commercial Poultry Houses. *Avian Dis*, 59(4), 548-553. doi: 10.1637/11224-063015-ResNote.1
- Kulkarni, H. M., Swamy Ch, V. et Jagannadham, M. V. (2014). Molecular characterization and functional analysis of outer membrane vesicles from the antarctic bacterium *Pseudomonas syringae* suggest a possible response to environmental conditions. *J Proteome Res*, 13(3), 1345-1358. doi: 10.1021/pr4009223
- Kulp, A. et Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol*, 64, 163-184. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073413

- Landry, L. et Dutil, L. (2010, 01 Decembre 2010). Overview of *Salmonella* Enteritidis in Canada. Communication présentée Canadian Salmonella Enteritidis Control Workshop Repéré à http://www.bccdc.ca/resourcegallery/Documents/Training%20and%20Events/Epid/Enterics/Landy_Dutil.pdf
- Le ministère de l'Agriculture, d. P. e. d. l. A. d. Q. M. (2014). *BILAN - Toxi-infections alimentaires - 1 5 er avril 2012 au 31 mars 2013*. Repéré à http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Bilan_Toxi-infection.pdf
- Lee, C.-H. et Tsai, C.-M. (1999). Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation. *Analytical biochemistry*, 267(1), 161-168.
- Lee, E. Y., Choi, D. S., Kim, K. P. et Gho, Y. S. (2008). Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev*, 27(6), 535-555. doi: 10.1002/mas.20175
- Li, Z., Clarke, A. J. et Beveridge, T. J. (1996). A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles. *J Bacteriol*, 178(9), 2479-2488.
- Manning, A. J. et Kuehn, M. J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol*, 11, 258. doi: 10.1186/1471-2180-11-258
- Mashburn, L. M. et Whiteley, M. (2005). Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, 437(7057), 422-425. doi: 10.1038/nature03925
- McBroom, A. J., Johnson, A. P., Vemulapalli, S. et Kuehn, M. J. (2006). Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J Bacteriol*, 188(15), 5385-5392. doi: 10.1128/jb.00498-06
- McBroom, A. J. et Kuehn, M. J. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol*, 63(2), 545-558. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x
- McCaig, W. D., Koller, A. et Thanassi, D. G. (2013). Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J Bacteriol*, 195(6), 1120-1132. doi: 10.1128/jb.02007-12
- Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation MAPAQ. (2005). Bilan 2004. *Raizo Réseau d'alerte et d'information zoosanitaire* 9, 1-60. Repéré à http://www.bibliotheque.assnat.qc.ca/DepotNumerique_v2/AffichageFichier.aspx?idf=27232
- Mitchell, B. W., Buhr, R. J., Berrang, M. E., Bailey, J. S. et Cox, N. A. (2002). Reducing airborne pathogens, dust and *Salmonella* transmission in experimental hatching cabinets using an electrostatic space charge system. *Poult Sci*, 81(1), 49-55.
- Muralinath, M., Kuehn, M. J., Roland, K. L. et Curtiss, R., 3rd. (2011). Immunization with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-derived outer membrane vesicles delivering

