



Université de Montréal

**Caractérisation du produit du gène *sty4221*, unique à *Salmonella enterica*  
sérovary Typhi**

Par

**Marthe Kenny Charles**

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M. Sc.)  
en Microbiologie et Immunologie

Août, 2008

©Marthe Kenny Charles

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Caractérisation du produit du gène *sty4221*, unique à *Salmonella enterica*  
sérovary Typhi**

Présenté par  
**Marthe Kenny Charles**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

**Daniel Dubreuil**

Président-rapporteur

**France Daigle**

Directrice de recherche

**Patrick Hallenbeck**

membre du jury

## Résumé

*Salmonella enterica* sérovar Typhi (Typhi) est une bactérie pathogène spécifique à l'homme. Typhi est l'agent étiologique de la fièvre typhoïde chez l'humain, causant plus de 16 millions de nouveaux cas par année et plus de 600 000 morts. Il a été démontré que pour causer une infection systémique, *Salmonella* doit nécessairement survivre dans les macrophages de l'hôte. Paradoxalement, *S. enterica* sérovar Typhimurium, très apparenté à Typhi (près de 90 % d'homologie), n'a pas la capacité de se disséminer dans l'organisme humain et peut infecter plusieurs espèces animales. Nous avons antérieurement identifié 36 gènes uniques à Typhi (absents chez Typhimurium) situés sur 15 régions différentes et exprimés sélectivement lors de l'infection de macrophages humains. Ainsi, l'une de ces régions a suscité notre attention, soit la région *sty4217-4222* et plus particulièrement le produit du gène *sty4221*, une aminotransférase hypothétique. Ce dernier gène est d'intérêt dû à l'homologie qu'il détient avec une hémolysine connue (Hly) produite par *Treponema denticola*, possédant elle-même une activité d'aminotransférase. Chez *T. denticola*, Hly dégrade la cystéine et produit du H<sub>2</sub>S qui est toxique pour l'hôte. Notre hypothèse est que la spécificité d'hôte et la capacité de produire une infection systémique de Typhi sont dues à l'expression de gènes qui ne se retrouvent pas chez d'autres salmonelles. Le but de cette étude était donc de caractériser le gène *sty4221* quant à son activité hémolytique, cytotoxique et tenter de déterminer son rôle dans la virulence de cette bactérie. Le gène *sty4221* a été cloné sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose et exprimé par *E. coli*. L'activité hémolytique du clone a été déterminée par simple observation sur gélose sang. Ce clone a également permis d'observer l'effet cytotoxique du surnageant de culture sur différentes lignées cellulaires, par quantification de la relâche de LDH. Le gène *sty4221* a été muté chez la souche sauvage de Typhi, ISP1820, l'implication pathogénique du gène a ainsi pu être étudiée. Des tests de phagocytose, d'invasion et de survie dans des macrophages humains ont été effectués, ainsi que des tests d'adhésion et d'invasion sur des cellules HeLa. Par ailleurs, une première tentative de purification de la protéine a été entreprise. En somme, nous savons maintenant que STY4221 a des propriétés hémolytiques, augmentées par la présence de cystéine. De plus, STY4221 a un effet cytotoxique sur les macrophages THP-I, mais aucun effet sur les HeLa. Or, *sty4221* ne semble pas impliqué dans les étapes d'adhésion, d'invasion, de phagocytose ou de survie. La caractérisation de *sty4221* permettra sans doute d'approfondir nos connaissances sur les toxines trouvées uniquement chez Typhi.

**Mots-clés** : Hémolysine, aminotransférase I/II, cytotoxicité, STY4221, fièvre typhoïde

## Abstract

*Salmonella enterica* serovar Typhi (Typhi) is a human restricted pathogen causing typhoid fever, a systemic infection. Annually, at least 16 million new cases with 600,000 associated deaths are reported. It has been demonstrated that *Salmonella* has to survive in the macrophages of its host, in order to produce a systemic disease. This ability to cause a disseminated infection in human is unique to Typhi. Our laboratory had isolated 36 genes that were unique to Typhi (absent from Typhimurium's genome), and that were expressed during human macrophages infection. One of these genes, *sty4221*, a putative aminotransferase, was of high interest since it shares sequence similarities with a known hemolysin (Hly), which also possesses an aminotransferase activity. That hemolysin is produced by *Treponema denticola*, it catabolizes cysteine and produces H<sub>2</sub>S, a toxic metabolite for the host. Our hypothesis is that host specificity and the ability to cause a systemic infection might be explained by the expression of genes that are not found in other salmonellas. The goal of this study was to characterize the gene *sty4221*, in terms of hemolytic and cytotoxic activity and to determine its role in virulence. The *sty4221* gene has been cloned in a vector under an arabinose inducible promoter and transformed in a strain of *E. coli*. The hemolytic activity has been investigated on blood-agar medium. To evaluate the cytotoxicity of the STY4221 protein on human cultured cells, direct observation by photonic microscopy was done. The cytotoxicity activity on human cultured cells has been quantitatively measured with a lactate dehydrogenase release assay. Moreover, the *sty4221* gene has been deleted in order to study its implication in the infection and the survival within human macrophages and for adhesion/invasion on epithelial. Protein purification was also attempted. We now know that protein STY4221 has a hemolytic activity that is enhanced by cysteine. Also, we proved that the expression of *sty4221* has a cytotoxic effect on THP-I macrophages, but not on epithelial HeLa cells. Meanwhile, *sty4221* does not seem to be important during adhesion, invasion, infection nor survival. The characterization of protein STY4221 might extend the list of known exotoxin of Typhi.

**Key Words:** Hemolysin, aminotransferase I/II, cytotoxicity, STY4221, typhoid fever

## Table des matières

	<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>iv</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
	<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>vii</b>
	<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>vii</b>
	<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES</b> .....	<b>ix</b>
	<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>x</b>
<b>1.</b>	<b>CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	<b>1</b>
1.1	INTRODUCTION.....	1
1.2	LES SALMONELLES.....	2
1.2.1	<i>Description</i> .....	2
1.2.2	<i>Salmonella enterica</i> .....	4
1.2.3	<i>Comparaison entre Typhi et Typhimurium</i> .....	6
1.3	LES SALMONELLOSES LES PLUS COMMUNES.....	9
1.3.1	<i>Les gastro-entérites</i> .....	9
1.3.2	<i>La fièvre typhoïde</i> .....	11
1.3.2.1	Épidémiologie .....	11
1.3.2.2	Transmission et facteurs de risque.....	12
1.3.2.3	Pathogenèse.....	13
1.3.2.4	Sémiologie.....	16
1.3.2.5	Traitement, diagnostic et prévention .....	18
1.4	RELATION ENTRE L'HÔTE ET LE PATHOGENE.....	22
1.4.1	<i>Mécanisme de défense de l'hôte</i> .....	22
1.4.2	<i>Facteurs de virulence</i> .....	24
1.4.2.1	Motilité .....	25
1.4.2.2	Résistance à l'acide et aux peptides antimicrobiens .....	27
1.4.2.3	Adhésion cellulaire.....	29
1.4.2.4	<i>Salmonella Pathogenicity Island (SPI)</i> .....	32
1.4.2.5	Antigène Vi .....	38
1.4.2.6	Toxines .....	40
1.5	MÉTHODES D'IDENTIFICATION DE GÈNES EXPRIMÉS <i>IN VIVO</i> .....	43
1.6	PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....	46
<b>2.</b>	<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>50</b>
<b>3.</b>	<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS</b> .....	<b>62</b>
<b>4.</b>	<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</b> .....	<b>77</b>
<b>5.</b>	<b>CHAPITRE 5 : CONCLUSION</b> .....	<b>85</b>
	<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>86</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU I : EXEMPLES DE LA DIVERSITÉ D'HÔTES DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> .....	5
TABLEAU II : PRINCIPALES DIFFÉRENCES ENTRE TYPHI ET TYPHIMURIUM.....	8
TABLEAU III : COMPLICATIONS DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE .....	18
TABLEAU IV : MÉCANISMES UTILISÉS PAR <i>SALMONELLA</i> CONTRE LES DÉFENSES DE L'HÔTE.....	25
TABLEAU V : PROTÉINES EFFECTRICES SÉCRÉTÉES PAR SPI-1 ET/OU SPI-2 DE TYPHIMURIUM. ....	37
TABLEAU VI : SOUCHES ET PLASMIDES SÉLECTIONNÉS UTILISÉS DANS LE CADRE DE CETTE ÉTUDE.....	51
TABLEAU VII: COMPARAISON DES CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES DE LA PROTÉINE STY4221 ET HLY À PARTIR DE LEUR SÉQUENCE D'ACIDES AMINÉS DÉDUITE. ....	64

## Liste des Figures

FIGURE 1: ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE DE <i>SALMONELLA</i> .....	3
FIGURE 2: GÉNOME DE TYPHI.....	7
FIGURE 3: ÉPIDÉMIE DE GASTRO-ENTÉRITES DUES À <i>S. SAINTPAUL</i> AUX ÉTATS-UNIS.....	10
FIGURE 4: INCIDENCE MONDIALE DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE.....	12
FIGURE 5: INVASION CELLULAIRE PAR <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SÉROVAR TYPHIMURIUM.....	14
FIGURE 6: LE CYCLE DE PATHOGENÈSE DE TYPHI.....	16
FIGURE 7 : DISTRIBUTION MONDIALE DE LA RÉSISTANCE DE TYPHI AUX ANTIBIOTIQUES.....	20
FIGURE 8 : RÉGULATION DE LA VIRULENCE PAR LE SYSTÈME À DEUX COMPOSANTES, PHOPQ.....	28
FIGURE 9: STRUCTURE CHIMIQUE DU LPS DE TYPHIMURIUM.....	29
FIGURE 10 : STRUCTURE DE LA MEMBRANE EXTERNE DE TYPHI.....	31
FIGURE 11: SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE TROIS DE TYPHIMURIUM.....	35
FIGURE 12: CHANGEMENTS INDUITS DANS LA CELLULE HÔTE PAR <i>SALMONELLA ENTERICA</i> .....	36
FIGURE 13 : SCHÉMA DES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE SCOTS.....	45
FIGURE 14 : RÉGION GÉNOMIQUE <i>STY4216</i> À <i>4222</i> .....	48
FIGURE 15 : PLASMIDE INDUCTIBLE À L'ARABINOSE ET CLONE.....	63
FIGURE 16 : COMPARAISON DU GÉNOME DE TYPHI À CELUI DE TYPHIMURIUM ET <i>E. COLI</i> .....	65
FIGURE 17 : ALIGNEMENT DE LA SÉQUENCE D'ACIDES AMINÉS DE L'HÉMOLYSINE <i>STY4221</i> ET AUTRES AMINOTRANSFÉRASES.....	66
FIGURE 18 : TEST D'HÉMOLYSE SUR GÉLOSE SANG.....	67
FIGURE 19 : TEST D'AMPLIFICATION D'HÉMOLYSE PAR LA CYSTÉINE.....	68
FIGURE 20 : TEST DE CYTOTOXICITÉ SUR CULTURES CELLULAIRES DE THP-1 ET HELa.....	70
FIGURE 21: DÉTERMINATION DE L'EFFET CYTOTOXIQUE DE <i>STY4221</i> SUR LES MACROPHAGES THP-I.....	71
FIGURE 22 : TEST D'INFECTION DE MACROPHAGES HUMAINS THP-1.....	73
FIGURE 23. TEST D'ADHÉSION ET D'INVASION SUR CELLULES HELa.....	74
FIGURE 24 : VISUALISATION DE LA PROTÉINE <i>STY4221</i> RECOMBINANTE.....	76



## Liste des sigles et des abréviations

A.A.	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
AGL	Acide gras libre
AMP	<i>AntiMicrobial Peptide</i>
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ATR	<i>Acide Tolerance Response</i>
CDC	<i>Center of Disease Control</i>
CDT	<i>Cytolethal Distending Toxin</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
DAP	Acide diaminopimélique
DMEM	<i>Dulbecco's Modification Eagle's Medium</i>
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>
GAP	<i>GTPase-Activating Protein</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IP	Îlot de pathogénicité
IPTG	Isopropyl-bêta-thio-galactoside
IVIAT	<i>In Vivo Induced Antigen Technology</i>
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactate déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
LSPQ	Laboratoire de santé publique du Québec
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
NARST	<i>Nalidixi-Acid-Resistant Salmonella Typhi</i>
NLR	<i>NOD-Like Receptor</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
OMV	<i>Outer Membrane Vesicle</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PLT	<i>Pertussis-Like Toxin</i>
PMN	Polymorphonucléaire (leucocyte)
rEPA	<i>Recombinant Exotoxin of Pseudomonas aeruginosa</i>
SIF	<i>Salmonella Induced Filament</i>
<i>S. Typhi</i>	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhimurium
SCV	<i>Salmonella Containing Vacuole</i>
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i>
SST3	Système de sécrétion type 3
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
VPH	Virus du Papillome Humain

À tous ceux qui croient que le hasard n'existe pas,

## Remerciements

Je profite de cette opportunité pour remercier mon père, ma mère, Fafanne, Charly et Judo BrasCo pour leur support inconditionnel, tout au long de mon cheminement dans l'univers passionnant qu'est la microbiologie. Sans vos encouragements au quotidien, mon parcours aurait été bien plus ardu.

Je veux également remercier les mentors que j'ai eus tout au long de ma formation en science, Guy Rouleau, Maryse Simoneau, Karine Boisvert, Sébastien Faucher, Maxime Béland, Katherine Poirier, Charles Dozois, Barbara Augustin et Mélissa Caza. Leur passion et leur amour pour les sciences fondamentales ont grandement influencé et inspiré mon désir de poursuivre des études supérieures.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers France Daigle qui m'a accueillie dans son laboratoire. Un merci tout spécial à Chantal, ma complice dans tous les crimes, à Christine et à Sébastien pour leurs encouragements incessants.

# 1. Chapitre 1 : Revue de littérature

## 1.1 Introduction

Depuis les années 1940, l'opinion publique et même la communauté scientifique, jusqu'à récemment, ont voulu croire que la lutte contre les bactéries était gagnée. Or, il est évident que malgré la disponibilité de nombreux produits; antibiotiques, antiseptiques et autres bactéricides d'usage commerciaux ou résidentiels, les bactéries nous survivront.

En effet, nous assistons, depuis quelques années déjà, à une démonstration de la versatilité et de l'omniprésence bactérienne. Ainsi, nous sommes aux prises avec de nombreux cas d'infections nosocomiales, souvent fatales. De plus, nous observons une recrudescence des infections que nous pensions avoir pratiquement éradiquées, tout comme l'apparition de nouvelles pathologies bactériennes. Qui plus est, certains antibiotiques que nous utilisons se voient maintenant inefficaces pour traiter des infections courantes, et cela est dû d'une part à l'utilisation que nous en faisons, mais également par les capacités évolutives et génétiques dont sont dotées les bactéries.

De toute évidence, un nouvel effort devra être fait afin d'approfondir nos connaissances théoriques dans le domaine de la pathogenèse bactérienne. Et ce, non seulement par soif de savoir, mais également afin de s'outiller pour faire face à une problématique éminente.

## 1.2 Les Salmonelles

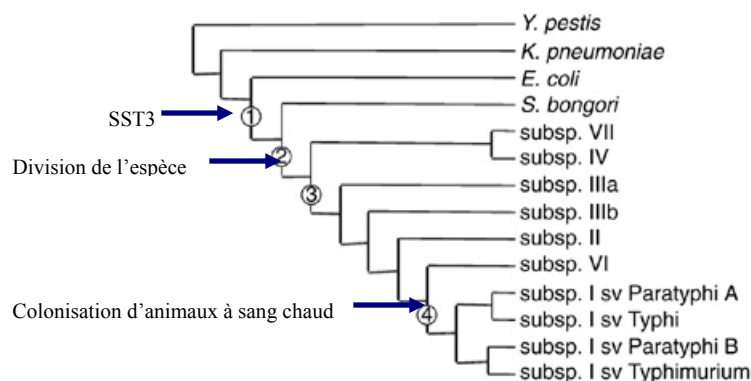
### 1.2.1 Description

Dès les premiers temps de la microbiologie, le genre *Salmonella* a suscité l'intérêt des chercheurs tout comme des cliniciens. D'une part, dû à sa grande diversité antigénique qui souleva nécessairement un défi taxonomique, et d'autre part, en raison des nombreuses maladies qui lui sont associées, tant chez l'humain que chez les animaux [6].

Le genre *Salmonella* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, dans la subdivision des gamma-protéobactéries [11], par ce fait même, elle s'inclut dans un groupe de bactéries très communes et largement répandues, au même titre que *Shigella* et *Escherichia coli* [6]. Ainsi, *Salmonella* partage près de 90% d'homologie de séquence avec *Escherichia coli* [6]. Conséquemment, certaines informations concernant le métabolisme de *Salmonella* découlent des découvertes faites chez *E. coli* [38]. *Salmonella* est un bâtonnet flagellé intracellulaire facultatif, un Gram négatif et un anaérobe facultatif. Cette bactérie a une croissance optimale à 37 °C et est dotée d'un métabolisme oxydatif ainsi que fermentatif [38]. Il est possible de distinguer *Salmonella* des autres bactéries entériques, entre autres grâce à son incapacité à métaboliser le sucrose et le lactose [38], mais également à sa production de sulfure d'hydrogène [38].

La classification du genre *Salmonella* a longtemps été déterminée par sérotypage des structures antigéniques O (lipopolysaccharide), H (flagelline) et Vi (capsule) [38]. Cette technique s'est avérée fort utile, à l'époque, lors de contrôles épidémiologiques

ou dans les plans de traitement clinique [6]. Dans le but de simplifier la nomenclature associée, il a été proposé (Le Minor et Popoff) de diviser le genre en deux espèces soit : *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori* [86]. *Salmonella enterica* est composé de six sous-espèces (subsp.) soit : I, II, III, IV, VI, VII (voir figure 1); qui elles-mêmes incluent différents sérovars dépendant du sérotypage [38]. Or, ce système d'appellation est encore utilisé actuellement et l'on dénombre aujourd'hui plus de 2500 sérovars chez *Salmonella enterica* à elle seule [6, 115].



**Figure 1: Arbre phylogénétique de *Salmonella*.**

1) Acquisition du SST3-1. 2) Divergence des deux espèces de salmonelles. 3) Acquisition d'un système variable d'expression des flagellines. 4) Capacité à infecter les animaux à sang chaud. (Tirée et adaptée de : [8]et [117])

D'un point de vue médical, les salmonelles peuvent coloniser virtuellement tous les animaux, tels que : la volaille, les reptiles, le bétail, les rongeurs, les animaux domestiques et les oiseaux [103]. La propagation animal-animal et la contamination de la nourriture des animaux assurent le maintien d'un réservoir animal [103]. Chez l'humain, les principales sources d'infections résultent de la consommation de nourritures (volaille, œufs, produits laitiers, autres aliments par contamination croisée) ou d'eau contaminée ou via une propagation fécale-orale [103, 107]. Chez l'homme, les salmonelles sont généralement associées à quatre types de

manifestations cliniques, soit : la gastro-entérite, la septicémie, la fièvre entérique ou encore une colonisation asymptomatique [103]. La distribution des salmonelloses est mondiale; dans les pays tempérés, on observe une recrudescence d'infection durant les mois les plus chauds de l'année [103]. Depuis 1997, le Québec s'est doté d'un programme de surveillance des infections à *Salmonella* sp. [19]. En 2006, le laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) a reçu plus de 900 souches, les sérotypes les plus fréquents étaient Enteritidis, Heidelberg et Typhimurium [19]. Parmi les souches isolées d'hémocultures, les sérotypes Typhi, Paratyphi B var. Java et SaintPaul étaient également retrouvés [19].

L'étude d'un tel micro-organisme est riche en retombées pour la communauté scientifique. D'une part, la conception d'un vaccin contre la fièvre typhoïde, une maladie mortelle, en serait nécessairement facilitée [34, 151]. D'autre part, les données accumulées sur la pathogenèse de *Salmonella* permettraient certainement de mieux comprendre les mécanismes utilisés par d'autres micro-organismes intracellulaires, tels que : *Mycobacterium* sp. ou *Brucella* sp. Parallèlement, des études sont en cours, utilisant *Salmonella* comme vecteur antigénique à titre de vaccin contre d'autres pathogènes [160].

### **1.2.2 *Salmonella enterica***

Il est à savoir que 99% des cas de salmonelloses chez l'homme sont dues à une infection par *Salmonella enterica* subsp. I [38, 116]. Entre eux, les membres de ce sous-groupe diffèrent au point de vue de leur séquence génomique uniquement par environ un pourcent [6]. Cette sous-espèce englobe plusieurs sérovars possédant un

ancêtre commun ayant acquis la capacité de coloniser les vertébrés à sang chaud (voir fig. 1) [9, 38]. Cette caractéristique évolutive est déterminante au niveau de la santé humaine. La sous-espèce I de *Salmonella enterica* pourrait, en pratique, être subdivisée davantage en fonction du spectre d'hôtes. Ainsi, on regroupe sous l'appellation « généralistes » les sérovars capables d'infecter un grand nombre d'animaux différents et de provoquer différentes maladies [39]. Tandis que les souches infectant un nombre limité d'espèces animales seraient plutôt « hôte-adaptés » [38]. Conséquemment, les sérovars qui infectent uniquement une espèce animale sont dits « hôte-spécifiques » [38]. Quelques représentants d'une telle subdivision, les mieux connus dans la littérature, sont décrits dans le tableau I [25, 39, 141, 150].

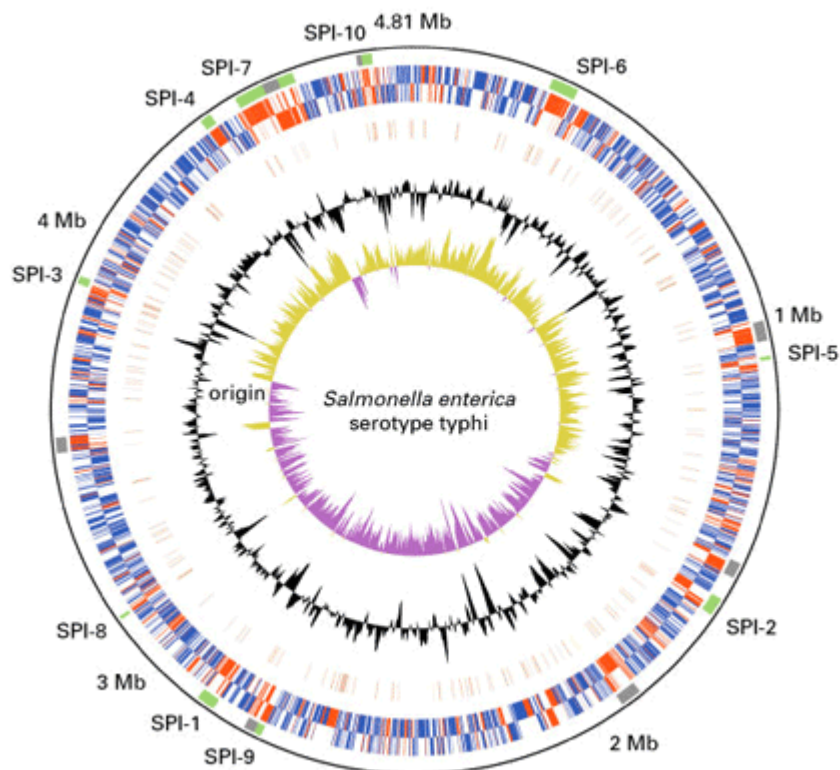
**Tableau I : Exemples de la diversité d'hôtes de *Salmonella enterica*.**

Catégories	Sérovars	Hôtes
Généralistes	Enteritidis	Les rongeurs, la volaille, le bétail, l'homme, les porcins, etc
	Typhimurium	
Hôtes-adaptés	Choleraesuis	Les porcins et autres hôtes occasionnels
	Dublin	Les bovins et autres hôtes occasionnels
	Arizonae	Les reptiles et autres hôtes occasionnels
Hôtes-spécifiques	Typhi	Homme
	Paratyphi A et C	
	Pullorum	La volaille



### 1.2.3 Comparaison entre Typhi et Typhimurium

*Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (le nom Typhimurium sera désormais utilisé), dont la formule antigénique est : O : 01, 04, 05, 12; H : i : 01, 02 [38], a été nommé ainsi puisque cet agent causait des symptômes semblables à la fièvre typhoïde chez les souris (murium) [54, 65]. Typhimurium a la capacité de coloniser différents hôtes sans nécessairement être pathologique, tel qu'indiqué au tableau I. Il est également possible de retrouver ce sérovar sur des produits maraîchers ainsi que des produits transformés suite à une contamination par de l'eau souillée ou une contamination croisée respectivement [151]. C'est en 1880, que le docteur Karl Joseph Eberth fit la découverte du bacille typhique [1, 24], aujourd'hui connue sous le nom de *Salmonella enterica* sérovar Typhi (le nom « Typhi » sera désormais utilisé). Ce micro-organisme détient la formule antigénique : O : 09, 12; H : d; Vi + [109], est mobile grâce à des flagelles péritriches et ne produit pas de gaz lors de la fermentation du glucose ou autre sucre [11]. En plus, ce sérovar est auxotrophe pour les acides aminés cystéine et tryptophane. Dans la nature, cette espèce bactérienne est strictement retrouvée chez l'homme [38], donc il s'agit d'un pathogène hôte-spécifique [12, 38, 151].