- the pneumococcal protein PspA confers protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 79(2), 887-894. doi: 10.1128/iai.00950-10
- Murphy, K., Park, A. J., Hao, Y., Brewer, D., Lam, J. S. et Khursigara, C. M. (2014). Influence of O polysaccharides on biofilm development and outer membrane vesicle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 196(7), 1306-1317. doi: 10.1128/jb.01463-13
- Mutwiri, G., Gerds, V., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Auray, G., Eng, N., Garlapati, S., Potter, A. (2011). Combination adjuvants: the next generation of adjuvants? *Expert Rev Vaccines*, 10(1), 95-107. doi: 10.1586/erv.10.154
- Nesbitt, A., Ravel, A., Murray, R., McCormick, R., Savelli, C., Finley, R., . . . Gilmour, M. (2012). Integrated surveillance and potential sources of *Salmonella* Enteritidis in human cases in Canada from 2003 to 2009. *Epidemiol Infect*, 140(10), 1757-1772. doi: 10.1017/s0950268811002548
- Ochoa-Reparaz, J., Sesma, B., Alvarez, M., Jesus Renedo, M., Irache, J. M. et Gamazo, C. (2004). Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella* Enteritidis against outer membrane proteins and other surface structural antigens. *Vet Res*, 35(3), 291-298. doi: 10.1051/vetres:2004011
- Park, S. B., Jang, H. B., Nho, S. W., Cha, I. S., Hikima, J., Ohtani, M., Jung, T. S. (2011). Outer membrane vesicles as a candidate vaccine against edwardsiellosis. *PLoS One*, 6(3), e17629. doi: 10.1371/journal.pone.0017629
- Parmentier, H. K., Klompen, A. L., De Vries Reilingh, G. et Lammers, A. (2008). Effect of concurrent intratracheal lipopolysaccharide and human serum albumin challenge on primary and secondary antibody responses in poultry. *Vaccine*, 26(43), 5510-5520. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.07.053
- Parsek, M. R. et Greenberg, E. P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(16), 8789-8793.
- Patrick, A. et Weill, F. (2007). Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella* (9^e éd.). Repéré à https://sites.anses.fr/fr/system/files/private/WKLM_Fr.pdf
- Ploegaert, T. C., De Vries Reilingh, G., Nieuwland, M. G., Lammers, A., Savelkoul, H. F. et Parmentier, H. K. (2007). Intratracheally administered pathogen-associated molecular patterns affect antibody responses of poultry. *Poult Sci*, 86(8), 1667-1676.
- Roden, J. A., Wells, D. H., Chomel, B. B., Kasten, R. W. et Koehler, J. E. (2012). Hemin binding protein C is found in outer membrane vesicles and protects *Bartonella henselae* against toxic concentrations of hemin. *Infect Immun*, 80(3), 929-942. doi: 10.1128/iai.05769-11
- Rodriguez, R., Fandino, C., Donado, P., Guzman, L. et Verjan, N. (2015). Characterization of *Salmonella* from Commercial Egg-Laying Hen Farms in a Central Region of Colombia. *Avian Dis*, 59(1), 57-63.

- Santé Canada (2015). Stratégie nationale pour le contrôle de la maladie chez l'humain causée par *Salmonella* Enteritidis provenant de la volaille au Canada. Repéré à <http://camr-rcam.gc.ca/fn-an/legislation/guide-ld/salmonella-enteritidis-illness-maladie-fra.php>
- Sasse, J. et Gallagher, S. R. (2001). Staining Proteins in Gels (*Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc.
- Schertzer, J. W. et Whiteley, M. (2012). A bilayer-couple model of bacterial outer membrane vesicle biogenesis. *MBio*, 3(2). doi: 10.1128/mBio.00297-11
- Schild, S., Roier, S. et Reidl, J. (2014). United States, Vaccine Against *Pasteurellaceae*, application no. US 2014/0023684 A1. Graz, Autriche: Patent and Trademark Office. Repéré à <http://www.google.com/patents/US20140023684>
- Schooling, S. R. et Beveridge, T. J. (2006). Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol*, 188(16), 5945-5957. doi: 10.1128/jb.00257-06
- Schwechheimer, C. et Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*, 13(10), 605-619. doi: 10.1038/nrmicro3525
- Schwechheimer, C., Kulp, A. et Kuehn, M. J. (2014). Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. *BMC Microbiol*, 14, 324. doi: 10.1186/s12866-014-0324-1
- Schwechheimer, C., Rodriguez, D. L. et Kuehn, M. J. (2015). NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen*, 4(3), 375-389. doi: 10.1002/mbo3.244
- Schwechheimer, C., Sullivan, C. J. et Kuehn, M. J. (2013). Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 52(18), 3031-3040. doi: 10.1021/bi400164t
- Setta, A. M., Barrow, P. A., Kaiser, P. et Jones, M. A. (2012). Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 35(5), 397-410. doi: 10.1016/j.cimid.2012.03.004
- Sigma. (L6011). Lipopolysaccharides from *Salmonella* Enteritidis Repéré le Novembre 2014 à https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/l6011pis.pdf
- Silhavy, T. J., Kahne, D. et Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414
- Silue, N. (2005). Thermorésistance de trois serotypes de *Salmonella* dans l'oeuf et les gésiers de poulets. *Université Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, Afrique*.
- Sivaramalingam, T., McEwen, S. A., Pearl, D. L., Ojkic, D. et Guerin, M. T. (2013). A temporal study of *Salmonella* serovars from environmental samples from poultry breeder flocks in Ontario between 1998 and 2008. *Can J Vet Res*, 77(1), 1-11.