**Figure 2: Génome de Typhi.**

Représentation graphique du génome de *Salmonella enterica* sérovar Typhi et ses îlots de pathogénécité (SPIs) (Tirée de [109] et [110])

Évidemment, la grande majorité des notions que nous détenons sur la pathogénèse de Typhi sont des inférences provenant de ce qui a été observé pour Typhimurium dans un modèle de souris susceptibles ou des volontaires humains. Bien que ces deux sérovares aient un génome étroitement apparenté [6, 109, 147], des différences majeures subsistent, et ce, non seulement au niveau génomique, mais également dans l'expression de leur virulence respective. En 2001, les séquences génomiques des sérovares Typhi CT18 (Fig. 2) [109] et Typhimurium LT2 [93] sont enfin devenues accessibles et par le fait même ont facilité l'étude de ces deux micro-organismes. Nonobstant, près de 20% des gènes codants du génome de Typhi (Fig. 2) ont une fonction inconnue [109]. De plus, la disponibilité des deux génomes a permis de

mettre en évidence que le génome de Typhi était identique à celui de Typhimurium à 86,9 % [109]. D'un point de vue génétique, 601 gènes de Typhi étaient absents chez Typhimurium [109]. Étonnamment, 204 pseudogènes ont été découverts au sein de la séquence d'ADN de Typhi, alors que 145 de ces pseudogènes sont intacts et actifs chez Typhimurium [109]. De manière générale, des inversions, des insertions et des zones de répétitions dissemblables sont également observables entre le génome de Typhi et celui de Typhimurium [6]. De plus, Typhimurium possède un plasmide (pSLT) portant de nombreux gènes impliqués dans la virulence de ce pathogène [93, 126]. Ce sérovar possède quatre séquences de prophages, dont deux phages lysogènes : Gifsy-1 et 2 qui contribuent également à la virulence de Typhimurium [45, 85, 126]. Le sérovar Typhi ne détient pas le vecteur pSLT, mais possède 7 séquences de prophages dans son génome [20, 38, 109, 126]. Bien qu'apparentés, ces deux sérovars possèdent de nombreuses différences telles qu'en témoigne le tableau II.

**Tableau II : Principales différences entre Typhi et Typhimurium**

	Typhi	Typhimurium
Pathologie associée	Fièvre Typhoïde (systémique)	Gastro-entérite (localisée)
Réservoir	Porteurs humains asymptomatiques	Volailles, bétail, etc
Spécificité d'hôte	Spectre étroit	Spectre large
Modèle d'étude animal	Aucun	Souris
Îlots de pathogénicité identifiés	18	12
Antigène Vi	Présent	Absent
Plasmide de virulence (pSLT)	Absent	Présent
Biosynthèse organique	Auxotrophe	Prototrophe

Références : [11, 33, 109, 116, 128]

## **1.3 Les salmonelloses les plus communes**

### **1.3.1 Les gastro-entérites**

Les gastro-entérites sont une préoccupation importante de santé publique dans les pays industrialisés [103]. Cette affection localisée est due le plus fréquemment aux sérovars Typhimurium et Enteritidis [19, 23, 85, 103]. Chaque année aux États-Unis, plus de 1,4 million de nouveaux cas de salmonelloses de types entériques sont enregistrés et 40 000 sont confirmés en laboratoire [23]. Cette incidence est sous-estimée, puisqu'il est ici question d'une indisposition qui se résorbe d'elle-même en peu de temps et pour laquelle les individus atteints n'iront pas consulter d'emblée [103]. Actuellement, le centre de contrôle des maladies infectieuses américain (CDC) est en alerte maximale, suivant l'évolution de ce qui pourrait être une épidémie multiétats d'intoxication alimentaire par *Salmonella enterica* sérovar SaintPaul, tel que le montre la figure 3 [23]. Des tomates contaminées provenant des États-Unis seraient en cause [23]. Le Québec s'est doté d'un programme de labovigilance des infections spécifiquement à Typhimurium en 1999 [19], lors de l'apparition du lysotype 104 résistant à de nombreux antibiotiques [19]. En 2006, des 964 souches de *Salmonella sp.* reçues, 18 % appartenaient au sérovar Typhimurium [19].



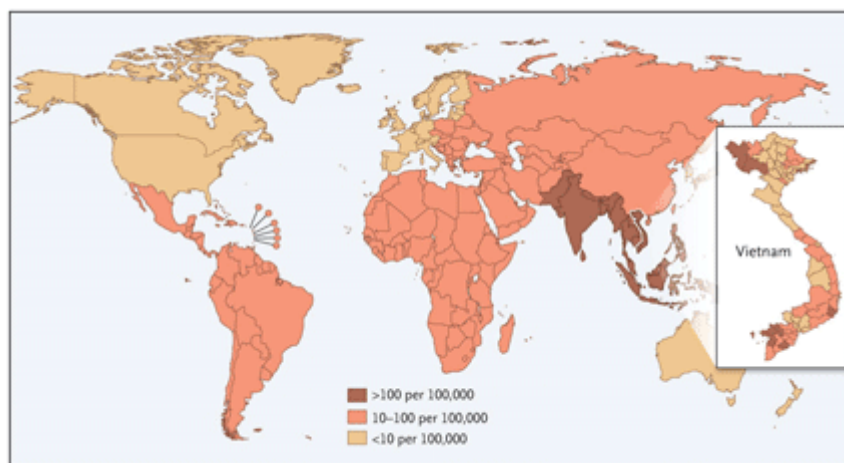
groupes d'âge et toutes les classes économiques. La prévention de ce type d'infection est en grande partie sanitaire, soit par l'inspection adéquate des aliments de consommation et l'éducation du public.

### **1.3.2 La fièvre typhoïde**

#### **1.3.2.1 Épidémiologie**

Typhi est l'agent étiologique de la fièvre typhoïde, une infection systémique chez l'homme [147]. Cette maladie demeure un problème persistant de santé publique majeur dans plusieurs régions de la planète (voir Fig. 4) [27, 34, 65]. Effectivement, l'organisation mondiale de la santé (OMS), estime qu'il y aurait entre 16 et 33 millions de nouveaux cas par année auxquels seraient associés entre 500 000 et 600 000 décès [151]. Une étude conservative a estimé qu'en 2000, il y aurait eu 22 millions de cas et 216 000 décès en lien avec une infection par Typhi [27]. Globalement, l'incidence de la fièvre typhoïde serait très élevée ( $> 100$  cas/100 000 personnes-année) dans le centre-sud de l'Asie, dans l'Asie orientale, et possiblement dans le sud de l'Afrique. L'incidence serait moyenne (10-100 cas/100 000 personnes-année) dans le reste de l'Asie, en Afrique, en Amérique Latine et en Nouvelle-Zélande [34]. Des zones endémiques sont retrouvées dans ces régions, là où les réseaux sanitaires sont déficients ou voire absents [147]. Il n'est pas exclu que des épidémies de fièvre typhoïde puissent également survenir dans ces régions. Parallèlement, dans les pays industrialisés, cette infection systémique est rare et figure sur la liste des maladies à déclaration obligatoire au Québec [19]. La mortalité correspondant à cette infection varie en fonction de la région, mais des données

conservatives tendent à démontrer qu'elle se situe près de 1 % [28]. Pourtant, 60 à 90 % des individus souffrant de la typhoïde ne recevront aucune aide médicale ou seront traités en consultation externe [110]. La plupart des patients atteints de fièvre typhoïde qui se présentent à l'hôpital sont des enfants ou des jeunes adultes âgés entre 5 et 25 ans.



**Figure 4: Incidence mondiale de la fièvre typhoïde.**

Représentation géographique de l'incidence de la fièvre typhoïde dans le monde en 2000, par 100 000 habitants. (Tirée de : [34])

### 1.3.2.2 Transmission et facteurs de risque

L'être humain est le seul hôte naturel et réservoir de *Typhi* [38]. La dose infectieuse varie entre  $10^3$  et  $10^6$  [103]. La transmission de l'infection se fait via l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminées dans les pays en voie de développement alors qu'en pays développés l'infection est souvent due à des porteurs chroniques, des voyages récents en zone à risque, ou du fait de travailler en laboratoire avec cette espèce [151]. Au Canada, la fièvre typhoïde figure au deuxième rang des infections de laboratoire le plus souvent signalées, 256 cas d'infection en milieu de travail ont été enregistrés, auxquels sont associés 20 décès [4]. Parmi les

autres facteurs de risque reconnus, notons que des antécédents d'infection à *H. pylori* seraient également associés à une augmentation de susceptibilité de l'hôte [13, 144]. Contre toute attente, les gènes liés au HLA seraient également impliqués. Ainsi, HLA-DRB1\*0301/6/8, HLA-DQB1\*0201-3 et TNFA\*2 sont associés à une plus grande susceptibilité à la fièvre typhoïde [36]. Contrairement à HLA-DRB1\*04, HLA-DQB1\*0401/2 et TNFA\*1 qui semblent conférer une résistance à l'infection [36].

### 1.3.2.3 Pathogenèse

Plusieurs sérovars de *Salmonella enterica* peuvent envahir la surface de la muqueuse intestinale. Toutefois, Typhi a évolué en acquérant la capacité de se disséminer à l'intérieur de l'organisme humain, pour ainsi infecter des tissus profonds [109]. Encore aujourd'hui, les mécanismes utilisés par Typhi lors de l'infection ne sont pas tous connus. Par contre, les grandes étapes de la pathogenèse de la fièvre typhoïde sont bien documentées.

En premier lieu, l'entrée de Typhi dans l'organisme se fait par voie orale [151]. Une fois entré, Typhi chemine dans le tractus digestif, jusqu'au niveau de l'iléon terminal où le micro-organisme adhère à la muqueuse intestinale, probablement grâce à ses fimbriae et la diversité de ses adhésines [61]. Des études ont démontré que le récepteur *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein* (CFTR) serait impliqué dans l'adhérence de Typhi [114]. Ainsi, une fois adhérees à la surface, les salmonelles sont aptes à traverser l'épithélium via trois routes différentes. Premièrement, les salmonelles ont la capacité de forcer leur entrée



dans les entérocytes non phagocytiques via une endocytose médiée par un système de sécrétion de type 3 (SST3). Ce système et ses effecteurs protéiques associés perturbent la membrane épithéliale causant une disparition des microvilli de l'épithélium intestinal et une ondulation (*ruffling*) de la membrane menant à l'internalisation de la bactérie (voir fig. 5). Un second moyen se fait via les cellules dendritiques retrouvées intercalées entre les entérocytes [15]. Or, Typhi semble avoir un tropisme pour les cellules M [78], cellules phagocytaires, situées au niveau des plaques de Peyers. Ces plaques sont en plus grands nombres dans la région de l'iléon terminal de l'intestin grêle.



**Figure 5: Invasion cellulaire par *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium.**

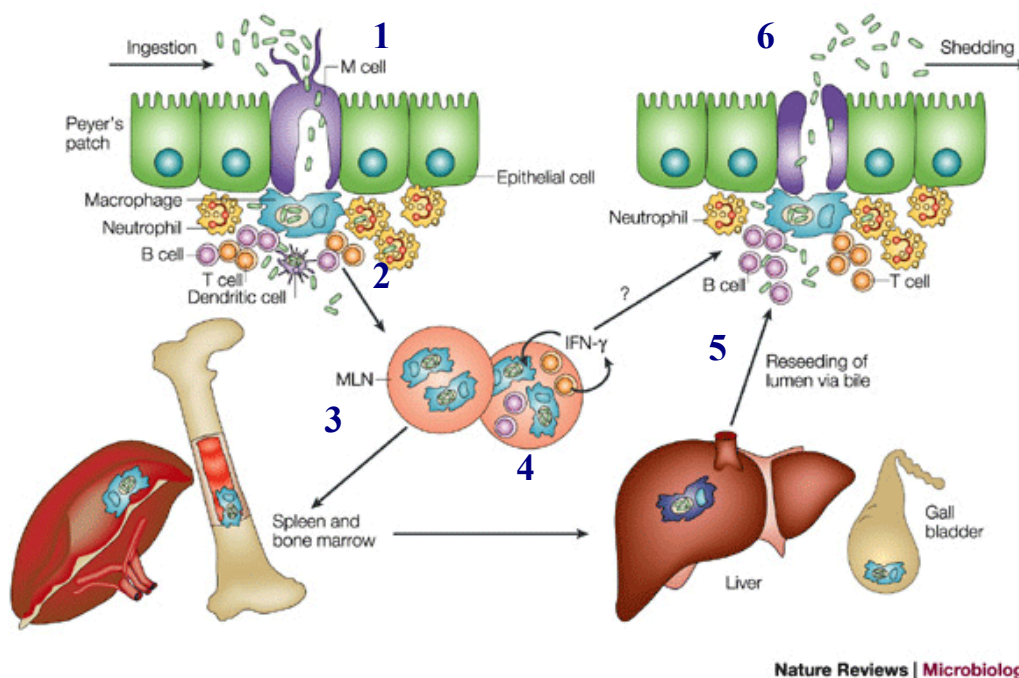
*S. Typhimurium* (en rouge) utilise un SST3-1 pour forcer son entrée dans la cellule, une ondulation (*ruffling*) de la membrane (jaune) s'observe à ce moment. (Tirée de : Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH)

*In vitro*, *Salmonella* est capable de perturber les jonctions serrées entre les cellules épithéliales, provoquant le libre passage des ions, de l'eau et des cellules immunitaires; cela contribue à l'induction de la diarrhée [61]. Une fois à l'intérieur de la cellule M, Typhi a traversé la barrière intestinale sans interagir directement avec l'épithélium (voir Fig. 6-1). Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi des troubles entériques sont rarement associés à la fièvre typhoïde. Cette invasion permettra à

Typhi d'atteindre le tissu lymphoïde intestinal, puis d'être drainé vers les ganglions mésentériques, et ensuite le conduit thoracique [12, 110]. Cette bactériémie primaire permet à Typhi d'atteindre le foie, la rate, la moelle osseuse et d'autres parties du système réticuloendothélial (voir fig. 6-2,3) où le micro-organisme survit dans la lignée monocyttaire (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, etc) [12, 65, 110].

La survie et la réplication de Typhi se fait dans un compartiment cellulaire nommé *Salmonella containing vacuole* (SCV) dans les macrophages [124]. Pour ce faire, la participation d'un second SST3 et de nombreux autres facteurs de virulence, qui seront décrits plus loin, sont nécessaires. La persistance de Typhi dans les macrophages permet à la bactérie de se disséminer dans l'organisme [65]. Suite à la multiplication dans les macrophages, les bactéries sont à nouveau relâchées dans la circulation. Cette seconde bactériémie, est plus importante et est suivie par le début de la maladie soit 7 à 15 jours plus tard [110]. Une infection secondaire a lieu, les sites les plus communs sont le foie, la rate, la moelle osseuse, la vésicule biliaire et les plaques de Peyers (voir fig. 6-4) [110]. Contrairement à d'autres micro-organismes, Typhi est reconnu pour sa capacité à persister dans l'hôte pour une longue période, et même pour toute une vie, si l'infection n'est pas traitée. Conséquemment, il est supposé que Typhi serait dans un compartiment cellulaire dans la vésicule biliaire, toutefois le type de cellule infectée n'est toujours pas connu. Une fois la vésicule biliaire colonisée, il est alors possible pour Typhi de regagner la lumière intestinale pour être excrété dans les fèces ou encore réinfecter les entérocytes (voir Fig. 6-5, 6) [110]. Une fois ce stade atteint, des ulcérations du colon

sont parfois observables, ce processus est souvent irréversible et mène à la mort du patient [110].



**Figure 6: Le cycle de pathogenèse de Typhi.**

Schéma de la persistance de l'infection par Typhi. **1)** Entrée dans les plaques de Peyer via les cellules M. **2)** Inflammation, phagocytose et survie dans les macrophages. **3)** Colonisation des tissus profonds (rate et moelle osseuse). **4)** Colonisation parfois permanente des ganglions mésentériques ou de la vésicule biliaire. **5)** Dissémination et réinfection des entérocytes via la bile. **6)** Excrétion de la bactérie via les fèces. (Tirée et adaptée de : [99])

#### 1.3.2.4 Sémiologie

Dans les zones du globe où cette infection est endémique, les premiers symptômes de la fièvre typhoïde sont souvent confondus avec d'autres maladies tropicales répandues comme la dengue ou la malaria [147]. La sévérité de la maladie est dépendante de nombreux facteurs, tels que : la durée de la maladie avant l'initiation du traitement, le choix du traitement, l'âge du patient, les antécédents de vaccination ou d'exposition à Typhi, la virulence de la souche, l'inoculum, la prise

d'antiacides ou encore l'état du système immunitaire, pour ne nommer que ceux-là [151].

L'ingestion de Typhi est habituellement suivie d'une période asymptomatique variable de 10 jours à un mois [110]. Le début de la bactériémie s'accompagne de fièvre et de malaise. De manière caractéristique, les patients se présentent avec de la fièvre, des symptômes s'apparentant à la grippe, des frissons, de la toux sèche, des céphalées, de l'anorexie, de la nausée et de la myalgie [110]. La fièvre associée à cette pathologie est initialement de faible intensité, mais augmente en intensité et est persistante durant la deuxième semaine ( $>38^{\circ}\text{C}$ ) et peut durer jusqu'à quatre semaines si elle n'est pas traitée [110]. Des tâches rosées, lésions érythémateuses d'environ 2 à 4 mm de diamètre, peuvent également apparaître au niveau de l'abdomen et de la poitrine du patient [110]. Parmi les autres signes physiques observables à l'examen, l'on retrouve une sensibilité vague au niveau de l'abdomen, une hépatomégalie, une splénomégalie et une bradycardie relative. Ces signes physiques ne sont toutefois pas spécifiques à la maladie [110].

Malencontreusement, 10 à 15% des patients atteints développeront des complications des suites de l'infection par Typhi [110]. Les probabilités sont d'autant plus grandes si l'individu a été malade pendant plus de deux semaines. Plusieurs complications ont été décrites (voir Tableau III), néanmoins les plus communes demeurent les saignements gastro-intestinaux, la perforation intestinale et l'encéphalopathie [12, 110]. Généralement, 10% des patients en convalescence d'une typhoïde non-traitée excréteraient du Typhi dans leurs selles jusqu'à 3 mois post-infection [110] et parfois plus qu'un an. Un à quatre pourcent de ces patients

deviendront des porteurs à long terme. Des cas de rechutes, moins sévères que l'infection première, sont aussi observés chez 5 à 10% des patients et surviennent généralement 2 à 3 semaines après la fin de la fièvre. La réinfection par une autre souche de Typhi est également possible. Jusqu'à 25% des porteurs chroniques n'ont pas d'antécédents de fièvre typhoïde [110]. Ces porteurs chroniques sont le plus souvent des femmes ou des personnes âgées ou encore des patients ayant des cholélithiases et ils sont asymptomatiques pour la plupart [151].

**Tableau III : Complications de la fièvre typhoïde.**

Abdominale	Perforation gastro-intestinale Hémorragie gastro-intestinale Hépatite Cholécystite
Cardiovasculaire	Myocardite Choc
Neuropsychiatrique	Encéphalopathie Délire État psychotique Méningite
Respiratoire	Bronchite Pneumonie
Hématologique	Anémie Coagulation intravasculaire disséminée
Autres	Abcès Pharyngite Avortement spontané Rechute

(Tiré et adapté de : [110])

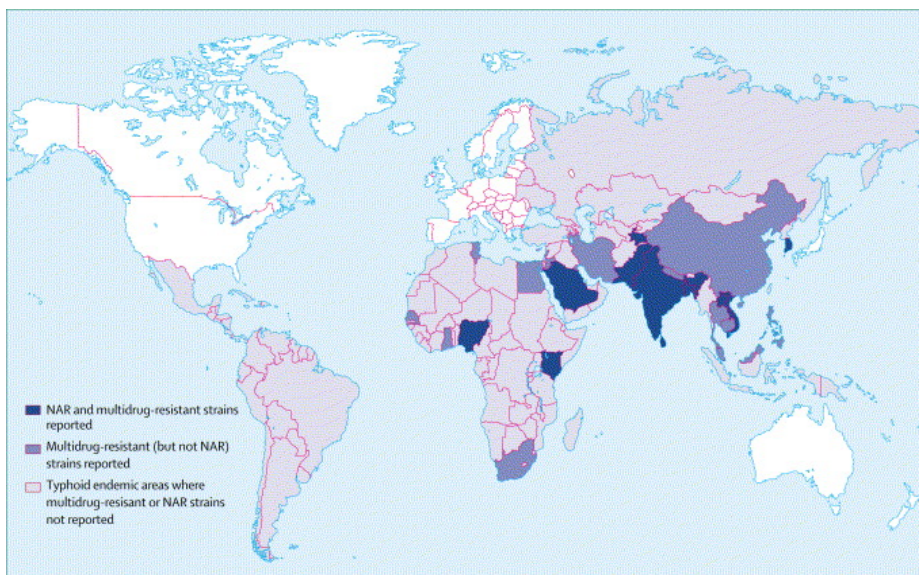
### 1.3.2.5 Traitement, diagnostic et prévention

À titre indicatif, l'incidence et la mortalité associées à la fièvre typhoïde sont comparables aux statistiques du cancer du col utérin causé par le virus du papillome humain (VPH) [34]. Or, contrairement au VPH, Typhi ne figure plus parmi les grandes priorités de santé internationale [34]. Plusieurs facteurs contribuent à cette

négligence apparente, tels que l'introduction d'antibiotiques peu coûteux sur le marché, la sous-estimation de l'importance réelle de la maladie, le caractère endémique de la maladie ainsi que l'absence de campagne de vaccination étendue pour la population cible [34].

Actuellement, le plan de traitement recommandé par l'OMS inclut une réhydratation orale ou parentérale, l'utilisation d'antipyrétique et d'antibiotiques [151]. La mise en marché du chloramphénicol en 1948 [154], avait totalement révolutionné la gestion des cas de typhoïde aiguë, jusqu'en 1972 où des cas d'épidémies de souches résistantes ont été rapportées [14, 97]. Pendant de nombreuses années, le chloramphénicol, l'amoxicilline ou le triméthoprime-sulfaméthoxazole constituaient l'éventail d'antibiotiques de première ligne disponibles dans le traitement de la typhoïde [151]. Cependant, l'avènement de l'ère des fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine, fléroxacin, perfloxacine) permit de résoudre efficacement la problématique occasionnée par les souches de *Typhi* résistantes [151]. Ainsi, les fluoroquinolones sont aujourd'hui considérées comme étant le traitement optimal (98 % taux de guérison) contre la typhoïde. Elles possèdent de nombreux avantages; elles atteignent des doses actives dans les monocytes/macrophages et dans la vésicule biliaire; elles permettent une réponse thérapeutique courte (3 à 5 jours) et sont associées à un faible taux de récurrences et de porteurs chroniques (<2 %). Or, des souches de *Typhi* résistantes à l'acide nalidixique (NARST) ont émergé (voir fig. 7); l'acide nalidixique est un marqueur de susceptibilité aux fluoroquinolones [151]. L'acide nalidixique n'est jamais utilisée pour traiter la typhoïde [151]. Les céphalosporines de troisième génération ainsi que

l'azithromicine sont à l'heure actuelle des alternatives de traitement acceptables dans les cas de fièvre typhoïde non compliquée [151].



**Figure 7 : Distribution mondiale de la résistance de Typhi aux antibiotiques.**  
Données recueillies de 1990 à 2004. (Tirée de : [12])

Les outils de diagnostic, peu variés, sont pratiquement les mêmes utilisés depuis près d'un siècle. Ainsi, les hémocultures, les tests sérologiques (Test de Widal) et les cultures de selles sont encore les tests standards utilisés [14, 147]. L'absence de tests diagnostiques fiables et peu coûteux nuit à l'estimation de l'ampleur réelle de l'impact de la fièvre typhoïde, tout comme à la gestion des cas prévalents. Plus souvent qu'autrement, le diagnostic de fièvre typhoïde est basé sur l'impression clinique du médecin [110]. Pourtant, les symptômes, tels que mentionnés plus haut, de cette maladie sont loin de lui être spécifiques. Il est à noter que la nature endémique de cette infection est un autre désavantage puisqu'elle ne jouira pas de l'attention médiatique ou politique souvent réservée aux maladies épidémiques [34].

Selon l'OMS, le moyen le plus économique et certain de réduire la propagation de la maladie serait encore l'installation de toilettes hygiéniques et l'élaboration d'un vaccin plus efficace, ne nécessitant pas de réfrigération [147, 151]. En premier lieu, la prévention contre la fièvre typhoïde passe nécessairement par l'accès à de l'eau potable non contaminée [151]. Aussi, l'éducation de la population est essentielle, le lavage des mains et la manipulation adéquate de la nourriture devraient lui être inculqués [151]. Les instances dirigeantes devraient voir à l'installation d'un réseau sanitaire approprié. Or, ces mesures simples peuvent s'avérer un investissement majeur, voire impossible pour certains pays. Un vaccin facilement accessible reste alors le seul espoir réaliste pour cette population.

En 1896, le premier vaccin parentéral contre la typhoïde, composé d'une souche tuée, est introduit [40]. Ce premier vaccin s'avérait relativement efficace, toutefois il était associé à de nombreux effets secondaires importants, en grande partie liés aux lipopolysaccharides (LPS) présents. Par conséquent, il fut abandonné comme outil de santé publique [40]. En ce moment, il existe deux vaccins, sécuritaires, efficaces, licenciés et disponibles. L'un consiste en une sous-unité antigénique Vi alors que l'autre est composé d'une souche vivante atténuée de Typhi, Ty21a [151]. Le premier de ces vaccins contient des polysaccharides de la capsule, il est administré en une dose unique sous-cutanée et confère une immunité protectrice d'environ 70%, d'une durée variable d'au moins 3 ans [151]. Le second vaccin est administré par voie orale, sous forme de gélule à enrobage entérique ou d'une solution liquide. Trois ou quatre doses sont à prendre à deux jours d'intervalles, à jeun [151]. Ce vaccin ne peut être donné à des individus dont le système immunitaire



est compromis ou ayant reçu un traitement d'antibiotiques dans les sept jours précédant l'immunisation [151]. L'immunité protectrice que confère le vaccin Ty21a est discutable, son taux varie entre 53 et 96 % en fonction de la région où il est utilisé [151]. Ces vaccins constituent donc une mesure préventive qui s'avère beaucoup plus efficace et adaptée pour les voyageurs de passage dans ces régions endémiques.

Un nouveau vaccin Vi, conjugué à l'exotoxine A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) à titre d'adjuvant, sera disponible dans quelques années. Les essais randomisés à double insu laissent présager un taux de protection de 97% après deux ans. Alors que l'espoir d'un vaccin surgit, le nombre de cas de fièvre typhoïde causé par le sérovar Paratyphi A est grandissant surtout en Asie. Les vaccins à venir devront prendre compte de son importance grandissante [151].

## **1.4 Relation entre l'hôte et le pathogène**

### **1.4.1 Mécanisme de défense de l'hôte**

Le corps humain a évolué de manière à posséder un arsenal important de défense contre les pathogènes de son environnement. En ordre, une bactérie pathogène qui entre par voie orale devra traverser le tractus intestinal et survivre à des milieux qui lui seront on ne peut plus hostiles. Ainsi, ce micro-organisme devra survivre aux enzymes digestives, telles que des protéases et des saccharidases, tout comme aux sels biliaires présents [61]. Le pH extrêmement acide de l'estomac sert généralement de barrière de défense efficace contre les bactéries exogènes. En outre, la surface de lumière intestinale constitue en lui-même un milieu restreignant se caractérisant par une osmolarité élevée et une diffusion d'oxygène limitée.

De plus, le système digestif est protégé par le système immunitaire inné via la sécrétion d'IgA, de peptides antimicrobiens et l'expression de *Toll like receptor* (TLR), pour ne nommer que ceux-là [61]. Les TLR sont des récepteurs transmembranaires reconnaissant des patrons moléculaires conservés associés à des pathogènes (PAMPs) tels que : les LPS, la flagelline, le peptidoglycane et des motifs nucléotidiques [96]. On retrouve dans le cytoplasme des *nucleotide-binding oligomerization domain like receptor* (NLRs), l'équivalent des TLR dans la cellule [54]. L'activation de ces récepteurs mène à une augmentation de l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou de chimiokines. Ces récepteurs se retrouvent à la surface des cellules immunitaires B et T, les cellules présentatrices d'antigène ainsi que les cellules épithéliales. Quant aux peptides antimicrobiens (AMP), il s'agit d'un ensemble de molécules cationiques, d'une longueur variant entre 12 et 50 acides aminés, ayant une charge nette positive et composées jusqu'à 50% d'acides aminés hydrophobes [2, 22]. Ce groupe inclut entre autres : les défensines, les cathélicidines, les histatines, les neuropeptides et d'autres peptides n'ayant pas encore été caractérisés [2]. Les AMPs ont une activité antimicrobienne directe en s'intercalant dans la membrane bactérienne [2]. Mais elles peuvent également activer, modifier ou supprimer la réponse immunitaire de l'hôte [22, 157]. Le tractus gastro-intestinal contient plus de cellules productrices d'anticorps que la rate et les ganglions lymphatiques combinés, et il contribue majoritairement à la production d'IgA dans le corps, sécrétés dans la lumière intestinale [21].

Le système immunitaire acquis est aussi présent au niveau gastro-entérique. En ce sens, du tissu lymphoïde associé à la muqueuse (GALT) prévient l'invasion par des bactéries pathogènes. Ainsi, on retrouve des cellules T et B, des monocytes et des cellules dendritiques dans le tractus intestinal. Dans le même ordre d'idée, il est admis depuis longtemps que la microflore endogène pouvait servir de barrière physique et métabolique à la colonisation par un pathogène exogène [91]. Néanmoins, de plus en plus de chercheurs se penchent sur l'interaction bidirectionnelle qui existe entre la paroi intestinale et la microflore, et l'implication de cette dernière dans diverses pathologies telles que les maladies inflammatoires de l'intestin, le cancer colorectal, mais également dans la susceptibilité aux infections [75].

### **1.4.2 Facteurs de virulence**


Les bactéries pathogènes ont évolué de manière à pouvoir échapper aux mécanismes de défense de leur hôte, et cela, en grande partie grâce à différents facteurs. Une fois de plus, la majorité des notions que nous avons sur les facteurs de virulence découlent de découvertes faites à partir de modèles murins infectés par Typhimurium. Or il est raisonnable de s'attendre à ce qu'il y ait des différences dans le mode d'infection des deux pathogènes. Par exemple, tel que mentionné précédemment, Typhi a une faible propension à causer une diarrhée inflammatoire [65], alors qu'à l'instar de Typhimurium, Typhi exprime tout aussi bien un SST3-1, un SST3-2 et des PAMPs (voir sections suivantes). Ainsi, la motilité, la résistance aux pH acides et aux peptides microbiens, les fimbriae, les îlots de pathogénicité et la présence d'une capsule ne sont que quelques aspects dépeignant sommairement les

mécanismes dont dispose Typhi pour contourner la vigilance du système immunitaire de l'hôte. Un résumé des différents mécanismes utilisés par *Salmonella* pour contrer le système de défense de l'hôte est présenté dans le tableau IV.

**Tableau IV : Mécanismes utilisés par *Salmonella* contre les défenses de l'hôte.**

Environnement	Facteur de stress	Gènes induits	Résultat
Extérieur de l'hôte A	Froid, Faible concentration de nutriments	<i>rpoS, csp</i>	Résistance générale au stress
Estomac	pH extrêmement acide	<i>rpoS, fur, ompR, phoP</i>	ATR
Duodénum	Bile	<i>phoP</i>	Modification de la membrane, et inhibition de l'invasion
iléon	Diminution de la tension en oxygène	<i>fnr, arcA</i>	Métabolisme anaérobie
	Acides gras libres (AGL)	<i>rpoS</i>	ATR induit une réaction croisée aux AGL et résistance aux AMPs
	Bactériocines	?	?
Surface épithéliale	Flore commensale ( <i>quorum sensing</i> )	<i>sdiA, luxS</i>	Régulation de la virulence
	AMP	<i>phoP</i>	Modification des LPS, résistance au AMP dans le macrophage.
Extérieur de l'hôte B	Froid, faible concentration en oxygène et aérobiose	<i>csp, rpoS, arcA, fnr, oxyR, soxRs</i>	Résistance générale au stress

Direction de l'infection



(Tiré et adapté de : [125])

### 1.4.2.1 Motilité

La motilité est un avantage évolutif. *Salmonella* possède entre cinq et dix flagelles, disposées aléatoirement, qui mesurent 5-10µm de longueur soit 5 à 10 fois la longueur totale de la bactérie [101]. La portion antigénique de cette structure est encodée par deux locus indépendants *fliC* et *fliB* [101]. *Salmonella* se distingue par son système complexe d'expression de ses flagellines, sous-unités majeures du flagelle [101]. Ces deux locus sont sous la gérance du gène réversible *hin*, ne

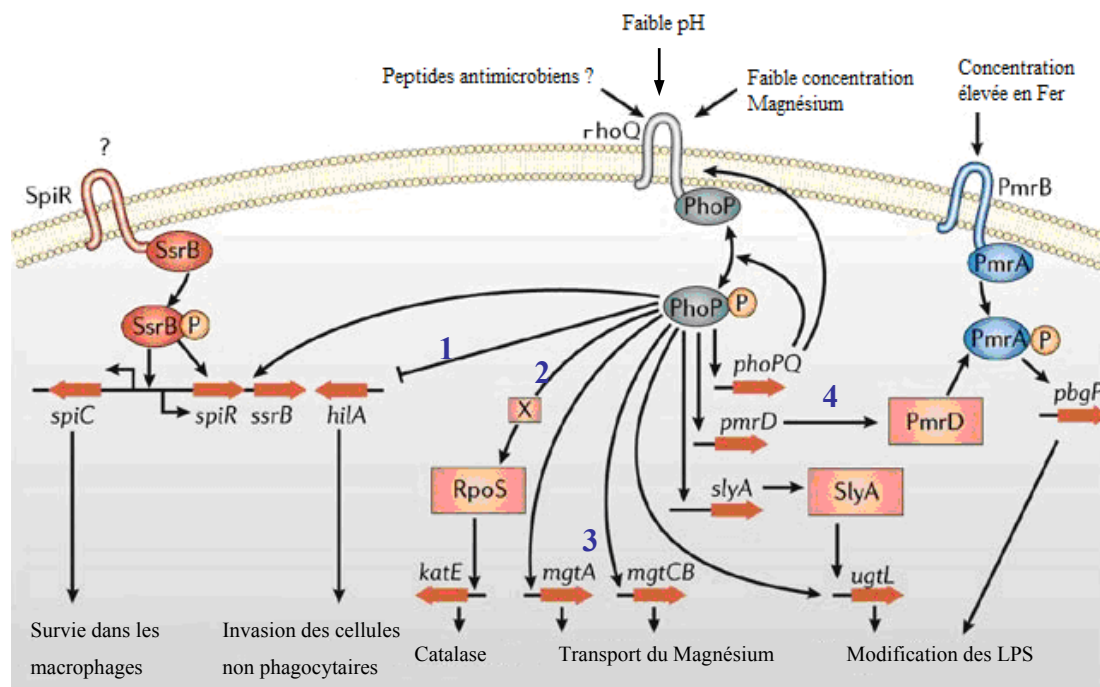
permettant l'expression que d'un type de flagelline à la fois [133]. Le mécanisme d'alternance d'expression génique des flagellines est unique à *Salmonella sp.* [162]; les sous-espèces qui en sont capables (I, II, IIIb et VI) sont dites diphasiques : *fliC* étant la phase 1 et *fliB* la phase 2 [101].

Bien que Typhi appartiennent à la sous-espèce I, ce sérovar est monophasique [6, 7, 95] et n'arbore que la phase 1, *fliC*, qui encode l'antigène H :d [7]. Aucun équivalent de *fliB* n'a été retrouvé dans le génome de Typhi [7]. Toutefois, certaines souches de Typhi isolées en Indonésie ont la capacité d'exprimer un antigène H alternatif, soit H :j, et/ou la flagelline H :z66 [102]. Dans tous les cas, une variation de phase permet momentanément d'éviter le système immunitaire de l'hôte [46, 67]. En outre, il a été démontré que l'expression de *fliC* est diminuée par le régulateur *tviA* pour ainsi échapper à l'immunité innée médiée par les TLR5 [29, 153].

*In vitro*, la motilité facilite l'invasion de cellules épithéliales pour Typhi et Typhimurium. Il est laborieux d'étudier la motilité et l'invasion isolément chez Typhi. En effet, une mutation au sein des gènes structuraux du flagelle, surtout *fliA* ou *fliZ*, mène à une diminution d'expression des gènes du premier îlot de pathogénécité de *Salmonella* (SPI-1) [37, 68, 89]. Cela expliquerait la diminution d'invasion observée chez des mutants aflagellés de Typhi.

### 1.4.2.2 Résistance à l'acide et aux peptides antimicrobiens

Au cours de sa pathogenèse, *Salmonella* fait face à un milieu acidifié à deux reprises, soit au niveau de l'estomac, puis dans le phagosome du macrophage. L'adaptation à ce stress acide est appelée *acid tolerance response* (ATR). Ce phénomène a été exhaustivement étudié et décrit chez Typhimurium, mais très peu d'informations ont été répertoriées quant à l'ATR de Typhi. Ainsi, Typhimurium peut survivre à des valeurs de pH aussi basses que trois, s'il a eu le temps de s'adapter à la baisse de pH. La protéine Fur, liée à la régulation du fer, et RpoS seraient également associées à la régulation de l'ATR chez Typhimurium [126]. Des études récentes ont identifié le système régulateur à deux composantes PhoPQ comme étant impliqué dans l'ATR chez Typhi et Typhimurium [118]. Ce système est composé d'un capteur kinase transmembranaire PhoQ, qui lorsque activé provoque la phosphorylation du régulateur cytosolique PhoP qui agit comme facteur de transcription [56]. Il a été démontré que PhoQ pouvait être directement activé par un pH acide et confère également une résistance bactérienne à la bile [125]. Il semblerait que la concentration de magnésium soit le signal environnemental contrôlant le système PhoPQ (voir fig. 8) [49]. Ce système à deux composantes contrôle l'expression de plus de 200 gènes dont la plupart sont des facteurs de virulence [100], il s'agit d'un régulateur central de l'interaction hôte-pathogène [55, 119].



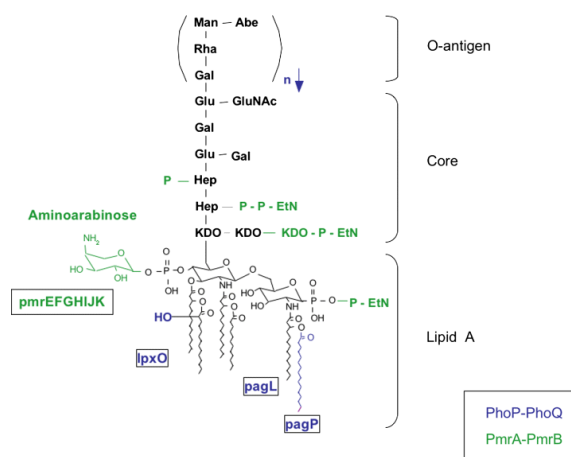
**Figure 8 : Régulation de la virulence par le système à deux composantes, PhoPQ.**

PhoP est un inhibiteur de la transcription du gène *hilA*, le régulateur de SPI-1 (1). La protéine PhoP contrôle les niveaux post-transcriptionnels du facteur sigma RpoS (mécanisme inconnu) (2). Ce système à deux composantes régule sa propre transcription et celle des transporteurs de magnésium codés par *mgtA* et *mgtCB* (3). Le système PmrA/PmrB est activé post-transcriptionnellement par une faible quantité de magnésium via l'activation de la protéine PmrD (4), dépendante de PhoP. (Tirée et adaptée de : [56])

Le système PhoPQ ferait également partie du mécanisme de résistance aux peptides antimicrobiens produits par l'hôte [5]. Effectivement, la liaison d'AMP sur le capteur PhoQ conduit à une modification de la surface membranaire de la bactérie [41, 52, 105]. Une fois activé, PhoP régule les gènes *pmrCAB* qui sont en partie responsables du remaniement du lipide A (voir fig. 8) [119]. Ces modifications sont schématisées à la figure 9, elles incluent le raccourcissement des polymères d'hydrate de carbone des LPS, des changements par rapport à la charge nette des LPS et une altération du niveau d'acétylation du lipide A [119]. La transformation de ce dernier fait appel à de nombreuses protéines régulées par PhoP, telles que : PagL qui

déacétyle, PagP qui catalyse l'addition de palmitate et PagQ (LpxO) qui hydroxyle le lipide A [119].

En somme, ces différents ajustements ont pour effet net d'augmenter l'hydrophobicité de la membrane externe de la bactérie, la rendant par le fait même plus résistante aux AMPs et autres composés toxiques [119]. La modification du lipide A réduit par cent fois l'habilité du LPS à activer TLR4 [74]. *Salmonella* peut également utiliser une protéase membranaire, PgtE, capable de cliver les AMPs [18, 55]. Cette protéase, régulée aussi par PhoPQ, affecterait également l'efficacité sérique du complément en clivant C3b, C4b et C5 [123].



**Figure 9: Structure chimique du LPS de Typhimurium.**

Structure chimique d'un LPS et des sites de modification structurale en réponse aux peptides antimicrobiens. Ces changements incluent une diminution de longueur du polymère de l'antigène O, l'addition de phosphoéthanolamine (P-EtN), aminoarabinose, 2-déoxymyristate (2OH C14) ou de palmitate (C16) et déacétylation en position 3 (3OH C14). La couleur des modifications est en fonction de la couleur des régulateurs qui les contrôlent. (Tirée de : [119])

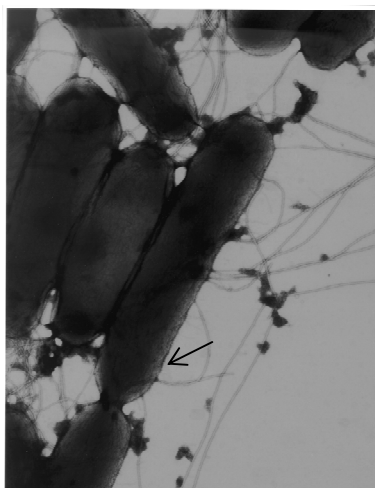
### 1.4.2.3 Adhésion cellulaire

L'adhésion aux cellules épithéliales est une phase décisive dans l'initiation de toutes infections bactériennes. Cette étape déterminante est rendue possible grâce



entre autres aux concours des flagelles, des fimbriae, des adhésines et des pili. Ceux-ci permettront une interaction étroite entre la cellule-hôte et le pathogène. Toutefois, pour atteindre la surface épithéliale de l'intestin, Typhi doit outrepasser la présence du microbiote qui le surpasse en nombre et qui a eu le temps de fort bien s'adapter aux conditions intestinales. Or, certains chercheurs tendent à démontrer que la microflore intestinale n'aurait pas nécessairement un rôle protecteur, mais pourrait jouer un rôle important dans la susceptibilité de l'hôte aux infections. Ainsi, l'épithélium intestinal exprimerait à sa surface le récepteur CFTR en réponse à un facteur produit par la flore commensale elle-même [91], de ce fait, le rendant plus susceptible à l'infection par Typhi.

En effet, cela fait près d'une décennie que le premier domaine extracellulaire du récepteur CFTR a été identifié comme un domaine reconnu par Typhi [92, 114]. Or, contrairement à Typhimurium, très peu d'informations ont été colligées quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans l'attachement cellulaire lors de l'infection par Typhi. Dans le cas-présent, il est connu que Typhi posséderait dans son génome 14 opérons présomptifs d'adhésion désignés : *bcf*, *csg*, *fim*, *saf*, *sef*, *sta*, *stb*, *stc*, *std*, *ste*, *stg*, *sth*, *tcf* et *pil* [109]. Ces opérons codent, pour la plupart, pour des fimbriae de type « chaperone-usher », excepté l'opéron *pil* qui code pour des pili de type IVb et l'opéron *csg* code pour des fimbriae de type agrégatif [47]. Des 14 opérons cités ci-haut, cinq ne se retrouvent pas chez Typhimurium, soient : *sef*, *sta*, *ste*, *stg* et *tcf* [109]. Il est intéressant de souligner que dans les cas de fièvre typhoïde, des anticorps contre trois systèmes de fimbriae ont été détectés par la technique *in vivo induced antigen technology* (IVIAT) : Tcf, Stb et Csg [62].



**Figure 10 : Structure de la membrane externe de Typhi**

Microscopie électronique à transmission, coloration négative, mettant en évidence les fimbriae (flèche noire) et flagelles de cellules de Typhi. (Gracieuseté de Chantal Forest)

L'étude des fimbriae est d'autant plus problématique étant donné qu'au moins cinq des opérons, *stg*, *sef*, *bcf*, *ste*, *sth*, sont potentiellement considérés comme inactivés puisqu'ils portent des pseudogènes [109]. Par définition, un pseudogène est une séquence dont la structure nucléotidique est semblable à un gène fonctionnel, mais qui ne s'exprime pas [87]. Les mutations fréquemment responsables de cette inactivation, sont celles par déphasage (*frameshift*), générées par des insertions ou des délétions, ou encore des mutations non-sens [87]. Il est actuellement suggéré que ces pseudogènes seraient en majorité issus de transferts horizontaux de séquences nucléotidiques redondantes, inutiles et voire délétères pour la cellule hôte [88]. Il est certain que le séquençage peut amener des erreurs menant à la prédiction de pseudogènes. Par contre, il est aussi connu que l'emplacement de la mutation, au sein du pseudogène, pourrait permettre un certain degré d'expression et même de fonction d'une protéine [87]. L'hypothèse que ces mutations puissent être un mode de régulation, est selon moi valable. Par ailleurs, l'accumulation de pseudogènes est observés chez de nombreux agents pathogènes (*M.leprae*, *Y. pestis*, etc.) et serait relié

à la persistance de ces micro-organismes chez l'hôte [156]. Certains chercheurs croient que le grand nombre d'opérons de fimbriae inactivés pourrait expliquer la spécificité d'hôte de Typhi, voire son incapacité à infecter d'autres organismes [156].

Toutefois, il a été démontré dans notre laboratoire que dans le cas de *stg*, l'opéron reste tout de même fonctionnel [47]. De plus, dans le cas de l'opéron *fim*, des différences subsistent même au sein du sérovar Typhi. En effet, cet opéron, codant pour un fimbriae de type I, est porteur d'un pseudogène chez la souche CT18, mais pas chez la souche Ty2 [137].

De tous les opérons codant pour des systèmes d'adhésion, l'opéron *pil* est celui qui a mérité le plus d'attention et qui a été décrit *in extenso*. Cet opéron est encodé sur un îlot de pathogénicité (SPI-7) et le pilus de type IVb qu'il produit se lierait spécifiquement au récepteur CFTR de l'hôte [139]. Typhi utilise ce pilus pour entrer dans les cellules épithéliales intestinales [92]. Parallèlement, un peptide dodécamère a été produit, le peptide R, qui se lie à la protéine PilS [155]. *In vitro*, ce dodécamère bloque l'adhésion et l'invasion de la lignée cellulaire de monocytes humains THP-I [155]. Il est incontestable que des études plus approfondies devront être entreprises afin d'augmenter notre compréhension de cette étape cruciale de l'infection, qu'est l'adhésion aux cellules.

#### **1.4.2.4 *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)**

Le concept d'îlot de pathogénicité (IP) a été introduit pour la première fois en 1980 par Jörg Hacker et ses collaborateurs en Allemagne [128]. À l'époque Hacker et ses collaborateurs avaient réussi à démontrer que la délétion d'un IP rendait

avirulente la souche d'*E. coli* de type UPEC étudiée [77]. Ils ont alors stipulé qu'il s'agissait d'un mécanisme génétique de modulation de la virulence chez cette bactérie [77]. Depuis ce temps, de nombreuses études ont été effectuées afin de caractériser les gènes portés par ses IPs.

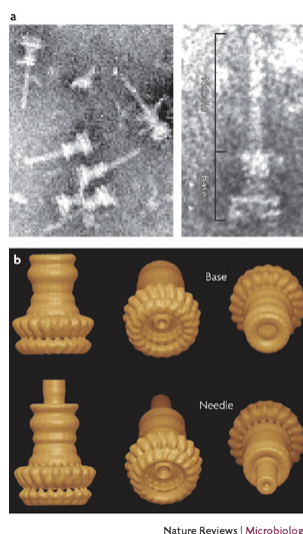
Aujourd'hui, près d'une dizaine de spécificités générales sont prises en compte pour attribuer le nom d'îlot de pathogénicité à une séquence génomique [128]. De toute évidence, un PI comporte un ou plusieurs gènes de virulence, dans le cas échéant il s'agit plutôt d'un îlot génomique ou métabolique [128]. Aussi, un PI se retrouve habituellement uniquement chez la souche pathogène et n'est pas retrouvé chez les autres membres non pathogènes de son espèce [128]. Toutefois, ces îlots sont parfois instables et peuvent être perdus *in vitro* ou lors de l'infection [128]. La grandeur des PIs peut varier entre 10 et 200 kb [128]. De plus, le pourcentage en guanine et cytosine (G+C) diffère significativement du reste du génome [128]. La localisation des PI est également particulière, puisqu'ils se trouvent très souvent adjacents aux gènes d'ARNt et ils sont bordés par des éléments génétiques mobiles [128]. La structure des PIs est très hétérogène, de type « mosaïque », par rapport au reste du génome [128]. De nombreux logiciels et algorithmes sont maintenant utilisés afin d'identifier les PIs [142] que l'on retrouve chez plusieurs pathogènes tels que *Yersinia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Vibrio sp.*, etc.

Chez *Salmonella sp.*, ces îlots sont appelés *Salmonella pathogenicity island* (SPI) [132] et ils ne sont pas conservés chez toutes les sous-espèces [128]. Par conséquent, chez Typhimurium cinq SPIs ont été étudiés (SPI-1, 2, 3, 4 et 5) [128], tandis que chez Typhi on en dénombre aujourd'hui dix-huit [48, 142]. Chez ce

dernier, les SPIs les plus documentés sont SPI-1, SPI-2 et SPI-7; il en reste beaucoup encore à expliquer sur le rôle et la fonction exacte de ces SPIs lors de l'infection.

Le premier îlot, SPI-1 est nécessaire dans les premiers moments de l'infection lors de l'invasion, c'est-à-dire lors de l'entrée forcée dans les cellules non phagocytaires. Cet îlot est retrouvé chez *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*. SPI-1, d'une grandeur de 40 kb, n'est pas associé à des ARNt et a une composition en G+C de 47% versus 52% pour le reste du génome [128]. Les gènes de SPI-1 codent, entre autres, pour les protéines nécessaires à l'assemblage d'un système de sécrétion de type 3 (SST3-1), une aiguille moléculaire permettant d'éjecter des protéines bactériennes directement dans la cellule cible (fig. 11) [128]. SPI-1 encodent également certaines protéines effectrices sécrétées par ce système, mais également des protéines impliquées dans l'acquisition de fer [128]. La régulation de l'expression de SST3-1 est un processus complexe qui n'est pas totalement élucidé, mais certaines évidences démontrent qu'elle serait dépendante de stimuli environnementaux. Les régulateurs impliqués sont surtout HilA, mais aussi HilD, HilC et InvF [128]. Parmi les facteurs environnementaux stimulant l'expression du SST3-1, on retrouve une faible tension en oxygène, une osmolarité élevée, un pH neutre [38, 128]. Ces conditions correspondent grossièrement à celles attendues à la surface des cellules épithéliales intestinales. Au moins treize protéines effectrices sont sécrétées par le SST3-1, soient : AvrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SopA, SopB, SopD, SopE, SopE2, SptP, SspH1, SlrP [90]. De ces protéines, au moins six agissent directement ou indirectement sur la polymérisation d'actine [161]. Toutefois les gènes codant pour

ces protéines ne se retrouvent pas tous sur SPI-1, et peuvent être encodés ailleurs dans le génome ou sur d'autres SPIs [90]. L'invasion médiée par SPI-1 est associée à une forte réponse inflammatoire et une infiltration importante de neutrophiles, toutefois ce phénomène n'est pas observé chez Typhi [61, 159].