- Sotolongo, F., Campa, C., Casanueva, V., Fajardo, E. M., Cuevas, I. E. et Gonzalez, N. (2007). Cuban Meningococcal BC Vaccine: Experiences & Contributions from 20 Years of Application. *MEDICC Rev*, 9(1), 16-22.
- Su, L. H. et Chiu, C. H. (2007). *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J*, 30(3), 210-219.
- Swenson, C. E., Stewart, K. A., Hammett, J. L., Fitzsimmons, W. E. et Ginsberg, R. S. (1990). Pharmacokinetics and in vivo activity of liposome-encapsulated gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(2), 235-240.
- Tan, S., Gyles, C. L. et Wilkie, B. N. (1997). Evaluation of an aroA mutant *Salmonella* Typhimurium vaccine in chickens using modified semisolid Rappaport Vassiliadis medium to monitor faecal shedding. *Vet Microbiol*, 54(3-4), 247-254.
- Terrestrial Animal Health Code. (2010). Chapter 6.5: Prevention, detection and control of *Salmonella* in poultry
- Repéré le November 5th, 2014 à http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.6.5.htm
- Thomas, M. K., Murray, R., Flockhart, L., Pintar, K., Fazil, A., Nesbitt, A., Pollari, F. (2015). Estimates of Foodborne Illness-Related Hospitalizations and Deaths in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents. *Foodborne Pathog Dis*, 12(10), 820-827. doi: 10.1089/fpd.2015.1966
- Tran, T. Q. L. (2010). Étude de l'efficacité de la vaccination à *Salmonella* Enteritidis chez la poule pondeuse et de la protection contre l'infection. (thèse, Université de Montréal, Montréal). Repéré à http://atrium.umontreal.ca/UM:dspace_marxml1866/3931
- Tsai, C. M., Frasc, C. E., Rivera, E. et Hochstein, H. D. (1989). Measurements of lipopolysaccharide (endotoxin) in meningococcal protein and polysaccharide preparations for vaccine usage. *J Biol Stand*, 17(3), 249-258.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Pasmans, F., Bertrand, S., Collard, J., . . . Ducatelle, R. (2005). *Salmonella* dans la viande et dans les oeufs: un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace. Communication présentée Annales de Médecine Vétérinaire.
- Vasilyeva, N. V., Tsfasman, I. M., Suzina, N. E., Stepnaya, O. A. et Kulaev, I. S. (2008). Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. *FEBS J*, 275(15), 3827-3835. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06530.x
- Veith, P. D., Chen, Y. Y., Chen, D., O'Brien-Simpson, N. M., Cecil, J. D., Holden, J. A., Reynolds, E. C. (2015). *Tannerella forsythia* Outer Membrane Vesicles Are Enriched with Substrates of the Type IX Secretion System and TonB-Dependent Receptors. *J Proteome Res*. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00878
- Virlogeux-Payant, I., Lalmanach, A.-C., Beaumont, C., Hirt, H. et Velge, P. (2012). *Salmonella*, de la plante au tube digestif: des recherches pour élaborer des stratégies de lutte. *Innovations Agronomiques* 24, 35-48.

- Wessel, A. K., Liew, J., Kwon, T., Marcotte, E. M. et Whiteley, M. (2013). Role of *Pseudomonas aeruginosa* peptidoglycan-associated outer membrane proteins in vesicle formation. *J Bacteriol*, 195(2), 213-219. doi: 10.1128/jb.01253-12
- Westphal, O. (1965). Bacterial lipopolysaccharide-extraction with phenol water and further application of procedure. *Methods in carbohydrate chemistry*, 1, 83-91.
- Yaron, S., Kolling, G. L., Simon, L. et Matthews, K. R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 66(10), 4414-4420.
- Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., Kamiya, S. (2009). Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol*, 9, 197. doi: 10.1186/1471-2180-9-197
- Yoon, H., Ansong, C., Adkins, J. N. et Heffron, F. (2011). Discovery of *Salmonella* virulence factors translocated via outer membrane vesicles to murine macrophages. *Infect Immun*, 79(6), 2182-2192. doi: 10.1128/iai.01277-10
- Yoon, H., McDermott, J. E., Porwollik, S., McClelland, M. et Heffron, F. (2009). Coordinated regulation of virulence during systemic infection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS Pathog*, 5(2), e1000306. doi: 10.1371/journal.ppat.1000306