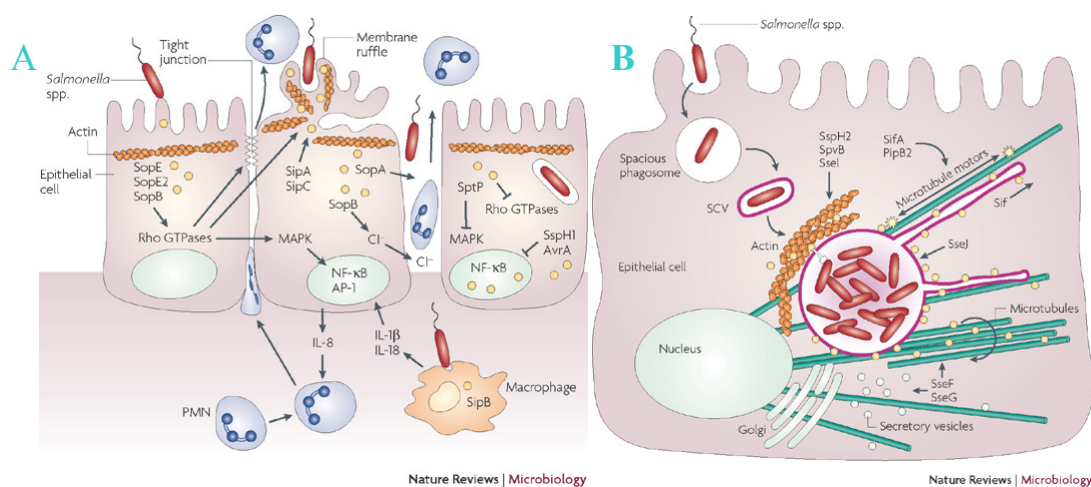


**Figure 11: Système de sécrétion de type trois de Typhimurium.**

Microscopie électronique en coloration négative (a) et modélisation 3D électronique obtenue à partir de la cryomicroscopie (b) de la base d'un système de sécrétion de type trois purifié. (Tirée de : [61])

Le second îlot de pathogénicité, SPI-2 est trouvé uniquement chez *S. enterica*. La fonction de cet îlot est indispensable pour la survie ainsi que la répllication dans la vacuole contenant *Salmonella* (SCV), lors de l'infection systémique [61, 128]. Ainsi, il prévient la colocalisation des oxydases et des oxydes nitriques synthases et autres peptides antimicrobiens dans la vacuole infectée [128]. Le locus SPI-2 est stable, il mesure 40 kb et est associé au gène ARNt *valV* [128]. La structure de cette séquence est de type mosaïque séparable en deux portions. La première portion de 25 kb encode un second système de sécrétion, SST3-2; alors que la seconde portion de 15 kb a une composition en G+C comparable au reste du génome [128]. De plus, cette dernière partie n'encode pas de gènes nécessaires à la fonction du SST3-2 [128].

L'expression de SPI-2 est dépendante de l'environnement dans le phagosome. Effectivement, l'acidité et les peptides antimicrobiens seraient impliqués. Jusqu'à ce jour, l'on connaît plus d'une vingtaine de protéines qui seraient sécrétées par SST3-2 [119]. Les protéines effectrices de ce système de sécrétion permettent à la bactérie de modifier le trafic intracellulaire de l'hôte [140]. De même, cela permet de détourner des molécules métaboliques utiles, telles que des acides aminés et des lipides vers le SCV [61]. Les protéines effectrices sécrétées par SST3-2 les plus importantes dans la virulence sont : SifA, SseJ, SseF, SseG, SopD2 et PipB2 [61]. Ces protéines sont impliquées dans la formation de longs filaments membranaires (SIF) en partance du SCV, agrandissant ce dernier par le fait même [61]. Les souches mutantes pour SPI-2 sont très fortement atténuées quant à leur virulence [61].



**Figure 12: Changements induits dans la cellule hôte par *Salmonella enterica*.**

**A)** Au contact de la cellule épithéliale, les salmonelles assemblent leur SST3-1 permettant l'injection de protéines effectrices (sphères jaunes) dans le cytoplasme de la cellule cible. Il en résulte alors un réarrangement du cytosquelette, via la polymérisation d'actine (sphères orange).

**B)** Une fois internalisée, la salmonelle se retrouve dans un phagosome spacieux, qui rétrécira suite à la fusion avec le lysosome pour former la SCV. Il y a alors assemblage du SST3-2 qui permettra la sécrétion de protéines effectrices dans le cytoplasme. Ces protéines (sphères jaunes) agissent sur les moteurs de microtubules (en vert) permettant de détourner le trafic cellulaire. (Tirée de : [61])

**Tableau V : Protéines effectrices sécrétées par SPI-1 et/ou SPI-2 de Typhimurium.**

Protéines effectrices	Fonction cellulaire	Cible intra-cellulaire
<b>SST3 de SPI-1</b>		
Avra	Inhibe la production NF- $\kappa$ B et IL-8	Inconnue
SipA ou SspA	Diminue la concentration de G-actine et augmente la stabilité de la F-actine. Induit la migration transépithéliale des PMN et perturbe les jonctions serrées.	F-actine T-plastine
SipB ou SspB	Lie et active la capsase-1 et induit l'autophagie des macrophages.	Caspase Cholestérol
SipC ou SspC	Nœud et noyau d'actine	F-actine; cytokératine-8; cytokératine-18
SopA	Stimule la transmigration des PMN, activité ubiquitine ligase E3.	Inconnue
SopB ou SigD	Active Cdc42, RhoG, AktA et la sécrétion de chlore par son activité phosphatase inositol, perturbe les jonctions serrées.	Inconnue
SopD	Stimule l'accumulation de liquide dans l'anse iléale chez les bovins, contribue à la diarrhée chez le veau et à l'infection systémique chez la souris.	Inconnue
SopE	Active Cdc42, RhoG et Rac1 (Activité GEF); perturbe les jonctions serrées.	Cdc42, Rac1 et Rab5
SopE2	Active Cdc42, RhoG et Rac1 (Activité GEF); perturbe les jonctions serrées.	Cdc42 et Rac1
SptP	Inhibe Cdc42 et Rac1 (Activité GAP), la voie de signalisation MAPK et la sécrétion d'IL-8.	Rac1
<b>SST3 de SPI-2</b>		
GogB	inconnue	inconnue
PipB	inconnue	inconnue
PipB2	Contribue à la formation des Sif	Kinésine-1
SifA	Induit la formation des Sif, assure l'intégrité du SCV et réprime le recrutement de kinésine au SCV	SKIP et Rab7
SifB	inconnue	Inconnue
SopD2	Contribue à la formation des Sif	inconnue
SpiC	Interfère avec le trafic endosomal	Hook3
SpvB	ADP-ribosyltransférase spécifique à l'actine, réprime la formation de Sif	Actin
SseF/G	inconnue	inconnue
SseI ou SrfH	Contribue à la dissémination	Filamine; TRIP6
SseJ	Maintient l'intégrité du SCV et activité déacylase	inconnue
SseK1/2	inconnue	inconnue
SseL	Déubiquitineuse	Ubiquitine
SspH2	Inhibe la vitesse de polymérisation d'actine et contribue à la virulence chez le veau.	Filamine et profiline
SteABC	inconnue	inconnue
<b>SST3 de SPI-1 et SPI-2</b>		
SlrP	Contribue à la virulence chez le veau	inconnue
SspH1	Inhibe la signalisation via NF- $\kappa$ B et la sécrétion d'IL-8, contribue à la virulence chez le veau et possède une activité ubiquitine ligase	PKN1

(Tiré et adapté de : [61])



SPI-7 d'une longueur de 134 kb est le plus grand îlot de pathogénicité trouvé chez les salmonelles [128]. Par contre, il a seulement été localisé chez Typhi, bien que des éléments génomiques semblables se retrouvent chez les souches Paratyphi C et Dublin. Cet îlot encode de nombreux facteurs de virulence tels que le locus du gène *viaB* nécessaire à la biosynthèse de la capsule (voir section suivante). On y trouve aussi la protéine SopE encodée par un phage et sécrétée par le SST3-1 [128], tout comme un groupe de gènes essentiels à la biosynthèse d'un pilus de type IV. SPI-7 possède des propriétés semblables aux transposons conjugatifs, ce qui le rend mobile, voire instable et facile à perdre [128].

Il y a davantage de SPIs, que ceux décrits ici, retrouvés chez Typhi et d'autres salmonelles. Il est à noter que plusieurs gènes associés à des îlots de pathogénicité bien connus (SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5) sont inactivés chez Typhi, contrairement à ce qui est observé chez Typhimurium [6]. Cette perte de certains gènes associés à la virulence pourrait expliquer le spectre d'hôte étroit de Typhi [6].

#### **1.4.2.5 Antigène Vi**

L'antigène Vi (virulence) se retrouve au niveau de la capsule de Typhi [17], c'est un polymère linéaire de  $\alpha$ -1,4 (2-déoxy)-2-N-acide acétylgalacturonique, parfois O-acétylé en position C-3 [122]. Les gènes nécessaires à la production de l'antigène capsulaire Vi sont encodés dans le locus *viaB* sur SPI-7 [122]. Ce locus contient le gène de régulation *tviA*, les gènes de biosynthèse *tviBCDE* et les gènes nécessaires à l'exportation *vexABCDE* [143]. Typhimurium ne possède pas ce locus [122]. L'expression de SPI-1 et la capsule est inversement dépendante de l'osmolarité de

l'environnement, par l'activité des systèmes de régulation RcsB/RcsC et OmpR/EnvZ [3, 113]. Conséquemment, la capsule n'est pas exprimée dans des conditions de forte osmolarité [3].

Le polysaccharide Vi est exprimé lors de l'infection [122], et est typiquement retrouvé chez les souches isolées de patients atteints de fièvre typhoïde. Tel qu'attendu l'antigène Vi est immunogène lorsqu'utilisé comme vaccin [76, 122]. La présence de ladite capsule est associée à une augmentation du pouvoir infectieux de la bactérie. *In vitro*, les isolats de Typhi ayant perdu leur capsule, ont une plus grande propension à induire la production de facteur nécrosant (TNF- $\alpha$ ) chez les macrophages humains (THP-1) et de cytokine IL-8 chez les cellules épithéliales intestinales (Caco-2) [64, 121]. Cette cytokine, IL-8, contribue au recrutement de neutrophiles au site d'infection [51]. Par le passé, il avait été admis qu'une capsule bactérienne agissait comme protection contre la phagocytose. Or, dans le cas de Typhi ce type d'évasion du système immunitaire serait inutile, puisque la survie dans les macrophages est une partie inhérente de sa pathogénèse.

Aujourd'hui, trois hypothèses sont admises pour expliquer le rôle de l'antigène Vi dans la régulation de l'expression de l'interleukine 8. Premièrement, il a été démontré que l'antigène Vi réduit la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 en interférant avec la stimulation des TLR4 et TLR5 par les flagelles et les LPS respectivement [122, 152]. Le mécanisme d'action impliqué n'a pas encore été révélé. Ainsi, l'antigène Vi pourrait bloquer physiquement l'interaction entre les PAMPs et les TLRs [98]. En second lieu, il a été décrit que l'antigène Vi purifié avait des propriétés anti-inflammatoires menant directement à une diminution de

production d'IL-8 par les cellules épithéliales [120, 131]. Pour finir, le régulateur TviA inhiberait également la transcription du gène *fliC*, le ligand de TLR5, effet qui pourrait également diminuer la cytokine IL-8 [153].

#### 1.4.2.6 Toxines

Les bactéries pathogènes ayant évolué en association étroite avec leur hôte, utilisent souvent des protéines ayant la propriété de moduler les fonctions cellulaires, afin que l'hôte devienne un milieu propice à leur survie et leur réplication [135]. Ces protéines sont dites effectrices, elles sont pour la plupart sécrétées directement, dans la cellule ciblée grâce à un SST3 [135]. De manière générale, certaines de ces protéines sont connues depuis des années, telles que la protéine SipB qui induit l'apoptose des macrophages [63]. Alors que d'autres n'ont pas encore de fonctions connues. Or depuis une décennie, l'on peut assister à la découverte de nouvelles exotoxines chez Typhi. Parmi ces toxines récemment découvertes chez Typhi, l'on retrouve notamment les protéines ClyA, CdtB, PltA et PltB.

Il y a quelques années de cela, il n'y avait aucune évidence expérimentale de l'expression d'une toxine RTX-like ou de cytolysine chez *Salmonella* [108]. Par contre, l'avènement des séquences génomique complète de Typhi à permis d'identifier un cadre de lecture ouvert (ORF) codant ayant une grande homologie de séquence avec le gène *clyA* de certains *E. coli* pathogènes. Ce locus était conservé chez les sérovars Typhi et Paratyphi A, mais était toutefois absent chez Typhimurium et les autres sérovars [108]. ClyA (ou HlyE ou SheA) est une protéine de 34 kDa, le prototype d'une toute nouvelle famille de cytolysine. ClyA lyse les érythrocytes des

mammifères, est cytotoxique pour les cultures cellulaires de mammifères et induit l'apoptose des macrophages [82]. En outre, il a été rapporté que lors d'infection par Typhi ou par ParatyphiA, des anticorps circulants contre ClyA étaient retrouvés dans le sérum du patient [145]. Néanmoins, l'expression du gène *clyA* serait réprimée dans les conditions expérimentales. Cette toxine provoque une lyse cellulaire en formant des pores dans la cellule cible [66, 148]. De plus, l'excrétion de cette toxine est d'autant plus étonnante, puisqu'elle est exportée de la cellule via des vésicules de la membrane externe (OMV) [146]. Le rôle de ClyA dans la pathogenèse de la fièvre typhoïde n'a pas encore été expliqué.

La protéine CdtB a pour particularité de n'être retrouvée que chez Typhi et est absente chez Typhimurium [109]. De plus, le locus codant pour cette protéine se trouve sur un îlot de pathogénicité qui n'est pas retrouvé chez les autres sérovars de *Salmonella enterica* [134]. La toxine de distension cytholétale (CDT) a été décrite pour la première fois chez *Campylobacter jejuni* et certaines souches enteropathogéniques de *E. coli* [58, 70]. Chez ces micro-organismes, le complexe CDT est composé de trois sous-unités distinctes : CdtA, CdtB et CdtC [84]. Les sous-unités CdtA et CdtC forment un complexe nécessaire à la translocation de la sous-unité active CdtB à travers la membrane de la cellule cible [58, 84]. Lorsque livrée à la cellule, CdtB est transportée au noyau, où son activité de DNase I provoque l'arrêt du cycle cellulaire en G<sub>2</sub>/M et une augmentation du volume nucléaire [83]. La protéine CdtB de Typhi partage 50% d'homologie de séquence d'acides aminés avec la protéine CdtB retrouvée chez *C. jejuni* et *E. coli* [58, 70]. Néanmoins, Typhi ne possède pas de ORF codant pour les sous-unités CdtA et CdtC [135]. L'analyse du

transcriptome de Typhi a permis de révéler que *cdtB* était fortement exprimé une fois la bactérie phagocytée [43]. Par contre, il a été démontré que cette protéine n'était pas sécrétée via aucun des deux SST3 de Typhi [58].

Bienheureusement, le mystère de la sécrétion de CdtB a été élucidé. Ainsi, sur l'îlot de pathogénicité codant pour CdtB, deux autres gènes, codant pour les protéines PltA et PltB (*pertussis-like toxine*) ont été identifiés [16] et caractérisés. Ces gènes ont aussi une forte expression intracellulaire. La protéine PltA partage des similarités de séquences avec le domaine ADP-ribosyltransférase de la toxine pertussique [73]. Tandis que la protéine PltB partage des homologues de séquence avec la sous-unité B de la même toxine [73]. La toxine pertussique forme habituellement un complexe pentamérique [73]. Or dans ce cas-ci, PltA, PltB et CdtB forment un complexe trimérique inusuel [16, 135]. Les protéines PltA et PltB sont indispensables pour la sortie et l'activité toxique de CdtB en dehors du SCV [135, 136]. La sécrétion de ce complexe est autocrine et paracrine [16]. Dans les faits, il semblerait qu'une fois produit dans le SCV, CdtB est transporté dans le cytoplasme de la cellule vers le noyau [58] ou il peut être transporté vers le milieu extracellulaire pour intoxiquer d'autres cellules [16]. Dans les deux cas, le processus est dépendant des protéines PltA et PltB [16].

Le génome d'au moins deux souches de Typhi étant complété [33, 109], des études approfondies seront nécessaires afin de mieux comprendre l'interaction entre ce pathogène et l'hôte. Les informations disponibles sont réellement insuffisantes quant aux protéines effectrices ou cytotoxiques impliquées lors de l'infection par

Typhi. Il faut croire que d'autres cytotoxines seront identifiées et caractérisées dans les années à venir.

### **1.5 Méthodes d'identification de gènes exprimés *in vivo***

Le meilleur moyen d'approfondir nos connaissances sur la pathogenèse de ce bacille infectieux serait encore d'établir un modèle animal pour l'étude de ce pathogène, mais Typhi est tellement adapté à l'être humain que ce sérovar a perdu la capacité de produire une infection transmissible chez d'autres espèces animales [147]. Il n'existe donc pas de modèle animal, éthiquement acceptable, pour ce micro-organisme pathogène. L'apprentissage de nouvelles notions sur Typhi passe actuellement par l'utilisation de lignées de culture cellulaire humaine. Conséquemment, les macrophages humains constituent le principal modèle utilisé dans l'étude de la pathogenèse de Typhi, puisqu'il est connu que pour causer une infection systémique, *Salmonella* doit nécessairement survivre dans les macrophages de l'hôte.

La disponibilité des séquences génomiques complètes des souches de Typhi CT18 et Ty2 a permis de compléter les notions déjà connues grâce à l'utilisation de nombreuses techniques d'analyse génétique. D'une part, cela a permis d'effectuer des comparaisons bio-informatiques entre Typhi et d'autres bactéries dont les séquences génomiques étaient disponibles. Plus récemment, des biopuces ont également été utilisées afin de caractériser le patron d'expression génomique de Typhi lors de l'infection de macrophages humains [43].

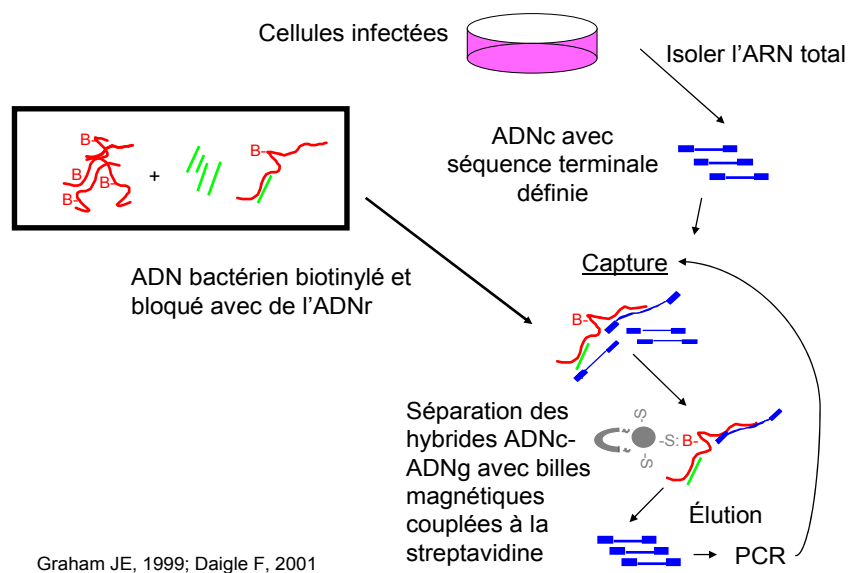
Dans le cas présent, seule la technique SCOTS (*selective capture of transcribed sequence*) sera décrite puisqu'elle a permis d'identifier le gène dont il sera question dans ce mémoire.

Cette méthode est en fait une technique qui permet d'aller chercher spécifiquement des séquences d'ADN bactérien transcrites lors de l'infection (voir fig. 13). Ainsi à partir de tissus ou de cellules animales infectées par la bactérie à l'étude, il est possible d'effectuer une extraction d'ARN. Cet ARN est par la suite transformé en ADNc. Les amorces utilisées pour cette conversion ont deux parties, la première en 3' est aléatoire, alors que la partie 5' a une séquence connue qui agit à titre d'étiquette. Il est ensuite aisé d'amplifier par PCR la quantité d'ADNc obtenue en utilisant des amorces s'hybridant uniquement à la séquence étiquette. Une banque d'ADNc de base est ainsi créée.

Ensuite, l'ADN génomique (ADNg) de la bactérie à l'étude est fragmenté et biotinylé, puis est préhybridé à de l'ADNc produit à partir d'ARN ribosomal cloné (ARNr) de l'hôte et de bactérie. Cette étape permet d'éviter la capture de transcrit d'ARNr, présents en excès dans la banque d'ADNc de base, puisque ses sites d'hybridation seront déjà occupés. La capture consiste à utiliser l'ADNg fragmenté, biotinylé et préhybridé comme sonde d'hybridation. Seul l'ADNc bactérien présent dans la banque de base devrait être en mesure de s'hybrider à l'ADNg. Puis à l'aide de billes magnétiques de streptavidine, il est possible de récupérer l'ADNc bactérien. L'ADNc isolé obtenu est à nouveau amplifié par PCR et constitue la seconde banque d'ADNc. Deux autres rondes des mêmes étapes sont effectuées, toujours en utilisant l'ADNc capturé dans la ronde précédente. Ces rondes successives, dites de

normalisation, permettent d'augmenter la diversité de l'ADNc recueilli puisqu'elles permettent d'amplifier le nombre de transcrits des gènes plus faiblement exprimés. La normalisation permet également de diminuer la quantité d'ADNc provenant d'ARNr. La banque d'ADNc finale est par la suite clonée et séquencée.

### SCOTS (*Selective Capture Of Transcribed Sequences*)



**Figure 13 : Schéma des différentes étapes de SCOTS**  
(Tiré et adapté de [30] et [53])

Une des options avantageuses de cette technique, c'est qu'il est possible de capturer spécifiquement les transcrits unique à une condition ou à une espèce. Ainsi, suite aux trois rondes régulières de SCOTS décrit ci-haut, il est possible de préhybrider l'ADNg fragmenté et biotinylé avec de l'ADNg fragmenté d'une autre espèce que l'on voudrait exclure ou encore avec de l'ADNc obtenue dans des conditions contraires à celles étudiées. Par exemple, pour identifier les gènes spécifiquement exprimés dans les macrophages humains, l'ADNg fragmenté et biotinylé a été préhybridé, à de l'ADNc produit à partir d'ARN exprimé *in vitro* [30].



Toutefois, comme toutes méthodes, cette technique comporte des désavantages. Effectivement, ce protocole repose sur une extraction efficace d'ARN bactérien. Or, il est connu que l'ARN est une molécule hautement instable. Une fois l'ARN bactérien isolé, la proportion d'ARNr dépasse largement la population ARNm désirée. Cette disproportion est en partie contrée par la pré-hybridation avec de l'ADNr (voir fig. 13). De plus, la composition de la population d'ARNm obtenu est également variable, ce qui s'explique par l'expression différentielle d'ARNm. En conséquence, l'identification d'un gène qui est très faiblement transcrit est moins probable. De plus, l'étape de normalisation des transcrits élimine l'option d'évaluer l'expression génique différentielle. Ainsi, la seule conclusion qui peut-être tirée de cette technique est qu'un gène est exprimé ou non-exprimé. En ne tenant pas compte du temps d'optimisation des étapes de ce protocole, ce dernier s'avère tout de même long et fastidieux.

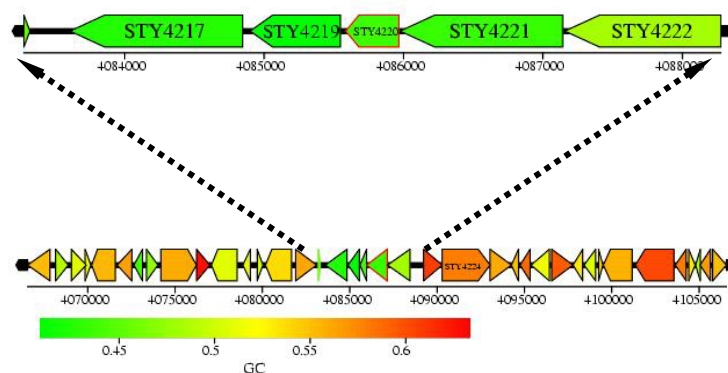
## **1.6 Problématique et objectifs**

De nombreuses questions fondamentales par rapport à la pathogenèse de Typhi subsistent encore aujourd'hui sans réponses formelles. Ainsi, comment expliquer qu'à l'opposé des autres membres de *S. enterica* subsp. I Typhi n'a qu'un seul hôte, l'homme. Aussi, comment justifier que Typhi soit capable de causer une infection systémique, alors que Typhimurium, son plus proche parent, se limite qu'à une simple et brève infection localisée. Dans le laboratoire, nous avons tenté de répondre à ces questions.

Antérieurement, des recherches ont amené à constater qu'*in vitro*, Typhi survivait mieux dans les macrophages humains que murins et que le contraire était vrai pour Typhimurium [42, 129]. En outre, en effectuant la technique SCOTS [31], il a été possible de mettre en évidence 15 régions du génome de Typhi, absentes de celui de Typhimurium, et qui étaient exprimées à différents moments de l'infection [42].

Conséquemment, l'hypothèse soutenue est que la spécificité d'hôte et la capacité de survivre dans les macrophages humains observées chez Typhi, contrairement à Typhimurium, pourraient être expliquées par l'étude de gènes ou de régions uniques à Typhi. Ainsi, des 15 régions identifiées, la région *sty4217-4222* a été choisie comme sujet d'étude dû à sa petite taille (5,8 Kb) qui se prêtait bien aux différentes études génétiques. Cette région, dont l'orientation est négative (voir fig. 14), est composée de 5 gènes dont les fonctions respectives sont encore hypothétiques. Ainsi, d'après les séquences déduites d'acides aminés, on y retrouve un pseudogène (*sty4217*), une protéine se liant à l'ADN (*sty4219*), une protéine régulatrice (*sty4220*), d'une aminotransférase (*sty4221*) et une protéine membranaire (*sty4222*) [BLAST]. Cette région est d'autant plus intéressante, vu sa composition en guanine et cytosine. En effet, la composition moyenne en guanine et cytosine de l'ensemble du génome de Typhi est d'un peu plus de 50% [104]. Toutefois, la composition de la région à l'étude est inférieure à ce pourcentage. Or, cette différence origine habituellement d'un transfert horizontal de la séquence d'ADN [104]. De plus, cela soulève également des questions quant à la régulation probable de cet

opéron par la protéine H-NS (*histone-like nucleoid structuring*) [104, 112]. Par contre, cette question ne trouvera pas réponse dans cet ouvrage.



**Figure 14 : Région génomique *sty4216* à *4222*.**

Composition en guanine-cytosine, orientation et localisation du gène *sty4221* dans le génome de Typhi. (Source : colibase)

Le gène *sty4221* a soulevé notre intérêt puisqu'il a pour orthologue le gène *hly* de *Treponema denticola* (32,9 % d'identité de séquence sur 392 a.a.). L'orthologie désigne un gène homologue entre deux espèces différentes et dont l'emplacement dans le génome est équivalente. Cela n'implique toutefois pas une homologie de fonction. Le mécanisme d'action de la protéine Hly n'est pas encore connu, mais cette dernière a été caractérisée [26]. Ce gène code pour une hémolysine cystéine-dépendante homologue à la famille des aminotransférases de classe I/II pyridoxal-phosphate dépendant [26]. De manière générale, le pyridoxal-phosphate se combine à un acide alpha-aminé, pour former une molécule appelée base de Schiff ou intermédiaire d'aldimine. Ainsi, selon la réaction, la base de Schiff devient un substrat pour quatre types de réactions : la transamination, la racémisation, la décarboxylation et d'autres réactions dépendantes de l'enzyme. La transamination

consiste en une réaction réversible d'échange d'un groupement amine entre un acide alpha-aminé et un alpha-cétoacide [10, 111].

D'autre part, les hémolysines activées par la L-cystéine sont appelées les hémolysines activées par les groupements thiols [69]. Ce type d'hémolysines, dont la taille varie entre 52 et 60 Kda [69], ont des rôles prétendument semblables chez quatre genres de bactéries Gram positif soit : *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Clostridium* [50]. Ces hémolysines agiraient en se fixant au cholestérol membranaire [69].

Le but de cette étude était donc de déterminer si le gène *sty4221* est impliqué lors de l'infection et/ou de la survie à l'intérieur des macrophages. Mais, aussi de déterminer si le produit du gène *sty4221*, une fois cloné au sein d'une souche d'*E. coli*, possède bien une activité hémolytique, d'établir si cette dernière est dépendante de la présence de cystéine et de déterminer s'il possède un effet cytotoxique sur différentes lignées cellulaires humaines.

## 2. Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

### **Souches bactériennes, plasmides, milieu de culture et condition de croissance.**

Les souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude sont énumérés au tableau VI. Les bactéries ont été cultivées en bouillon Luria-Bertani (LB) à 37 °C, sauf indication contraire. Lorsque nécessaire, des antibiotiques, des acides aminés, ou des suppléments ont été rajoutés dans les concentrations suivantes : kanamycine, ampicilline, acide diaminopimélique (DAP), 50 µg/ml; le chloramphénicol, 34 µg/ml; et la cystéine 22 µg/ml. La transformation des souches bactériennes d'*E. coli* a été fait chimiquement selon un protocole calcium/manganèse [59] ou encore dans le cas de Typhi en utilisant l'électroporation tel que décrit précédemment [106]. Le plasmide pBAD18, portant un marqueur de résistance au chloramphénicol et un promoteur inductible à l'arabinose, a été utilisé comme vecteur de clonage [57] pour l'expression d'ADN de *Salmonella* Typhi (ISP1820). Le plasmide pET21a-d (+), portant un marqueur de résistance à l'ampicilline et un promoteur *T7lac* inductible à l'isopropyl-bêta-thio-galactoside (IPTG) a été utilisé comme vecteur d'expression et d'étiquetage (six résidus d'histidines) du gène *sty4221*. Le mutant DEF041 a été créé à partir de la souche de ISP1820, où la région *sty4216-4222* a été délétée par un autre étudiant du laboratoire en utilisant la méthode décrite par Datsenko [32].

Tableau VI : Souches et plasmides sélectionnés utilisés dans le cadre de cette étude.

Souche ou plasmide	Caractéristiques	Source ou référence
Souches de <i>S. enterica</i> enterica serovar Typhi		
ISP1820		R. Curtiss III
DEF041	ISP1820 $\Delta sty4216-4222$	Cette étude
DEF436	ISP1820 $\Delta sty4221$	Cette étude
DEF437	DEF436 (pSIF044)	Cette étude
DEF109	ISP1820 (pSIF044)	
Souches de <i>E. coli</i>		
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>b</sub> (r <sub>b</sub> m <sub>b</sub> ) gal dcnd (DE3) Hôte pour expression de protéine	H. LeMoual
DH5 $\alpha$	supE44 $\Delta lacU169$ ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	R. Curtiss III
DEF438	DH5 $\alpha$ (pSIF045)	Cette étude
DEF439	DH5 $\alpha$ (pSIF044)	Cette étude
DEF440	BL21 (DE3) (pSIF061)	Cette étude
MGN-617	SM10 $\lambda pir$ asd thi thr leu tonA lacY supE recA RP4 2- Tc::Mu[ $\lambda pir$ ] $\Delta asdA4$	[71]
Plasmides		
pCR2.1	Vecteur de clonage, haut nombre de copie, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pWSK29	Vecteur de clonage, faible nombre de copie, Amp <sup>r</sup>	[149]
pBAD18	Vecteur de clonage, nombre moyen de copie, Cm <sup>r</sup> , inductible à l'arabinose	[57]
pET21a-d (+)	Vecteur de clonage, nombre moyen de copie, Amp <sup>r</sup> ,	Novagen
pMEG-375	sacRB mobRP4 oriR6K, Cm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Megan Health (St. Louis, MO)
pSIF043	pCR2.1 portant la région <i>sty4221-4222</i> de 1,2 kb	Cette étude
pSIF045	pBAD18 portant le gène <i>sty4221</i> de 1,2 kb	Cette étude
pSIF044	pWSK29 portant la région <i>sty4216-4222</i> de 5,8 kb	Cette étude
pSIF061	pET21a-d (+) portant le gène <i>sty4221</i> de 1,2 kb	Cette étude
pSIF114	Vecteur suicide contenant un fragment de 260 pb constitué des extrémités 5' et 3' du gène <i>sty4221</i>	Cette étude

**Clonage du gène *sty4221*.** Le gène *sty4221* a été amplifié à partir d'ADN génomique de ISP1820, et ce, à l'aide de l'Elongase (Invitrogen), afin d'assurer la précision de l'amplification. L'amorce 4221F-XbaI, qui contient un site de restriction *XbaI* souligné, (5'-GCTCTAGAATTCGGGTACTGGCTTGATGC-3') et l'amorce 4221R-Hind III (5'-CCCAAGCTTCATCTTAACTACAGCCAGAAG-3') ont été utilisées. Un second PCR semblable a été effectué à partir des amorces STY4221F

PET-NdeI (5'-GGAATTCCATATGAAATACGATTTTAATGAAATCTATC-3') et STY4221R PET -XhoI (5'-CCGCTCGAGAAAATACTTACTGAATGCCTTTTCC-3'). Les produits PCR ont par la suite été purifiés grâce la trousse de purification *QIAquick PCR Purification kit* (Quiagen). L'insert ainsi que le plasmide pBAD18 ont été digérés avec les enzymes de restriction *HindIII* et *XbaI* lors d'une incubation de 2 heures, à 37 °C. Le second PCR purifié et le plasmide pET21a-d(+) ont été digérés *XhoI* et *NdeI* suite à une incubation de 2 heures, à 37 °C. Les produits de digestion, soit le gène *sty4221* et les plasmides correspondants, ont été ligués à l'aide de la ligase T4 d'Invitrogen, à 16 °C, 16 heures. Ensuite, les produits de ligation PSIF045 et PSIF61 ont été utilisés pour transformer des cellules d'*E. coli* DH5α et BL21(DE3) respectivement, en utilisant un protocole de transformation par choc thermique [59]. Suite à la transformation, les géloses ont été incubées à 37 °C, 16 heures. Afin de vérifier que les colonies obtenues portaient bien le vecteur recombinant, le même protocole PCR décrit plus tôt a été réalisé, ainsi qu'une extraction plasmidique (*QIAprep Spin Miniprep kit* de Quiagen) a été effectuée, afin de confirmer la présence du gène à l'étude au sein des clones utilisés.

**Construction d'une souche sérovar Typhi dont le gène *sty4221* a été délété.** Un vecteur suicide pour la délétion du gène *sty4221* a été construit. Un fragment de 180 bp de la partie 5' de la fin du gène a été généré par PCRm à partir d'ADN génomique de ISP1820; en utilisant l'amorce inSTY4221R-Del (5'-GCTCTAGAACGTGACT-CCGGAACACC-3') et l'amorce overSTY4221E2-Del (5'ACGATGGGCGCCACT-TATCTTGTATGGGC-3'). Un second fragment de 180 pb de la région 3' du gène a été produit par PCR en utilisant l'amorce inSTY4221F-Del (5'-GCTCTAGAACGT-

GACTCCGGAACACC-3') et l'amorce overSTY4221B2-Del (5'-ATAAGTGG-CGCCCATCGTCATCAGTAAAGG-3'). Les deux fragments ont été ligués et clonés aux sites *Xba*I et *Bam*HI (site de restriction souligné) du vecteur pMEG-375 [72]. Le plasmide résultant (pSIF114) a été utilisé afin d'effectuer un échange allélique entre le nouveau fragment et le gène *sty4221*. Le vecteur obtenu a été transféré de la souche *E. coli* MGN-617 à la souche de Typhi ISP1820 par une conjugaison de 16 heures sur gélose LB supplémentée en DAP. Les transconjuguants, ont été sélectionnés par croissance sur gélose LB sans DAP et additionnée de chloramphénicol. La sélection de mutants ayant subi un événement de délétion génique par recombinaison homologue s'est fait en utilisant une contre sélection *sac*B sur gélose LB additionnée de sucrose 5% et sans NaCl. La souche isogénique obtenue a maintenant une inactivation du gène *sty4221* produit par une recombinaison homologue, tel que l'indique l'absence de résistance à l'ampicilline ou le chloramphénicol portée par le vecteur suicide, et par la délétion du gène *sty4221*, vérifiée par PCR.

**Clonage de la région *sty4216-4222*.** La région *sty4216-4222* a été amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique de ISP1820, et ce, à l'aide de l'Elongase (Invitrogen) afin d'assurer la précision de l'amplification. Les amorces STY4216F (5'-GTGTTTTTCGGTCTCATTG-3') et STY4222R (5'-AAATCGTGCCCGTC-AATCTA-3') ont été utilisées. Une fois les produits PCR purifiés, l'amplicon a été inséré dans le vecteur pCR2.1 (TOPO TA). Puis le vecteur résultant (pSIF043) ainsi que le plasmide pWSK29 ont été digérés *Xho*I et *Sac* I lors d'une incubation de 2 heures, à 37 °C. Les produits de digestion, soit la région *sty4216-4222* et le plasmide pWSK29 correspondant, ont été ligués à l'aide de la ligase T4 d'Invitrogen, à 16 °C,



16 heures. Ensuite, le nouveau plasmide (pSIF044) a été utilisé pour transformer la souche DEF436; où le gène *sty4221* a été muté. Ainsi, le plasmide pSIF044 devrait restaurer le phénotype sauvage de la souche DEF436. Afin de vérifier les clones obtenus, le même protocole PCR décrit plus tôt a été réalisé, ainsi qu'une extraction plasmidique (*QIAprep Spin Miniprep kit* de Quiagen) afin de confirmer la présence du gène à l'étude au sein des clones utilisés.

**Analyse de données bio-informatiques.** Les séquences d'acides nucléiques utilisées pour la conception des amorces proviennent des bases de données génomiques de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Le site de colibase (<http://colibase.bham.ac.uk/>) a permis d'obtenir la séquence déduite d'acides aminés résultante de la traduction de la séquence nucléotidique, mais également de déterminer s'il existait des orthologues du gène *sty4221* chez d'autres microorganismes. Afin de déterminer si le produit du gène *sty4221* était sécrété dans le milieu, le logiciel de prédiction de signal peptidique PSORTvb 2.0.4 ([www.psort.org](http://www.psort.org)) a été utilisé en cochant l'option bactérie Gram négatif. Pour comparer les séquences d'acides aminés avec les autres aminotransférases connues, le logiciel Clustal W (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) à partir du site Swiss-protein a été utilisé. Enfin pour comparer les caractéristiques biochimiques de différentes protéines à celles du produit du gène *sty4221*, le logiciel ProtParam (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) a été employé.

**Test de l'activité hémolytique.** La souche DEF438 a été testée quant à sa capacité de produire une hémolyse. Pour ce faire, les souches (DEF438, pBAD18) ont été incubées à 37 °C avec agitation dans 5ml de Tryptic Soy Broth (TSB), toute une nuit,

jusqu'à l'atteinte de la phase stationnaire. Tous les tubes contenaient du chloramphénicol à une concentration de 34 µg/ml. Dans un premier tube servant de contrôle, du D-glucose (0,2 %) a été ajouté au bouillon de culture afin de réprimer la transcription du gène inséré dans le vecteur porté par DEF438, alors que du L-arabinose (0,2 %) a été rajouté dans un second tube afin d'induire la transcription de l'insert. Aucun autre substrat n'a été rajouté dans le troisième tube où pBAD18 a été inoculé. Par la suite, 0,03 µl de la suspension bactérienne a été striée sur gélose sang de mouton 5 % (v/v) contenant du chloramphénicol. Les géloses ont ensuite été incubées 16 heures, à 37 °C et par la suite placées à 4 °C pendant 5 jours, puis ont été observées visuellement pour vérifier la présence d'hémolyse.

**Activation de l'hémolysine par les groupements thiols.** Un test d'activité hémolytique a été effectué tel qu'expliqué plus tôt. Toutefois, 5 µl de la suspension bactérienne a été inoculée sur la gélose sang de mouton 5 % (v/v) contenant du chloramphénicol, sur laquelle 12 mM de L-cystéine a préalablement été étalé. Le tout a par la suite été incubé à 37 °C, pendant 16 heures, et placé à 4 °C pendant 5 jours.

**Test de l'activité cytotoxique sur différentes lignées cellulaires.** Deux tubes de 5 ml de suspension bactérienne DEF438, l'un contenant de l'arabinose (0,2 %) et l'autre du glucose (0,2 %), ont été cultivés à 37 °C dans du TSB, sans agitation, 16 heures, puis ont été culottées à 8000 rpm pendant 10 min. Le surnageant a été recueilli, filtré à l'aide d'un filtre « low protein binding » (0,22 µm) et gardé sur glace. Le même principe a été respecté pour la suspension de cellules pBAD18. Dans

une plaque de 24 puits (plaque mère), le premier puits ne contenait que du milieu de culture complet RPMI 1640 (Wisent inc.) alors que les cinq suivants, de la rangée, contenaient une monocouche de  $5 \times 10^5$  macrophages humains THP-1 (ATCC TIB-202). Un duplicata a été effectué sur la seconde rangée. La même disposition a été respectée pour la plaque contenant  $1 \times 10^5$  cellules HeLa par puits, toutefois le milieu de culture complet utilisé était du *Dulbecco's modification eagle's medium 1X* (DMEM) (Wisent inc.). Dans une proportion de 1 : 1, du milieu TSB a été rajouté dans les trois premiers puits, du surnageant filtré de pBAD18 dans le quatrième puits, du surnageant filtré de DEF438 réprimé dans le cinquième puits et du surnageant de DEF438 induit a été rajouté dans le dernier puits. Cette disposition a été répliquée sur la seconde ligne. En premier lieu, un test au bleu de trypan a été effectué après 48hrs afin de déterminer la viabilité des macrophages suite à cette exposition.

Pour les deux lignées cellulaires (THP-I et HeLa), nous avons procédé à un suivi après 4, 8, 24 et 48hrs à l'aide du test de cytotoxicité 96-puits non radioactif offert par Promega. Cette technique permet de déterminer avec précision la relâche de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu à l'aide de la spectrophotométrie. Ainsi, 50  $\mu$ l de surnageant de chacun des puits de la plaque mère ont été transférés en quadruplet dans une plaque de 96 puits, 50  $\mu$ l de mélange réactionnel ont été rajoutés, puis incubée pendant 30 min à température ambiante, à l'obscurité. Suite à l'incubation, 50  $\mu$ l de la solution d'arrêt (acide acétique 1 M) ont été rajoutés afin de mettre un terme à la réaction. La lecture de la plaque a été faite à 490 nm. La cytotoxicité a été calculée selon l'équation 1, cette équation a été modifiée pour les cellules HeLa vu la faible relâche de LDH (équation 1a). La relâche minimale

correspond aux cellules ayant été mises en contact uniquement avec du TSB exempt de toxines. La relâche maximale représente les cellules ayant été mises en contact avec du Triton-100X 0,9 %, soit une lyse totale. La relâche expérimentale correspond aux cellules ayant été mises en contact avec les différents surnageants étudiés. Une coloration Giemsa a également été effectuée sur les macrophages THP-1 exposés pendant 48 heures au surnageant, puis observée au microscope photonique.

$$\text{Équation 1 : \% cytotoxicité} = 100 \times \frac{(\text{DO relâche expérimentale} - \text{DO relâche minimale})}{(\text{DO relâche maximale} - \text{DO relâche minimale})}$$

$$\text{Équation 1a) : \% de cytotoxicité} = (\text{DO relâche expérimentale} / \text{DO relâche maximale}) \times 100$$

**Infection de macrophages humains.** Les macrophages humains THP-1 ont été mis en culture dans du RPMI supplémenté contenant 12,5 ml de HEPES (acide N-2-hydroxyéthyle pipérazine-N-2-éthanesulfonique à pH 7) 25 mM, 5 ml de L-glutamine 4 mM, 50 ml de sérum de veau foetal (SVF) 10 %, 5 ml d'acides aminés non essentiels 0,1 mM et 5 ml de pyruvate de sodium 1 mM pour 500 ml de RPMI. Pour l'infection,  $5 \times 10^5$  macrophages sont ajoutés dans chacun des puits. Ces derniers adhèrent au fond du puits une fois activé par l'ajout de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) à une concentration finale de  $10^{-7}$  M, 48 heures avant l'infection. Le milieu a été remplacé par du milieu de culture cellulaire frais après 24h. Les souches ISP1820, DEF436, DEF109 et DEF041 ont été incubées à 37 °C, 16hrs sans agitation en LB, jusqu'à l'atteinte d'une  $DO_{600}$  de 0.6 ( $3 \times 10^8$  CFU/ml). Les souches de Typhi ont par la suite été ajoutées à la monocouche de cellules THP-1 à une multiplicité d'infection (MOI) de 10 bactéries par monocyte, ce qui en pratique n'affecte pas la

viabilité cellulaire [43]. La plaque est centrifugée pendant 5 minutes pour synchroniser l'infection et est incubée à 37 °C, pendant 20 minutes dans une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>. Le surnageant a été enlevé et les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS à 37 °C. Un volume de 1 ml de PBS-DOC 0,1 % (acide déoxycholique) a été ajouté pour lyser les cellules. Ce moment correspond au temps 0 (T<sub>0</sub>). Dans les puits correspondant aux autres temps, du RPMI additionné de gentamicine 50 mg/ml a été ajouté, cela permet d'éliminer les bactéries non phagocytées. Ces étapes sont répétées de nouveau pour le temps 2 heures et 24 heures. Les bactéries doivent être dénombrées pour la culture de départ, le T<sub>0</sub>, le T<sub>2</sub> et le T<sub>24</sub>. Les infections ont été effectuées en duplicata à six reprises. Le taux de phagocytose correspond au nombre de bactéries présentes au T<sub>0</sub> divisé par le nombre de bactéries initialement inoculées dans les puits. Le taux de survie à deux heures correspond au nombre de bactéries présentes au T<sub>2</sub> divisé par le nombre de bactéries présentes au T<sub>0</sub>. Le taux de survie à 24 heures correspond au nombre de bactéries présentes au T<sub>24</sub> divisé par le nombre de bactéries présentes au T<sub>2</sub>.

**Test d'adhérence et d'invasion.** Les cellules épithéliales HeLa ont été mises en culture dans du DMEM. Ce milieu a été complété avec 10 % de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur, 25 mM d'acide N-2-hydroxyéthyle pipérazine-N-2-éthanesulfonique à pH 7 et 4 mM de L-glutamine. Les cellules ont été réparties dans une plaque de 24 puits, à raison d'une concentration  $2 \times 10^5$  cellules par puits. Les cellules sont maintenues à 37 °C, sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>, 24 heures avant d'être utilisées. Les souches ISP1820, DEF436 et DEF437 ont été incubées à 37 °C, 16 heures, sans agitation dans du LB-NaCl 0,3 M. Cette condition d'incubation

favorise l'induction des gènes codant pour SPI-1, nécessaire à l'invasion. Les bactéries ont crû jusqu'à l'atteinte d'une D.O.<sub>600</sub> de 0,6. Une heure avant l'expérience, les cellules ont été lavées trois fois au tampon phosphate salin (PBS; pH 7,4). Des bactéries ont été ajoutées à chacun des puits, selon une MOI de 20 bactéries pour une cellule épithéliale. L'expérience a été effectuée en triplicata et a été répétée trois fois. Les plaques sont centrifugées 5 minutes à 800 x g, afin de synchroniser le début de l'expérience. La plaque est par la suite, incubée 90 minutes, à 37 °C sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>, soit le temps alloué pour qu'il y ait adhérence aux cellules épithéliales. Une fois l'incubation terminée, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS préchauffé à 37 °C. Dans une première partie, les cellules sont lysées à l'aide d'un millilitre PBS-DOC 0,1%, pour ainsi récupérer les bactéries qui y ont adhéré. Ensuite, un millilitre de DMEM préchauffé à 37 °C et supplémenté en gentamicine à 100 µg/ml est ajoutée dans les puits de la seconde partie de la plaque. La plaque est à nouveau incubée 90 minutes, à 37 °C sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>, soit 180 minutes postinfection le temps nécessaire pour permettre l'invasion des bactéries dans les cellules épithéliales. Une fois le second temps écoulé, les cellules sont également lysées, tel que décrit ci-haut. Les suspensions bactériennes recueillies sont ensuite diluées et inoculées sur géloses LB avec ou sans agent de sélection, en fonction de la souche bactérienne utilisée. Le nombre de colonies obtenu permet de calculer le nombre d'unité formatrice de colonie (CFU). Il est alors possible de calculer le taux d'adhérence et d'invasion puisque la CFU initiale est connue. Le taux d'adhérence est fonction de la CFU au temps 90 minutes sur la CFU initiale. Tandis

que le taux d'invasion se calcule en divisant la CFU au temps 180 minutes sur la CFU initiale.

**Expression et extraction de la protéine.** Un bouillon de culture de DEF440, a été incubé à 37 °C, 16 heures avec agitation, dans du LB auquel de l'ampicilline a été ajoutée. Cette culture a été diluée 1 : 50 dans 5 ml de LB, suivant les mêmes conditions, afin d'initier une nouvelle culture en phase exponentielle. Une fois qu'une  $DO_{600}$  de 0,5 a été atteinte, 0,4 mM d'IPTG a été ajouté et la culture a été mise à 30 °C avec agitation, pendant 3 heures. Les cellules ont été récoltées par centrifugation d'un millilitre de suspension bactérienne, 10 000 x g, à 25 °C, pendant une minute et le culot a été mis à sécher. Le culot a été resuspendu dans 100 µl de PBS et 100 µl de tampon d'échantillon SDS 4X (40% glycérol; 240mM Tris-HCl pH6,8; 8 % SDS; 0,04 % bleu de bromophénol; 5 % β-mercaptoéthanol) , et représente la totalité des protéines cellulaires. Le bouillon de culture induit restant (4 ml) a été centrifugé à 10 000 x g, 10 minutes, à 4 °C, le culot et le surnageant ont été conservé. Un millilitre de surnageant a été recueilli, auquel 100µl d'acide trichloracétique (TCA), le tout a été incubé sur glace pendant 15 minutes. Les protéines de la fraction extracellulaire ont été obtenues en centrifugeant le surnageant à 14 000 x g, pendant 10 minutes, à 4°C. Le culot a été lavé deux fois à l'acétone, puis a été mis à sécher 60 minutes à température ambiante. Le culot a été resuspendu dans 100 µl de PBS et 100 µl de tampon d'échantillon SDS 4X, et représente les protéines extracellulaires. Le culot obtenu de la culture induite a été congelé à -70°C, puis décongelé et resuspendu dans 1,4 ml de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 5% glycérol, 50 mM NaCl pH 8) et incubé à température ambiante, 20 minutes. La

suspension a été centrifugée à 16 000 x g pendant 20 minutes, à 4 °C. Le surnageant recueilli (100 µl), représentant les protéines intracellulaires solubles, a été ajouté à 100 µl de tampon d'échantillon SDS 4X. Le culot obtenu lors de l'étape précédente a été lavé à deux reprises dans 500 µl de Tris-HCl (20 mM, pH 7,5). Le culot lavé a été resuspendu dans 250 µl de SDS 1 %, puis 100 µl de la solution a été ajouté à 100 µl de tampon d'échantillon SDS 4X. Cette dernière fraction représente les protéines insolubles ainsi que les corps d'inclusion.

**SDS-PAGE.** La visualisation de la surexpression de la protéine STY4221 a été faite grâce à un gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) [127]. Les échantillons des différentes fractions cellulaires ont été incubés 5 minutes à 100 °C, avant d'être mis sur gel. Puisqu'il s'agissait d'une expérience préliminaire, la concentration protéique n'a pas été mesurée. Un gel de concentration à 6 % d'acrylamide (1,0 M Tris; pH 6,8) a été utilisé. Le gel de séparation était à 10 % d'acrylamide (1,5 M Tris, pH 8,8). La migration a été effectuée à 100V pour les premières 15 minutes, puis à 200V jusqu'à la fin de la migration. Le gel a par la suite été coloré au Bleu de Coomassie.

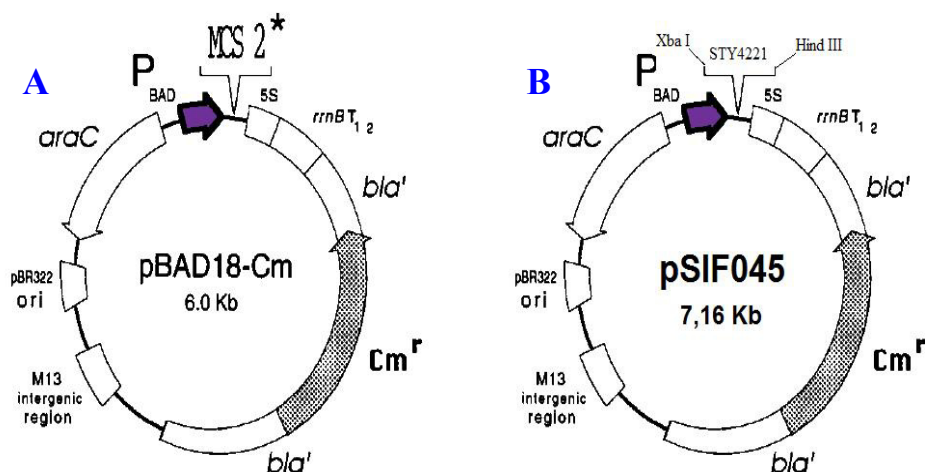


### 3. Chapitre 3 : Résultats

**Construction du plasmide recombinant.** Afin de cloner le gène *sty4221* dans le plasmide pBAD18, une approche par PCR a été mise à profit. Effectivement, les séquences nucléotidiques des amorces utilisées, STY4221 F et R, ont été conçues avec des sites de restrictions pour les enzymes de digestion *XbaI* (extrémité 5') et *HindIII* (extrémité 3'). Parallèlement, ces sites de restriction sont également présents au site de clonage multiple du plasmide pBAD18. L'amplicon obtenu suite à l'amplification du gène *sty4221*, une fois digéré, a pu être inséré dans la bonne orientation au sein du vecteur plasmidique (fig.15B). Le plasmide pBAD18 a été utilisé; il permet de contrôler l'expression du gène qui est cloné en aval du promoteur pBAD, puisque ce dernier est régulé par le répresseur codé par *araC*. D'après Guzman *et al.* [57], une concentration aussi faible que 0,2 % de glucose ou d'arabinose permet d'avoir l'effet maximal désiré.

En outre, la position exacte du promoteur du gène *sty4221* n'étant pas connu, l'insertion de l'amplicon au sein du vecteur pBAD18 est d'autant plus un avantage. Ainsi, le gène *sty4221* d'une taille de 1167 pb a été inséré dans le vecteur pBAD18 d'une taille de 6 kb, le plasmide DEF438 résultant a donc une taille attendue d'environ 7,16 kb. D'autre part, l'absence d'homologue ou d'orthologue de *sty4221* chez *E. coli* (fig. 16B), a permis d'utiliser un protocole PCR pour vérifier la présence de l'insert au sein des clones obtenus. Il est donc supposé que la région *sty4217-4222* inclusivement, formerait un opéron. C'est dans cette optique que la région entière fut

insérée dans le vecteur de clonage à faible nombre de copies pWSK29 afin de préserver le promoteur natif du gène *sty4221*.



**Figure 15 : Plasmide inducible à l'arabinose et clone.**

A) Représentation du plasmide pBAD18 et B) représentation de l'insertion du gène *sty4221* dans pBAD18 pour former le nouveau plasmide pSIF045. En mauve le promoteur pBAD.

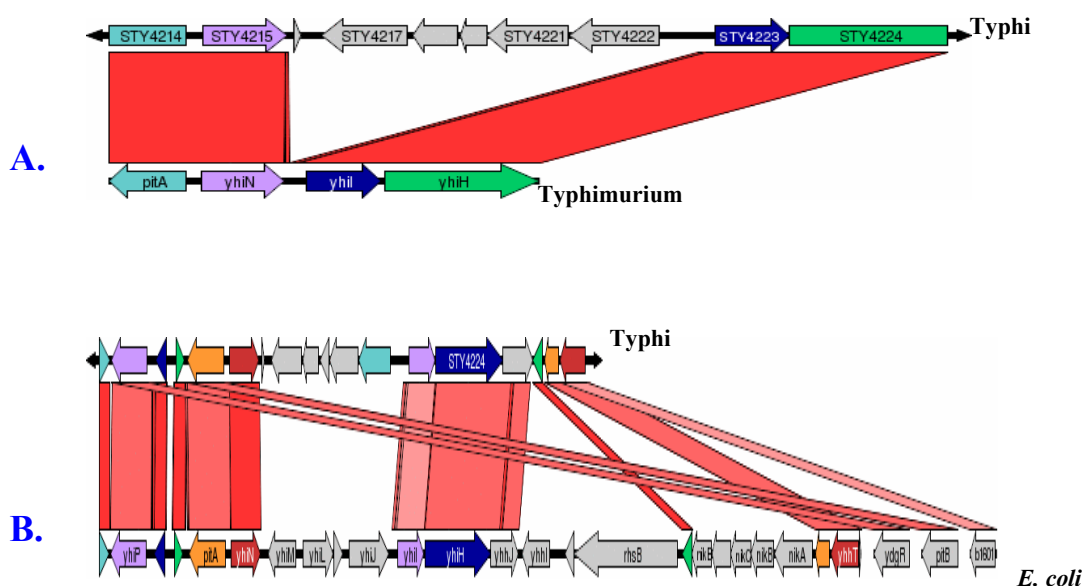
**Analyse de données bio-informatiques.** Selon le cadre de lecture ouvert identifié dans la séquence d'acides nucléiques clonée, le gène *sty4221* pourrait coder pour une protéine dont le poids moléculaire serait de 44539,5 Da. La protéine déduite de la séquence d'acides aminés aurait un point isoélectrique (pI) calculé de 5.18 et ne posséderait pas de longue région d'acide aminé hydrophobe, ce qui suggère qu'il s'agirait d'une protéine non-membranaire. Sept résidus de cystéines ont été comptabilisés dans la protéine issue du gène *sty4221* (fig. 22), ces derniers sont souvent reliés à une activité hémolytique. Les caractéristiques de la protéine à l'étude ont été résumées dans le tableau VII. Aucun gène orthologue à *sty4221*, provenant de micro-organismes autres que Typhi ou Paratyphi n'a été identifié. Ainsi, tel

qu'attendu aucune homologie n'a été observée entre Typhi et Typhimurium pour la région *sty4216-4222* (fig. 16A) ni avec *E. coli* (fig. 16B). Pour ce qui est de la localisation du produit du gène *sty4221*, le logiciel PSORTvb 2.0.4 a détecté la présence d'un signal peptidique dans la séquence d'acides nucléiques. Toutefois, aucune prédiction spécifique n'a été faite sur la localisation de la protéine. Toutefois, le logiciel prévoit qu'il y ait une grande probabilité que la protéine se retrouve dans la membrane extérieure ou à une probabilité plus faible qu'elle soit sécrétée à l'extérieure de la cellule bactérienne.

**Tableau VII: Comparaison des caractéristiques biochimiques de la protéine STY4221 et Hly à partir de leur séquence d'acides aminés déduite.**

Caractéristiques testées	STY4221 (Typhi)	Hly ( <i>T. denticola</i> )
Nombre d'acides aminés	388	399
Poids moléculaire	44 kDa	45 kDa
Point isoélectrique théorique	pH 5.18	pH 6.14
Moyenne d'hydrophobicité	-0.285 gravy	- 0.366 gravy

(Source : Protparam offert sur le site d'Expasy)



**Figure 16 : Comparaison du génome de Typhi à celui de Typhimurium et *E. coli*.**  
 Comparaison par alignement PROmer de la région *sty4216-4222* de Typhi avec le génome de A) Typhimurium et B) *E. coli*.

**Le produit du gène *sty4221* est également une aminotransférase.** Lors des recherches d'orthologues, la plupart des séquences obtenues appartenaient à la famille des aminotransférases pyridoxal-phosphate-dépendantes. Parmi les micro-organismes ayant montré le plus fort pourcentage d'identité, se trouve : *T. denticola* (32,9 % dans 392 a.a.) pour sa protéine Hly et *E. coli* pour sa protéine MalY (25,3 % dans 387 a.a.). MalY est une enzyme pyridoxal-phosphate-dépendante ayant une activité  $\beta$ C-S lyase, qui régule les besoins cellulaires en méthionine [158]. Les séquences d'acides aminés de ces protéines ont été comparées à celle du gène *sty4221*, ainsi qu'à celle de deux autres aminotransférases à titre indicatif, soit la protéine PatB de *B. subtilis* et une aspartate aminotransférase de bacilles thermophiles. Une fois les cinq séquences alignées, 17 résidus d'acides aminés se sont avérés invariants pour les cinq séquences (fig. 17 : étoiles). Parmi ces résidus, six d'entre eux sont considérés comme invariants

lorsque différentes aminotransférases pyridoxal-phosphate-dépendantes sont alignées (surlignés vert). Parmi ces résidus, se trouve la lysine (K) à laquelle le cofacteur pyridoxal-phosphate se fixe.

STY4221	-MKYDFNEIYQR--IASEKWEYDSVIN---GFPVIMPVADTDLVSPVEVRQALIEV <b>C</b> NR
hly	-MIYDFTTKISRKNLGLSLKDWLMSQNPEVGNVPLSVADMEFKNPPELIEGLKKYLDE
malY	--MFDFSKVVDRHGTWCTQWDYVADRF--TADLLPFTISDMDFATAPCIIEALNQRLMH
PatB	---MNFDKREERLGTQSVKWDKTGELFG--VTDALPMWVADMDFRAPAEITAEALKERLDH
aminotransferase	MKELLANRVKTLTPSTTLAITAKAKEMKAQGIIDVIGLGAGEPDFNTPQNIMDAAIDSMQQ
	: : . : : . : : . . .
STY4221	REFGYPAY--HDDFKDVLASWYDRYDWRPDTADIIETPPLLMTGAFIRGTMQ <b>C</b> NESVV
hly	TVLGYTGP--TEEYKKTVKKWMKDRHQWDIETDWIINTAGVVPVAVNAVREFTKPGDGI
malY	GVFGYSRWK-NDEFLAAIAHWFSTQHYTAIDSQTVVYGPSVIYMVSELIRQWSETGEGVV
PatB	GIFGYTTP--DQKTKDAVCGWMQNRHGKWNVPESITFSPGVVTALSMVAQAFTEPGDQVV
aminotransferase	GYTKYTPSGGLPALKQAIIEKFKRDNQLEYKPNIEIVGVGAKHVLYTLFQVILNEGDEVI
	* . : . . . : : : : : : : *
STY4221	VMTFVYHSFARTIRENHRAVTE <b>C</b> DLLRDENNHYTIDFEKLEDT <b>C</b> SRPENKILIF <b>C</b> NP <b>H</b> NP
hly	IITPVYYPFFMAIKNQERKIIIECELLE-KDGYTIDFEKLEKLSKDKNNKALLFCS <b>P</b> HN <b>P</b>
malY	IHTPAYDAFYKAIIEGNQRTVMPVALEK-QADGWFCMDGKLEAVLAKPECKIMLLCS <b>P</b> Q <b>N</b>
PatB	VQFPVYTPFYHMVEKNGRHHILHNPLLE-KDGAYAIDFEDLETKLSDPVTLFILCN <b>P</b> HN <b>P</b>
aminotransferase	IPIPYVWSYPEQVQLAGGVPVYIEATS--EQNYKITAEQLKNAITDKT-KAVIINS <b>P</b> NP
	: * : : : . : : : : : : : : : * *
STY4221	V <b>R</b> CRWTEEEVRKVAIAAQKTGTILIS <b>DEI</b> HADFVYDEK <b>C</b> YTPVMKAA-ENLNG-IIVFLS
hly	V <b>R</b> RVWKKDELQIKIDIVLKSDDLMLWS <b>DEI</b> HFDLIMPGYEHTVQSID-EQLADKTI <b>T</b> FTA
malY	T <b>R</b> KVWTCDELEIMADLCERHGV <b>R</b> VIS <b>DEI</b> HMDMVWGEQPHI <b>P</b> WSNVARGDWALLTS----
PatB	S <b>R</b> SRWSREDLLKLGELCLEHGVT <b>V</b> VS <b>DEI</b> HSDLMLYGHKHT <b>P</b> FASLS-DDFADISV <b>T</b> CAA
aminotransferase	T <b>M</b> VYTTREELE <b>D</b> IAKIALENNILIVS <b>DEI</b> YEKLLYNGAEHFSIAQISEEVKAQ <b>T</b> IVINGV
	* . : : : : : : . . : * * * : : : : .
STY4221	GG <b>R</b> LFNIGGIFSSYVFTADPVFKQMAVVLKELHFQP--TAF <b>A</b> HE <b>A</b> AYAGYKYHYDYREE
hly	PS <b>R</b> TFNIAGMGMSNIIK <b>N</b> PDIRERFTKSRDITSGMPF-TTLG <b>Y</b> K <b>A</b> CEICYKECGKWLDG
malY	GS <b>R</b> SFNIPALTGAYGIIENSSSRDAYLSALKGRDGLSSPSVLAL <b>T</b> A <b>H</b> IAAYQQGAPWLDA
PatB	PS <b>R</b> TFNIAGLQASAIIPDRLKR-AKFSASLQRNGLGGLNAFAV <b>T</b> AIEAAYSKGGPWLDE
aminotransferase	SS <b>R</b> HSMTGWRIGYAAGNADIINAMTDLASHSTSNPTTASQYAAIE <b>A</b> YNGPQDSVEEMRKA
	* : * . . . * . . . : * . . .
STY4221	VVNHIRKMQIKLVNGLNMPYPVKANLPEATYLVWADFNDTGWSGDRIQEFLVQDAGLGF
hly	CIKVIDKNQRIVKDFFEVNHP <b>E</b> IKAP <b>L</b> IEGTYLQWIDFRALKMDHKAMEEFMIHKAQ <b>I</b> FF
malY	LR <b>I</b> YLKDNLT <b>I</b> ADKMNA <b>A</b> FP <b>E</b> LN <b>W</b> Q <b>I</b> PQSTYLAWLDRPLNIDDNALQKAL <b>E</b> QEK <b>V</b> AI
PatB	L <b>I</b> TYIEKNMNEAE <b>A</b> FL <b>S</b> TE <b>L</b> PK <b>V</b> KMMK <b>P</b> DAS <b>Y</b> LIW <b>L</b> DF <b>S</b> AY <b>G</b> LS <b>D</b> AE <b>L</b> Q <b>R</b> ML <b>K</b> KG <b>V</b> IL
aminotransferase	F <b>E</b> SR <b>L</b> ET <b>I</b> YP <b>K</b> LS <b>A</b> IP <b>G</b> FK <b>V</b> V <b>K</b> PQ <b>G</b> AF <b>Y</b> LL <b>P</b> D <b>V</b> SE <b>A</b> AQ <b>T</b> GF <b>S</b> VD <b>E</b> F <b>A</b> S <b>A</b> LL <b>T</b> E <b>A</b> N <b>V</b> AV
	: : : : : : : : : : . . : : . .
STY4221	NRGDQFGVAGTG <b>F</b> A <b>R</b> INCGVPESRIDEALS <b>R</b> LEK <b>A</b> FSKYF-----
hly	DEGYIFGDGGIG <b>F</b> E <b>R</b> INLAAPSSV <b>I</b> Q <b>E</b> SLERLNKALKDLK <b>N</b> RHLK
malY	MPGYTYG <b>E</b> GRGF <b>V</b> RLNAGC <b>P</b> RSKLEK <b>G</b> VAGLIN <b>A</b> IR <b>A</b> VR-----
PatB	EPGTYG <b>P</b> GG <b>E</b> GF <b>M</b> RLNAGCS <b>L</b> AT <b>L</b> Q <b>D</b> GL <b>R</b> RI <b>K</b> AALS-----
aminotransferase	IPGS <b>G</b> FG--AP <b>S</b> T <b>I</b> R <b>I</b> S <b>Y</b> AT <b>S</b> LN <b>L</b> IE <b>E</b> A <b>I</b> ER <b>D</b> RF <b>V</b> K-----
	* : * . . * . . . : : : : : .

**Figure 17 : Alignement de la séquence d'acides aminés de l'hémolysine STY4221 et autres aminotransférases.**

Les acides aminés ayant une position identique dans les 5 séquences sont soulignées d'une étoile. Les quatre résidus préalablement rapportés comme invariants chez les aminotransférases sont surlignés en vert, et les positions surlignées en bleu sont celles généralement retrouvées dans la plupart des aminotransférases. STY4221, gène de Typhi; Hly, hémolysine de *T. denticola*; MalY, protéine MalY de *E. coli*; PatB, protéine PatB de *B. subtilis*; aminotransférase, aspartate aminotransférase. Les résidus de cystéines de la séquence de *sty4221* sont marqués en bleu foncé.

**Test de l'activité hémolytique.** Dans l'optique de déterminer si le produit du gène *sty4221* possédait bien une activité hémolytique, le gène a entièrement été cloné au sein du plasmide pBAD18, puis transformé dans *E. coli*. Ce vecteur permet de contrôler l'expression des gènes clonés au sein du site de clonage multiple. Ainsi, à titre de témoin négatif une culture de DEF438 a été incubée en présence de glucose afin de réprimer l'expression du gène *sty4221*, alors qu'une autre culture de DEF438 a été incubée en présence d'arabinose. Conséquemment, suite à la striation des différentes suspensions sur gélose sang de mouton, une zone d'hémolyse n'a été observée que pour la gélose sang additionnée d'arabinose et contenant la souche DEF438 (fig. 18C). Ainsi, tel qu'attendu, aucune zone d'hémolyse n'a été observée sur la gélose où *E. coli* a été strié (fig. 18A) ni pour la gélose sang additionnée de glucose où la souche DEF438 a été striée (fig. 18B).

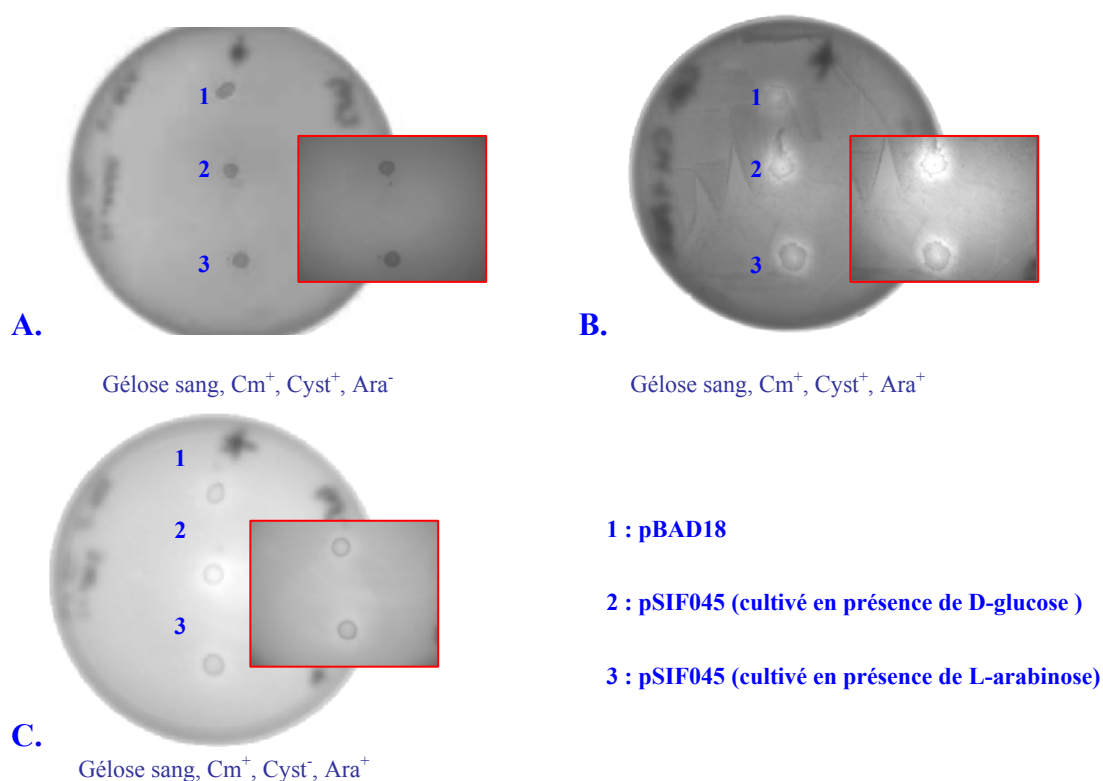


**Figure 18 : Test d'hémolyse sur gélose sang.**

Détermination de l'activité hémolytique sur gélose sang de mouton **A)** Contrôle négatif; *E. coli* **B)** DEF438 sur gélose sang additionné de D- glucose 0.2% et **C)** DEF438 sur gélose sang additionné de L- arabinose 0.2%. La flèche bleue indique la zone d'hémolyse.

**Activation par les groupements thiols.** Afin de déterminer si cette hémolysine hypothétique identifiée chez Typhi faisait parti des hémolysines activées par les groupements thiols, du L-cystéine a été rajouté au milieu de culture. Toutefois, la

régulation de DEF438 ne permettait pas d'observer l'effet de la répression du gène sur la gélose. En effet, les géloses utilisées (fig. 19B-C) contenaient de l'arabinose, par le fait même il n'y a aucune différence entre la colonie issue de la suspension bactérienne préalablement incubée avec arabinose ou glucose. Tel qu'attendu, aucune hémolyse n'a été observée sur la gélose ne contenant que de la cystéine (fig. 19A). La zone d'hémolyse observée sur la gélose contenant de l'arabinose (fig. 19C) est plus faible que celle observée sur la gélose contenant également de la cystéine (fig. 19B). L'hémolyse due à la protéine STY4221 peut donc être amplifiée par la cystéine.



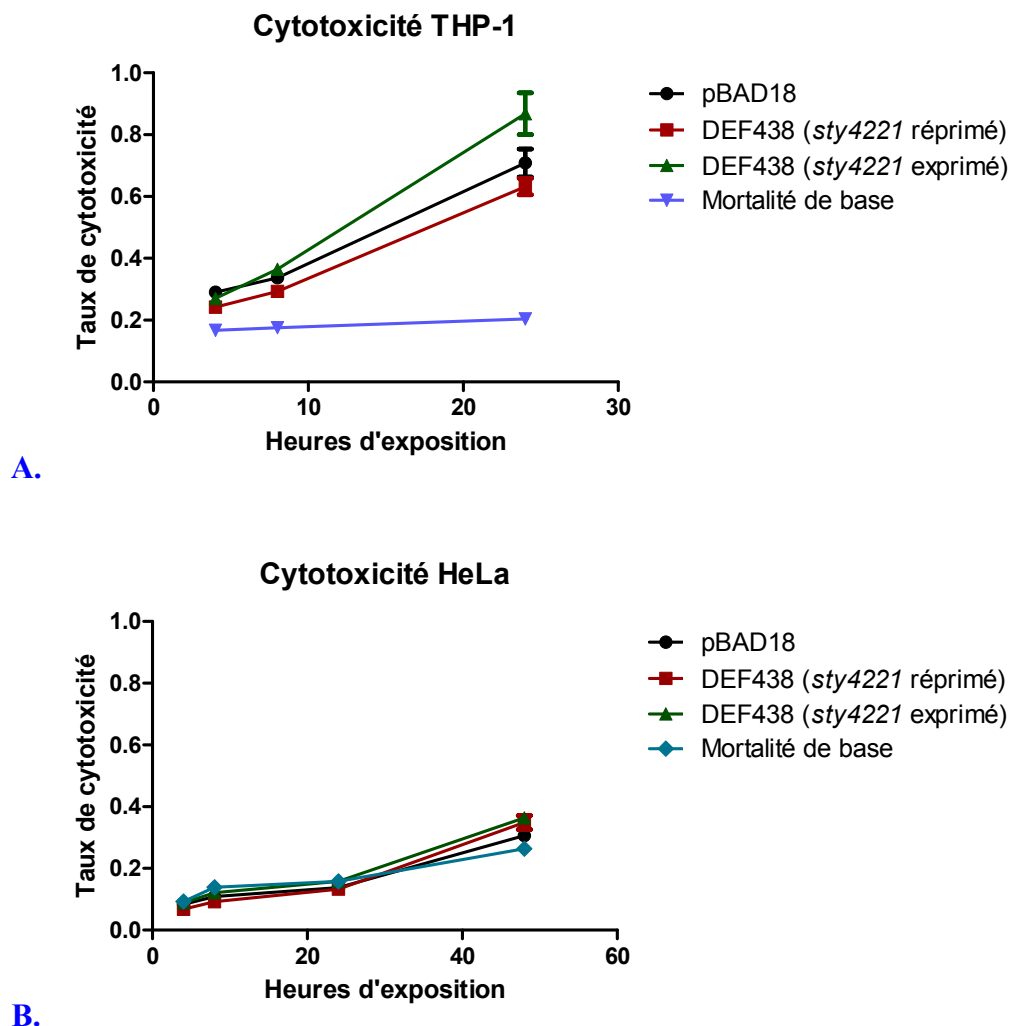
**Figure 19 : Test d'amplification d'hémolyse par la cystéine.**

Évaluation de l'effet hémolytique de la protéine recombinante STY4221 exprimée par *E. coli*. **A)** gélose sang de mouton 5 % (v/v) et chloramphénicol, additionnée de cystéine, **B)** gélose sang de mouton 5 % (v/v) et chloramphénicol, additionnée de 12 mM de cystéine et de L-arabinose 0,2 % et **C)** gélose sang de mouton 5 % (v/v) et chloramphénicol et de L-arabinose 0,2 %. L'encadré rouge est un agrandissement (1,5X) des points 2 et 3. Cm, chloramphénicol; Cyst, L-cystéine 12 mM; Ara, L-arabinose.

**Test de l'activité cytotoxique sur différentes lignées cellulaires.** Afin de déterminer si l'activité hémolytique de la protéine STY4221 est plutôt un effet accessoire d'une cytotoxine, différents tests de viabilité ont été réalisés. En premier lieu, une évaluation sommaire a été réalisée en faisant un test au bleu de Trypan. Cette évaluation a bel et bien permis de noter qu'il y avait une mort cellulaire, toutefois, cette technique n'était pas assez sensible pour détecter une différence entre les trois surnageants testés. Un test de cytotoxicité basé sur la relâche du LDH a donc été utilisé. Dans un premier temps, l'effet de l'addition de surnageant de culture de la souche DEF438 produisant la protéine STY4221 a été testé sur une lignée cellulaire de macrophages humains THP-1 (fig. 20A). Notamment, un taux de cytotoxicité élevé (vert; 93 %) a été décelé lorsque les macrophages sont mis en présence du produit du gène *sty4221* pour une durée de 24 heures. Parallèlement, un effet cytotoxique semblable a également été observé pour le surnageant filtré recueilli des suspensions de pBAD18 (noire; 76,2 %) et de DEF438 (rouge; 72,7 %) réprimé, comparativement à la courbe de mortalité normale (bleu clair; 35,1 %) après 24hrs (fig. 20A). Or, aucune étape de purification de la protéine du surnageant n'a été effectuée, il est possible que d'autres protéines et déchets métaboliques auraient très bien pu passer à travers le filtre. On pourrait donc s'avancer à dire que le produit du gène *sty4221* semble avoir un effet cytotoxique sur les macrophages humains THP-1. Dans un second temps, aucun effet cytotoxique apparent n'a été observé lors de l'exposition de cellules épithéliales humaines, HeLa, au surnageant, et ce, peu importe l'origine du surnageant utilisé (fig. 20B). La lignée cellulaire HeLa diffère des macrophages THP-1, entre autres, de par leur capacité à se multiplier. Toutefois, le taux de mortalité entre les cellules exposées à du surnageant n'est pas significativement



différent de la courbe de mortalité normale des cellules HeLa en culture. L'effet du produit du gène *sty4221* pourrait être spécifique aux macrophages.

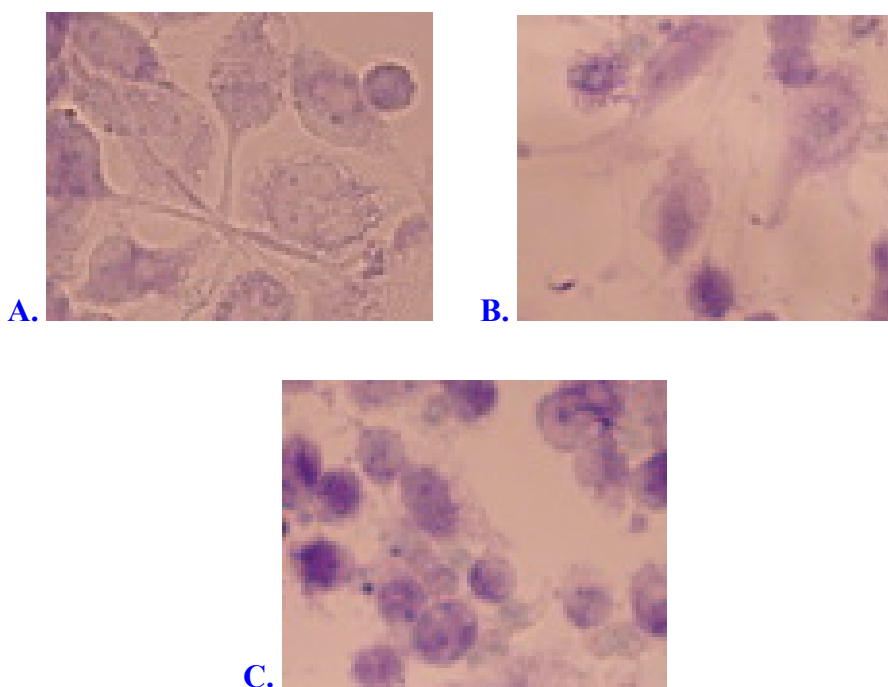


**Figure 20 : Test de cytotoxicité sur cultures cellulaires de THP-1 et HeLa.**

A) macrophages humains THP-1 B) cellules épithéliales humaines HeLa en fonction du temps d'exposition aux différents surnageants.

Afin de vérifier l'effet microscopique de la protéine à l'étude sur les macrophages après 48 heures d'exposition au surnageant de culture, ces derniers ont été colorés au Giemsa. A priori, les macrophages exposés au TSB, uniquement, ne démontrent aucune caractéristique anormale ou particulière (fig. 21A). Par contre, l'ajout de

surnageant de DEF438 réprimé suffit à réduire le nombre de macrophages. Toutefois des macrophages en bon état sont encore observables dans ces conditions (fig. 21B), cela correspond également avec les résultats observés lors du test de cytotoxicité (fig. 20A). L'ajout de surnageant de DEF438 exprimé a un effet radical sur le nombre total de cellules qui diminue, mais aussi sur la morphologie des macrophages qui est altérée, lors de cette observation aucun macrophage en bon état n'a été observé (fig. 21C).

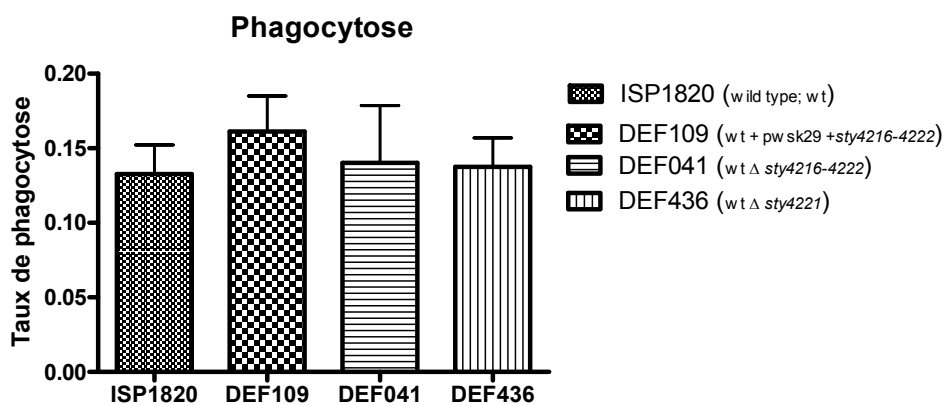


**Figure 21: Détermination de l'effet cytotoxique de STY4221 sur les macrophages THP-I.**

Observation au microscope photonique (40X). Après 48 heures d'exposition à du surnageant (1 :1) de : **A)** du bouillon TSB, **B)** DEF438 cultivé en présence de D-glucose 0,2 % et **C)** DEF438 cultivé en présence de L-arabinose 0,2 %.

**Infection de macrophages humains.** La protéine codée par le gène *sty4221* ayant démontré une certaine spécificité pour les macrophages, il était normal de s'interroger quant à l'importance de ce gène lors de l'infection ou de la survie à l'intérieur des

macrophages. Pour répondre à cette question, le gène à l'étude ainsi que la région *sty4216-4222* ont été délétés du génome de la souche ISP1820, pour ainsi créer les souches DEF436 ( $\Delta sty4221$ ) et DEF041 ( $\Delta sty4216-4222$ ). Une infection de macrophages a été effectuée et le taux de phagocytose, de multiplication après 2 heures et de survie des souches bactériennes ont été évaluées à partir d'un décompte du nombre d'unités viables. Un résumé de l'infection est ici présenté à la figure 21. De toute évidence, la délétion de cette région du génome de Typhi ne semble pas influencer l'infection et la survie de Typhi dans les macrophages. On peut donc déduire que le gène *sty4221* n'est pas nécessaire dans les conditions expérimentales testées. Effectivement, en tenant compte des barres d'erreurs, il n'y a pas de différence significative entre une infection menée par la souche sauvage et celle des deux mutants étudiés. Ainsi, on observe pour les mutants un profil de phagocytose identique à celui de la souche sauvage. Tandis que les légères différences observées pour les taux de survie à 2 heures et à 24 heures ne sont pas statistiquement significatives.



A.

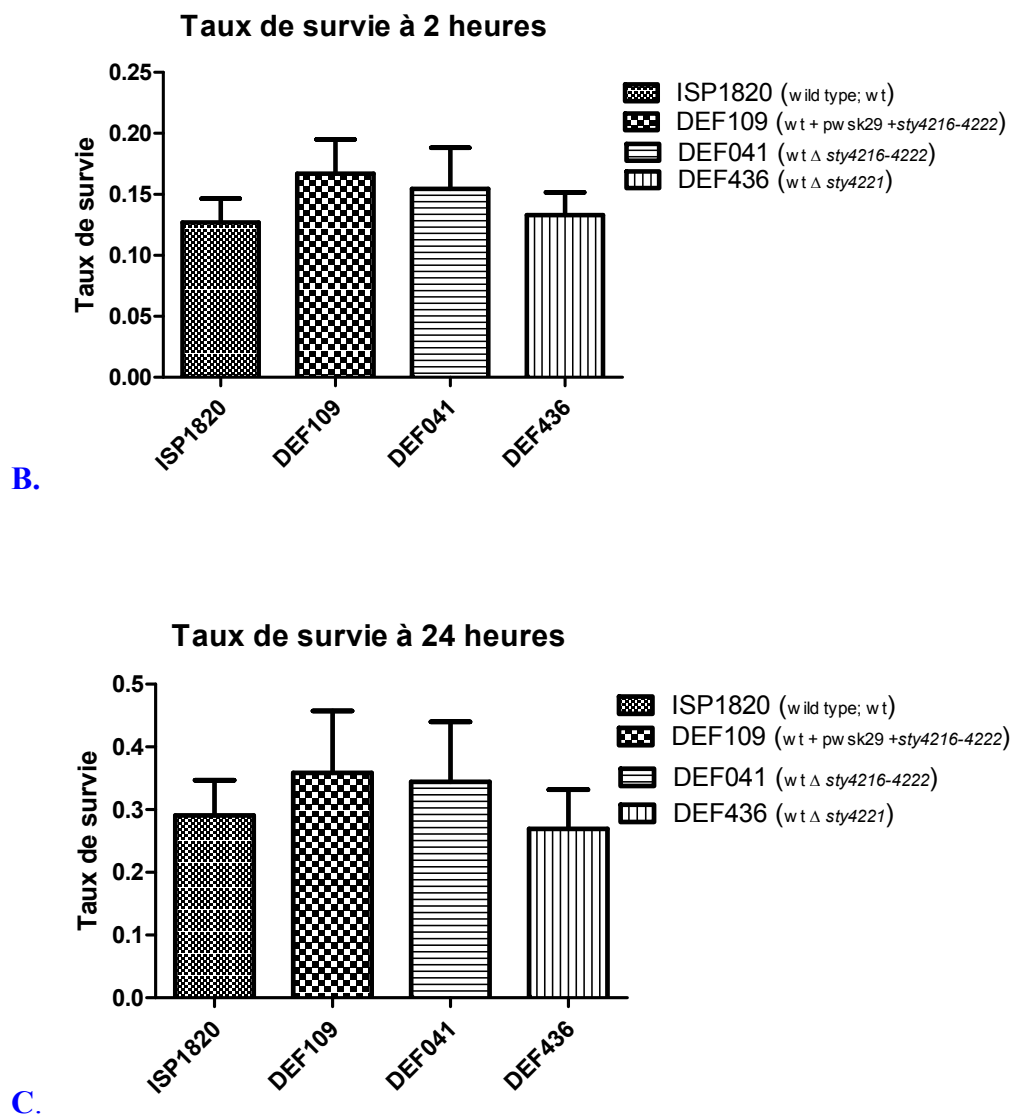


Figure 22 : Test d'infection de macrophages humains THP-1.

**Test d'adhérence et d'invasion.** Les cellules épithéliales ne semblaient pas être affectées par le surnageant de culture des souches utilisées. Toutefois, il était logique de vérifier si la protéine STY4221 était impliquée dans les étapes d'adhésion ou d'invasion de la cellule épithéliale. Pour ce faire des tests d'invasion et d'adhésion ont été entrepris en triplicata biologiques et à trois reprises. Les souches utilisées étaient mutantes pour le gène *sty4221* (DEF436) et l'autre souche (DEF437) portait la

même délétion génomique, mais était également porteuse d'un plasmide contenant la région *sty4216-4222*. Ces deux souches ont été comparées à la souche sauvage ISP1820. Par contre, pour ce qui est de l'adhésion, les trois souches ont vraisemblablement le même phénotype (fig. 23A). Tel qu'attendu, la délétion du gène ne semble pas nuire ou favoriser l'adhésion aux cellules épithéliales. Toutefois, les profils d'invasion diffèrent entre les souches. En effet, la souche DEF437 semble suivre le même patron d'invasion que la souche sauvage. Or, la souche DEF436 semble être moins apte à envahir que les deux autres (fig. 23B).

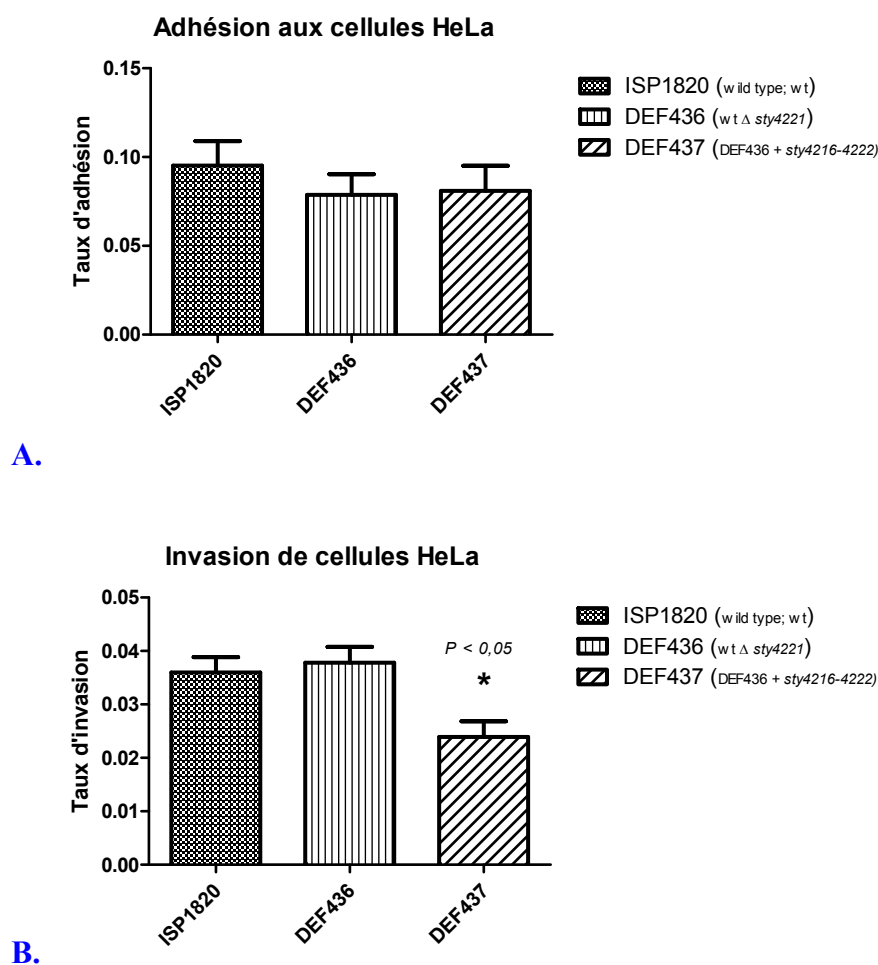
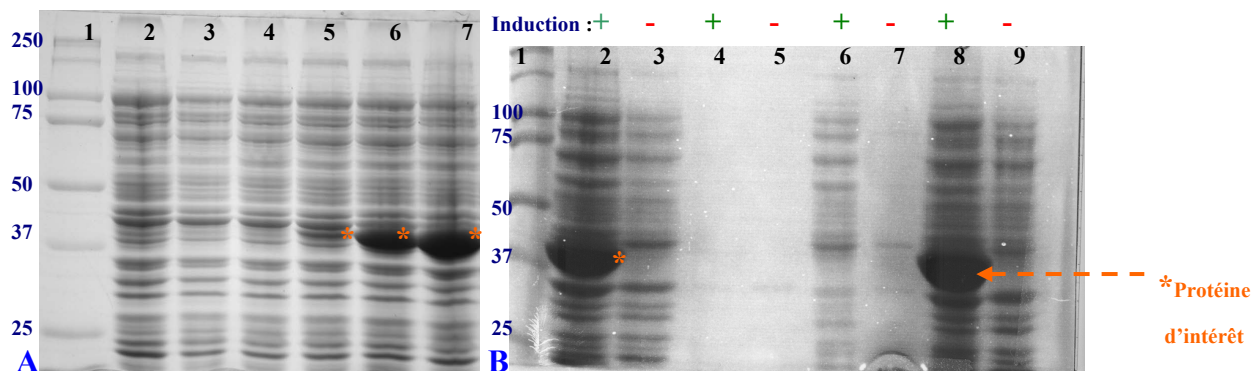


Figure 23. Test d'adhésion et d'invasion sur cellules HeLa.

**Expression et extraction de la protéine STY4221.** Une première tentative de purification de la protéine à l'étude a été entreprise. Or, il s'agit d'une protéine nouvelle et pour laquelle aucun anticorps n'est encore disponible. Nous avons donc fait le choix de cloner le gène *sty4221* dans un vecteur à moyen nombre de copies (pET21) permettant d'étiqueter la protéine produite à l'aide d'une queue de poly-histidine. En premier lieu, il a fallu déterminer les conditions nécessaires pour produire une quantité appréciable et optimale de la protéine STY4221 recombinante. En suivant les recommandations du fournisseur (Novagen), la concentration finale d'IPTG a été ajustée (résultats non démontrés ici). Aussi, il a été possible de déterminer la durée minimum d'induction pour qu'il y ait une production appréciable de protéines (fig. 24A). Ainsi, après une heure d'induction, il est possible d'observer la présence de la protéine au bleu de Coomassie. Toutefois, trois heures d'induction a été retenue comme temps d'induction pour les expériences suivantes. Aussi, en effectuant des fractions cellulaires, il a été possible d'identifier la fraction cellulaire où se retrouvait en plus grande quantité la protéine recombinante produite (fig. 24B). Dans le cas présent, la protéine à l'étude se trouvait dans la fraction cellulaire des protéines insolubles, soit les corps d'inclusion. La taille de la protéine recombinante obtenue ne peut être déterminée avec certitude avec les outils utilisés. Toutefois, tel qu'attendu, la protéine migrée sur gel se situe entre 37 et 50 kDa. Les étapes de purification de la protéine n'ont pas été continuées au-delà de ces découvertes.



**Figure 24 : Visualisation de la protéine STY4221 recombinante.**

Gel 10% SDS-PAGE d'échantillons protéiques non-dosés. **A)** Variation de la production de la protéine recombinante en fonction du temps d'induction. (1. échelle moléculaire; 2, pET21 vide et induit; les suivants sont DEF440 induit pendant : 3, 15 min; 4, 30 min; 5, 1 hr; 6, 2 hrs; 7, 3 hrs) **B)** Localisation de la protéine recombinante dans la cellule bactérienne suite à un temps d'induction de 3hrs. (1. échelle moléculaire; chiffre paire DEF440 induit, impaire DEF440 non induit; 2-3 : Fraction de l'ensemble des protéines cellulaires; 4-5 : fraction des protéines extracellulaires (surnageant); 6-7 : fraction des protéines intracellulaires solubles; 8-9 : protéines intracellulaires insolubles (corps d'inclusion).

## 4. Chapitre 4 : Discussion

La présente étude a été entamée dans le but de caractériser la région *sty4216-4222*, unique à *Salmonella enterica* sérovar Typhi, dont l'expression intracellulaire a été confirmée dans les macrophages THP-1 [42]. Or, parmi les cinq gènes composant cette région, se trouve le gène *sty4221* [138] qui, suite à des recherches bio-informatiques, démontre une certaine homologie de séquence avec une hémolysine atypique de *Treponema denticola*. Conséquemment, de plus amples mesures ont été entreprises pour approfondir l'investigation sur ce gène.

Les études bio-informatiques entreprises ont permis de constater que le produit du gène *sty4221* partageait de nombreuses caractéristiques similaires à la protéine Hly de chez *T. denticola*. Aussi, la séquence d'acides aminés de STY4221 porte les résidus d'acides aminés conservés chez les aminotransférases (Fig. 17), ainsi que le site de fixation du cofacteur pyridoxal-phosphate nécessaire pour la fonction des aminotransférases I/II. Chu et ses collaborateurs ont démontré que la protéine Hly de *T. denticola* possédait non seulement une activité d'aminotransférase, mais également une activité hémolytique [26]. Il était donc logique de vérifier si la protéine STY4221 possédait également des propriétés hémolytiques.

Pour ce faire, le gène *sty4221* a été cloné dans un vecteur contenant un promoteur inductible à l'arabinose (pBAD18) et transformé dans une souche DH5 $\alpha$  d'*E. coli*. A priori, la séquence déduite d'acides aminés du gène *sty4221* ne possédait aucune homologie de séquence avec des hémolysines connues, mise à part Hly de *T. denticola* qui a été caractérisée [26]. L'activité hémolytique de la protéine STY4221 a



été testée sur gélose sang, et en respectant le protocole décrit pour la protéine Hly, une zone d'hémolyse a été observée. Cette zone était absente sur les géloses inoculées avec la souche DH5 $\alpha$  et DEF438 réprimée (Fig. 18)

La protéine Hly a une activité hémolytique amplifiée par la présence de cystéine dans le milieu [26]. Habituellement, les hémolysines activées par les groupements thiols, généralement retrouvées chez *Streptococcus suis*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus alveoli* et *Streptococcus pneumoniae*, ont toutes une séquence d'acides aminés similaire [60], mais aucune n'a d'homologie importante avec Hly ou encore avec le produit du gène *sty4221*. Néanmoins, cette recherche a tout de même pu démontrer que l'hémolyse produite par STY4221 est amplifiée par la présence de cystéine dans le milieu (Fig. 19), ce qui est typiquement observé chez les hémolysines activées par les groupements thiols. Ces dernières ont également, de manière générale, un à deux résidus de cystéines par molécule, alors que Hly et l'hémolysine de Typhi en compte respectivement six et sept. Les hémolysines activées par les groupements thiols lysent généralement les cellules en séquestrant le cholestérol membranaire ou en formant des pores dans la membrane [50]. Cependant, la littérature fait peu état de la capacité de *Salmonella* Typhi à produire une hémolyse sur gélose sang dans les conditions expérimentales de routine, sauf lorsque les colonies sont formées à l'intérieur de la gélose [147]. De la même manière, les hémolysines activées par les groupements thiols sont généralement sensibles à la présence d'oxygène et sont activées en anaérobiose [60]. Paradoxalement, les hémolysines activées par les groupements thiols sont habituellement retrouvées chez les bactéries Gram positif [50]. Or, il

semblerait qu'il existe d'autres régions chez Typhi, telle que *sty4422-4424* qui code pour une kinase sérine/thréonine, habituellement retrouvée chez les eucaryotes, mais qui a été récemment découverte que chez les bactéries Gram positif [44]. D'autre part, l'hydrophobicité de la séquence déduite de cette nouvelle hémolysine de Typhi est beaucoup plus faible que celle des hémolysines dont le mode d'action réside dans la liaison à la membrane des érythrocytes [26]. Naturellement, des questions persistent quant à la fonction physiologique de la protéine STY4221. À ce sujet, Chu et al. [26] posent de nombreuses hypothèses pour ce qui a trait à Hly; il pourrait s'agir d'une hémolysine dont le mécanisme d'action serait nouveau ou une enzyme impliquée dans la dégradation d'acides aminés et dont l'activité hémolytique serait secondaire. Autrement, la cystéine pourrait être utilisée comme substrat par l'hémolysine pour la production de H<sub>2</sub>S, qui est toxique pour la cellule [26]. Ces hypothèses sont également valables pour la protéine à l'étude. D'autres manipulations expérimentales devront être entreprises afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette protéine. Ainsi, il faudra trouver les conditions optimales menant à la lyse des érythrocytes; telles que les milieux de culture à utiliser pour maximiser la production d'hémolysine, vérifier l'effet de la présence versus l'absence d'oxygène sur l'hémolyse et de déterminer si celle-ci varie en fonction de l'origine animale des érythrocytes utilisés. De plus, il serait possible de détecter la production de H<sub>2</sub>S par l'hémolysine en utilisant des géloses peptone-fer ou autre.

Afin de mieux caractériser cette nouvelle hémolysine, des tests de cytotoxicité ont été exécutés. Une quantification du LDH relâché est basée sur le fait que cette enzyme est strictement cytoplasmique et que sa présence dans le milieu de culture

reflète une lyse de la membrane plasmique de la cellule hôte. De manière générale, le surnageant d'une suspension bactérienne semble avoir un effet toxique pour la lignée cellulaire de macrophages humains THP-1. Néanmoins, le surnageant obtenu à partir de la suspension contenant le produit du gène *sty4221* a démontré un effet cytotoxique supérieur à celui observé pour un surnageant d'*E. coli* de laboratoire (Fig. 20). Ces observations quantitatives ont également été confirmées par une observation microscopique qualitative. Par contre, le produit du gène *sty4221* ne semble pas avoir eu d'effet sur la viabilité des cellules épithéliales humaines HeLa (Fig.20). Cependant, la littérature concernant les cytotoxines retrouvées chez *Salmonella*, stipule que ces dernières, souvent retrouvées dans la membrane extérieure [81, 130], pouvaient altérer la morphologie des cellules épithéliales, arrêter la synthèse protéique et même causer la mort cellulaire [79, 80]. Il se pourrait donc que cette hémolysine ou ses produits de dégradation n'aient aucun effet sur les cellules épithéliales. Cela pourrait s'expliquer par l'absence d'un récepteur spécifique à la surface membranaire ou encore aux différences dans la composition membranaire entre les macrophages et les cellules épithéliales.

Une infection de macrophages humains a été réalisée afin de déterminer si la région *sty4216-4222* unique à Typhi est impliquée lors de l'interaction avec les macrophages. De toute évidence, la délétion de cette région, tout comme la délétion du gène *sty4221* du génome de Typhi ne semble pas affecter sa capacité à être phagocyté ou à survivre dans les macrophages humains. En effet, la phagocytose observée pour les mutants et la souche sauvage était identique. Aussi, les patrons de survie à 2 heures et à 24 heures étaient également semblables entre les différentes

souches mutantes et la souche sauvage (Fig. 22). De plus, le fait d'exprimer plus d'une copie de la région (DEF109) ne semble pas non plus être déterminant lors de l'interaction avec les macrophages. En toute logique, Typhi n'aurait pas intérêt à sécréter une toxine capable de détruire les macrophages au début de l'infection, puisque c'est là qu'elle persiste. La fièvre typhoïde consiste en une infection systémique et la dissémination dans l'organisme est médiée par les macrophages circulants. Toutefois, il est connu que la région est exprimée dans les macrophages [42], l'on pourrait donc avancer l'hypothèse que cette nouvelle hémolysine serait utilisée lorsque la bactérie quitte le macrophage pour se disperser dans d'autres cellules de l'organisme. Ainsi, cette nouvelle hémolysine serait à Typhi ce que la listériolysine est à *L. monocytogenes* (une hémolysine activée par les groupements thiols). Or, les résultats obtenus lors de l'infection de macrophages n'acquiescent pas en ce sens. En effet, cette théorie se serait traduite par une augmentation du taux de survie dans les macrophages, comparativement au type sauvage, puisqu'incapables de sortir les bactéries mutantes ne seraient pas tuées par la présence de gentamicine dans le milieu de culture RPMI. Les résultats actuels d'infection de macrophages (Fig. 22) permettent de postuler l'hypothèse selon laquelle les conditions expérimentales utilisées n'étaient pas optimales pour l'étude de la région *sty4216-4222* et pour le gène *sty4221*. Ainsi, l'on pourrait modifier le protocole d'infection, par exemple en allongeant la période d'observation à 48 heures au lieu de 24 heures. En effet, le temps de résidence moyen de Typhi dans un macrophage de l'hôte n'est pas connu, l'utilité de la protéine pourrait être important qu'une semaine après l'infection. Il serait intéressant d'induire la production de l'hémolysine au sein même des macrophages, par exemple en utilisant un vecteur inductible à la tétracycline ou

l'IPTG. Conséquemment, il sera possible de déterminer quel est l'effet de la libération de l'hémolysine dans les macrophages et non dans le milieu. En outre, un PCR en temps réel pourrait aussi être réalisé afin de déterminer à quel moment de l'infection le gène *sty4221* est exprimé.

Un test d'adhésion et d'invasion sur cellules épithéliales humaines HeLa a également été réalisé. Encore une fois, les résultats expérimentaux obtenus sont les mêmes pour la souche sauvage et le mutant pour le gène *sty4221* et le mutant complété (DEF436) (Fig. 23). Ainsi, le gène *sty4221* ne semble pas intervenir à l'étape d'adhésion à la membrane de la cellule épithéliale. Pour ce qui est de l'invasion, aucune différence n'a été observée entre la souche sauvage et la souche portant la délétion du gène *sty4221* (DEF436). Toutefois, le complément DEF437 semblait être moins invasif que la souche sauvage et DEF436. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fardeau énergétique que représente le vecteur pSIF044. Ainsi, la souche survivrait au départ moins bien que les autres souches. Des courbes de croissance devront être exécutées afin d'éliminer cette hypothèse. La région *sty4216-422* a été utilisée pour compléter le mutant DEF436. Or, il n'est pas exclus que ces autres protéines pourraient interférer dans l'interprétation des résultats obtenus puisqu'ils se trouvent en plus d'une copie au sein du génome du mutant DEF437. Un complément de DEF436 devrait être fait à partir d'un vecteur portant un promoteur inductible. Parallèlement, d'autres lignées de cellules épithéliales devraient être testées, des lignées cellulaires de muqueuses intestinales devraient figurer parmi les différentes lignées de cellules à tester.

Afin de raffiner nos connaissances sur les fonctions de la protéine STY4221, il était normal de songer à purifier la protéine. Conséquemment, le gène *sty4221* a été cloné au sein du vecteur pET21a, qui permet d'étiqueter la protéine à l'étude à l'aide d'une queue poly-histidines. L'expression et la localisation de la protéine recombinante ont été réalisées. Ainsi, la durée d'induction, la concentration d'IPTG requis et la fraction cellulaire où l'on retrouve la protéine ont été déterminées. Cependant, l'opportunité de purifier cette protéine ne s'était toujours pas présentée au moment d'écrire ce mémoire. La purification de la protéine permettrait de déterminer, entre autres, la concentration de STY4221 nécessaire pour qu'il y ait un effet toxique sur différentes lignées cellulaires (épithéliales ou érythrocytes). La protéine purifiée permettrait également de quantifier l'activité d'aminotransférase de la protéine. Une fois, la protéine purifiée, il sera également possible de produire des anticorps, qui permettront de déterminer avec plus de précision la localisation de la protéine chez la souche sauvage.

Par ailleurs, le type de sécrétion utilisée par cette nouvelle hémolysine reste encore un mystère à résoudre. La faible hydrophobicité de la séquence déduite d'acides aminés soulève également de nombreuses interrogations quant au mode d'action de cette protéine. L'utilisation d'un système de transport de type vésicule de la membrane externe (OMV) [146], tel que celui utilisé par ClyA, une autre cytotoxine retrouvée chez Typhi, pourrait être une réponse [108]. En effet, ce type de vésicules a la capacité de quitter la membrane externe bactérienne et de fusionner avec la membrane de la cellule hôte. De plus, des études ont démontré que ClyA, également retrouvée chez certaines souches d'*E. coli* pouvait avoir un effet

cytotoxique, même apoptotique sur les cultures de monocytes et de macrophages [82]. Autrement, à l'image de la protéine CdtB, STY4221 pourrait être sécrétée à l'extérieure de la SCV grâce au concours de protéines de transport. De plus, diverses méthodes pourront être entreprises, telles que mentionnées, pour vérifier si le produit du gène *sty4221* est exprimé au niveau de la membrane extracellulaire ou si ce dernier est sécrété dans le milieu.

La régulation du gène *sty4221 in vivo* est un autre aspect intéressant de l'étude de la région dont il provient. Manifestement, la région *sty4217-4222* formerait un opéron. La fonction des gènes en bordure de *sty4221* étant toute inconnue, il est légitime de se demander si elles n'étaient pas reliées à l'expression de l'hémolysine. Tel que mentionné plus tôt, le gène à l'étude est à proximité d'un gène codant probablement pour une protéine interagissant avec l'ADN, qui en d'autres mots pourrait avoir une fonction régulatrice quant à l'expression de cette nouvelle hémolysine. De plus, un autre gène de l'opéron semble également coder pour une protéine régulatrice. Il est possible que l'hémolysine produite soit sujette à des régulations post-transcriptionnelles qui pourraient être reliées à sa fonction. Aussi, parmi les autres gènes composant la région, se trouve une protéine hypothétique membranaire. Cette dernière pourrait être impliquée dans l'excrétion de la protéine produite par *sty4221*. Toutefois, tout cela n'est que supposition, et bien des choses sont à découvrir au sujet de cette région.

## 5. Chapitre 5 : Conclusion

En somme, cette étude a permis de mettre en évidence la présence d'une toute nouvelle toxine, unique à Typhi qui n'a pas encore été décrite dans la littérature. La protéine STY4221, est présumément une aminotransférase, tel que le démontre les domaines conservés lors de l'analyse bio-informatique. De manière expérimentale, il a été démontré que cette protéine, tout comme son homologue Hly chez *T. denticola*, possède une activité hémolytique. Or, cette activité est amplifiée lorsque mis en présence de cystéine, au même titre que certaines hémolysines retrouvées chez les Gram positif. Le mode d'action utilisé par STY4221 pour lyser les cellules est encore inconnu. Toutefois, il a été démontré que cette nouvelle hémolysine pouvait également avoir un effet cytotoxique peut-être spécifique aux macrophages humains THP-1, puisqu'aucun effet sur les cellules épithéliales HeLa n'a été observé. La délétion du gène *sty4221* ne semble pas affecter le taux de phagocytose ou de survie dans lesdits macrophages, dans les conditions expérimentales testées. Le gène *sty4221* n'a pas démontré d'implication au niveau de l'adhésion et de l'invasion des cellules épithéliales HeLa non plus.

Ce mémoire jette les premières bases de la caractérisation de la protéine STY4221, une nouvelle hémolysine unique à Typhi. Ces écrits se veulent une contribution à l'approfondissement de nos connaissances du génome de Typhi et à une meilleure compréhension des mécanismes utilisés par cet agent infectieux lors de sa pathogénèse. Il est intéressant de noter que le gène *sty4221* a été suggéré comme séquence cible dans l'établissement de tests diagnostiques pour la fièvre typhoïde.



## Références

1. 1927. *Carl Joseph Eberth*. Am J Public Health (N Y) **17**:381.
2. **Allaker, R. P.** 2008. *Host defence peptides-a bridge between the innate and adaptive immune responses*. Trans R Soc Trop Med Hyg **102**:3-4.
3. **Arricau, N., D. Hermant, H. Waxin, C. Ecobichon, P. S. Duffey, and M. Y. Popoff.** 1998. *The RcsB-RcsC regulatory system of Salmonella typhi differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity*. Mol Microbiol **29**:835-50.
4. **ASPC.** 2001. *Salmonella Typhi: Fiches techniques santé/sécurité (FTSS)*. In A. d. l. s. p. d. Canada (ed.).
5. **Bader, M. W., S. Sanowar, M. E. Daley, A. R. Schneider, U. Cho, W. Xu, R. E. Klevit, H. Le Moual, and S. I. Miller.** 2005. *Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase*. Cell **122**:461-72.
6. **Baker, S., and G. Dougan.** 2007. *The genome of Salmonella enterica serovar Typhi*. Clin Infect Dis **45 Suppl 1**:S29-33.
7. **Baker, S., J. Hardy, K. E. Sanderson, M. Quail, I. Goodhead, R. A. Kingsley, J. Parkhill, B. Stocker, and G. Dougan.** 2007. *A novel linear plasmid mediates flagellar variation in Salmonella Typhi*. PLoS Pathog **3**:e59.
8. **Baumler, A. J., R. M. Tsolis, T. A. Ficht, and L. G. Adams.** 1998. *Evolution of host adaptation in Salmonella enterica*. Infect Immun **66**:4579-87.
9. **Beltran, P., S. A. Plock, N. H. Smith, T. S. Whittam, D. C. Old, and R. K. Selander.** 1991. *Reference collection of strains of the Salmonella typhimurium complex from natural populations*. J Gen Microbiol **137**:601-6.
10. **Bender, D. A.** 1975. Amino acid metabolism. Wiley, London; Toronto.
11. **Bergey, D. H., J. G. Holt, and R. G. E. Murray.** 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore.
12. **Bhan, M. K., R. Bahl, and S. Bhatnagar.** 2005. *Typhoid and paratyphoid fever*. Lancet **366**:749-62.
13. **Bhan, M. K., R. Bahl, S. Sazawal, A. Sinha, R. Kumar, D. Mahalanabis, and J. D. Clemens.** 2002. *Association between Helicobacter pylori infection and increased risk of typhoid fever*. J Infect Dis **186**:1857-60.

14. **Bhutta, Z. A.** 2006. *Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever.* *Bmj* **333**:78-82.
15. **Biedzka-Sarek, M., and M. El Skurnik.** 2006. *How to outwit the enemy: dendritic cells face Salmonella.* *Apmis* **114**:589-600.
16. **Bischofberger, M., and F. G. van der Goot.** 2008. *Exotoxin secretion: getting out to find the way in.* *Cell Host Microbe* **3**:7-8.
17. **Bishop, A., D. House, T. Perkins, S. Baker, R. A. Kingsley, and G. Dougan.** 2008. *Interaction of Salmonella enterica serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion.* *Microbiology* **154**:1914-26.
18. **Bishop, J. L., and B. B. Finlay.** 2006. *Friend or foe? Antimicrobial peptides trigger pathogen virulence.* *Trends Mol Med* **12**:3-6.
19. **Bourgault, A.-M.** 2007. Rapport d'activité 2006-2007 du Laboratoire de Santé Publique du Québec 702. Institut National de Santé Publique.
20. **Boyd, E. F., S. Porwollik, F. Blackmer, and M. McClelland.** 2003. *Differences in gene content among Salmonella enterica serovar typhi isolates.* *J Clin Microbiol* **41**:3823-8.
21. **Brandtzaeg, P., I. N. Farstad, and G. Haraldsen.** 1999. *Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track.* *Immunol Today* **20**:267-77.
22. **Brown, K. L., and R. E. Hancock.** 2006. *Cationic host defense (antimicrobial) peptides.* *Curr Opin Immunol* **18**:24-30.
23. **CDC August 1, 2008** 2008, posting date. Investigation of Outbreak of Infections Caused by *Salmonella* Saintpaul. Center of Disease Control. [Online.]
24. **Charifi, M., and A. A. Salehi.** 2006. *[Retrospective study on the isolated strains of Salmonella in an Iranian hospital in Kermanshah].* *East Mediterr Health J* **12**:798-803.
25. **Chiu, C. H., L. H. Su, and C. Chu.** 2004. *Salmonella enterica serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment.* *Clin Microbiol Rev* **17**:311-22.
26. **Chu, L., A. Burgum, D. Kolodrubetz, and S. C. Holt.** 1995. *The 46-kilodalton-hemolysin gene from Treponema denticola encodes a novel hemolysin homologous to aminotransferases.* *Infect Immun* **63**:4448-55.

27. **Crump, J. A., S. P. Luby, and E. D. Mintz.** 2004. *The global burden of typhoid fever.* Bull World Health Organ **82**:346-53.
28. **Crump, J. A., P. K. Ram, S. K. Gupta, M. A. Miller, and E. D. Mintz.** 2008. *Part I. Analysis of data gaps pertaining to Salmonella enterica serotype Typhi infections in low and medium human development index countries, 1984-2005.* Epidemiol Infect **136**:436-48.
29. **Cummings, L. A., W. D. Wilkerson, T. Bergsbaken, and B. T. Cookson.** 2006. *In vivo, fliC expression by Salmonella enterica serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted.* Mol Microbiol **61**:795-809.
30. **Daigle, F., J. E. Graham, and R. Curtiss, 3rd.** 2001. *Identification of Salmonella typhi genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS).* Mol Microbiol **41**:1211-22.
31. **Daigle, F., J. Y. Hou, and J. E. Clark-Curtiss.** 2002. *Microbial gene expression elucidated by selective capture of transcribed sequences (SCOTS).* Methods Enzymol **358**:108-22.
32. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.* Proc Natl Acad Sci U S A **97**:6640-5.
33. **Deng, W., S. R. Liou, G. Plunkett, 3rd, G. F. Mayhew, D. J. Rose, V. Burland, V. Kodoyianni, D. C. Schwartz, and F. R. Blattner.** 2003. *Comparative genomics of Salmonella enterica serovar Typhi strains Ty2 and CT18.* J Bacteriol **185**:2330-7.
34. **DeRoeck, D., L. Jodar, and J. Clemens.** 2007. *Putting typhoid vaccination on the global health agenda.* N Engl J Med **357**:1069-71.
35. **Dorsey, C. W., M. C. Laarakker, A. D. Humphries, E. H. Weening, and A. J. Baumler.** 2005. *Salmonella enterica serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin.* Mol Microbiol **57**:196-211.
36. **Dunstan, S. J., H. A. Stephens, J. M. Blackwell, C. M. Duc, M. N. Lanh, F. Dudbridge, C. X. Phuong, C. Luxemburger, J. Wain, V. A. Ho, T. T. Hien, J. Farrar, and G. Dougan.** 2001. *Genes of the class II and class III major histocompatibility complex are associated with typhoid fever in Vietnam.* J Infect Dis **183**:261-268.
37. **Eichelberg, K., and J. E. Galan.** 2000. *The flagellar sigma factor FliA (sigma(28)) regulates the expression of Salmonella genes associated with the centisome 63 type III secretion system.* Infect Immun **68**:2735-43.

38. **Ellermeier, C. D., and J. M. Slauch.** 2006. The Prokaryotes, p. 123 - 158, The Genus *Salmonella*, Springer New York ed, vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass.
39. **Encheva, V., R. Wait, S. Begum, S. E. Gharbia, and H. N. Shah.** 2007. *Protein expression diversity amongst serovars of Salmonella enterica.* Microbiology **153**:4183-93.
40. **Engels, E. A., M. E. Falagas, J. Lau, and M. L. Bennish.** 1998. *Typhoid fever vaccines: a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity.* Bmj **316**:110-6.
41. **Ernst, R. K., T. Guina, and S. I. Miller.** 2001. *Salmonella typhimurium outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity.* Microbes Infect **3**:1327-34.
42. **Faucher, S. P., R. Curtiss, 3rd, and F. Daigle.** 2005. *Selective capture of Salmonella enterica serovar typhi genes expressed in macrophages that are absent from the Salmonella enterica serovar Typhimurium genome.* Infect Immun **73**:5217-21.
43. **Faucher, S. P., S. Porwollik, C. M. Dozois, M. McClelland, and F. Daigle.** 2006. *Transcriptome of Salmonella enterica serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences.* Proc Natl Acad Sci U S A **103**:1906-11.
44. **Faucher, S. P., C. Viau, P. P. Gros, F. Daigle, and H. Le Moual.** 2008. *The prpZ gene cluster encoding eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases is repressed by oxidative stress and involved in Salmonella enterica serovar Typhi survival in human macrophages.* FEMS Microbiol Lett **281**:160-6.
45. **Figuroa-Bossi, N., S. Uzzau, D. Maloriol, and L. Bossi.** 2001. *Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in Salmonella.* Mol Microbiol **39**:260-71.
46. **Finlay, B. B., and G. McFadden.** 2006. *Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens.* Cell **124**:767-82.
47. **Forest, C., S. P. Faucher, K. Poirier, S. Houle, C. M. Dozois, and F. Daigle.** 2007. *Contribution of the stg fimbrial operon of Salmonella enterica serovar Typhi during interaction with human cells.* Infect Immun **75**:5264-71.
48. **Fuentes, J. A., N. Villagra, M. Castillo-Ruiz, and G. C. Mora.** 2008. *The Salmonella Typhi hlyE gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to S. Typhimurium promotes deep organ infection in mice.* Res Microbiol **159**:279-87.

49. **Garcia Vescovi, E., F. C. Soncini, and E. A. Groisman.** 1996. *Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of Salmonella virulence.* Cell **84**:165-74.
50. **Geoffroy, C., J. Mengaud, J. E. Alouf, and P. Cossart.** 1990. *Alveolysin, the thiol-activated toxin of Bacillus alvei, is homologous to listeriolysin O, perfringolysin O, pneumolysin, and streptolysin O and contains a single cysteine.* J Bacteriol **172**:7301-5.
51. **Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski, and J. L. Madara.** 2001. *Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression.* J Immunol **167**:1882-5.
52. **Gibbons, H. S., S. R. Kalb, R. J. Cotter, and C. R. Raetz.** 2005. *Role of Mg<sup>2+</sup> and pH in the modification of Salmonella lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells.* Mol Microbiol **55**:425-40.
53. **Graham, J. E., and J. E. Clark-Curtiss.** 1999. *Identification of Mycobacterium tuberculosis RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS).* Proc Natl Acad Sci U S A **96**:11554-9.
54. **Grassl, G. A., and B. B. Finlay.** 2008. *Pathogenesis of enteric Salmonella infections.* Curr Opin Gastroenterol **24**:22-6.
55. **Groisman, E. A.** 2001. *The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ.* J Bacteriol **183**:1835-42.
56. **Groisman, E. A., and C. Mouslim.** 2006. *Sensing by bacterial regulatory systems in host and non-host environments.* Nat Rev Microbiol **4**:705-9.
57. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter.* J Bacteriol **177**:4121-30.
58. **Haghjoo, E., and J. E. Galan.** 2004. *Salmonella typhi encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A **101**:4614-9.
59. **Hanahan, D., J. Jessee, and F. R. Bloom.** 1991. *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria.* Methods Enzymol **204**:63-113.
60. **Haque, A., N. Sugimoto, Y. Horiguchi, T. Okabe, T. Miyata, S. Iwanaga, and M. Matsuda.** 1992. *Production, purification, and characterization of botulinolysin, a thiol-activated hemolysin of Clostridium botulinum.* Infect Immun **60**:71-8.

61. **Haraga, A., M. B. Ohlson, and S. I. Miller.** 2008. *Salmonellae interplay with host cells.* Nat Rev Microbiol **6**:53-66.
62. **Harris, J. B., A. Baresch-Bernal, S. M. Rollins, A. Alam, R. C. LaRocque, M. Bikowski, A. F. Peppercorn, M. Handfield, J. D. Hillman, F. Qadri, S. B. Calderwood, E. Hohmann, R. F. Breiman, W. A. Brooks, and E. T. Ryan.** 2006. *Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens during human infection with Salmonella enterica serovar Typhi.* Infect Immun **74**:5161-8.
63. **Hersh, D., D. M. Monack, M. R. Smith, N. Ghori, S. Falkow, and A. Zychlinsky.** 1999. *The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1.* Proc Natl Acad Sci U S A **96**:2396-401.
64. **Hirose, K., T. Ezaki, M. Miyake, T. Li, A. Q. Khan, Y. Kawamura, H. Yokoyama, and T. Takami.** 1997. *Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted Salmonella typhi strains in cultured macrophage expressing different levels of CD14 antigen.* FEMS Microbiol Lett **147**:259-65.
65. **House, D., A. Bishop, C. Parry, G. Dougan, and J. Wain.** 2001. *Typhoid fever: pathogenesis and disease.* Curr Opin Infect Dis **14**:573-8.
66. **Hunt, S., A. J. Moir, S. Tzokov, P. A. Bullough, P. J. Artymiuk, and J. Green.** 2008. *The formation and structure of Escherichia coli K-12 haemolysin E pores.* Microbiology **154**:633-42.
67. **Inzana, T. J., J. Hensley, J. McQuiston, A. J. Lesse, A. A. Campagnari, S. M. Boyle, and M. A. Apicella.** 1997. *Phase variation and conservation of lipooligosaccharide epitopes in Haemophilus somnus.* Infect Immun **65**:4675-81.
68. **Iyoda, S., T. Kamidoi, K. Hirose, K. Kutsukake, and H. Watanabe.** 2001. *A flagellar gene fliZ regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in Salmonella enterica serovar Typhimurium.* Microb Pathog **30**:81-90.
69. **Jacobs, A. A., P. L. Loeffen, A. J. van den Berg, and P. K. Storm.** 1994. *Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of Streptococcus suis.* Infect Immun **62**:1742-8.
70. **Johnson, W. M., and H. Lior.** 1988. *A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by Campylobacter spp.* Microb Pathog **4**:115-26.
71. **Kaniga, K., M. S. Compton, R. Curtiss, 3rd, and P. Sundaram.** 1998. *Molecular and functional characterization of Salmonella enterica serovar typhimurium poxA gene: effect on attenuation of virulence and protection.* Infect Immun **66**:5599-606.

72. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. *A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of Yersinia enterocolitica.* Gene **109**:137-41.
73. **Kaslow, H. R., and D. L. Burns.** 1992. *Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation.* Faseb J **6**:2684-90.
74. **Kawasaki, K., R. K. Ernst, and S. I. Miller.** 2004. *Deacylation and palmitoylation of lipid A by Salmonellae outer membrane enzymes modulate host signaling through Toll-like receptor 4.* J Endotoxin Res **10**:439-44.
75. **Kinross, J. M., A. C. von Roon, E. Holmes, A. Darzi, and J. K. Nicholson.** 2008. *The human gut microbiome: implications for future health care.* Curr Gastroenterol Rep **10**:396-403.
76. **Klugman, K. P., I. T. Gilbertson, H. J. Koornhof, J. B. Robbins, R. Schneerson, D. Schulz, M. Cadoz, and J. Armand.** 1987. *Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever.* Lancet **2**:1165-9.
77. **Knapp, S., J. Hacker, T. Jarchau, and W. Goebel.** 1986. *Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic Escherichia coli O6 strain 536.* J Bacteriol **168**:22-30.
78. **Kohbata, S., H. Yokoyama, and E. Yabuuchi.** 1986. *Cytopathogenic effect of Salmonella typhi GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study.* Microbiol Immunol **30**:1225-37.
79. **Koo, F. C., and J. W. Peterson.** 1983. *Cell-free extracts of Salmonella inhibit protein synthesis and cause cytotoxicity in eukaryotic cells.* Toxicol **21**:309-20.
80. **Koo, F. C., J. W. Peterson, C. W. Houston, and N. C. Molina.** 1984. *Pathogenesis of experimental salmonellosis: inhibition of protein synthesis by cytotoxin.* Infect Immun **43**:93-100.
81. **Koupal, L. R., and R. H. Deibel.** 1975. *Assay, characterization, and localization of an enterotoxin produced by Salmonella.* Infect Immun **11**:14-22.
82. **Lai, X. H., I. Arencibia, A. Johansson, S. N. Wai, J. Oscarsson, S. Kalfas, K. G. Sundqvist, Y. Mizunoe, A. Sjostedt, and B. E. Uhlin.** 2000. *Cytocidal and apoptotic effects of the ClyA protein from Escherichia coli on primary and cultured monocytes and macrophages.* Infect Immun **68**:4363-7.

83. **Lara-Tejero, M., and J. E. Galan.** 2000. *A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein.* *Science* **290**:354-7.
84. **Lara-Tejero, M., and J. E. Galan.** 2002. *Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions.* *Trends Microbiol* **10**:147-52.
85. **Lavigne, J. P., and A. B. Blanc-Potard.** 2008. *Molecular evolution of Salmonella enterica serovar Typhimurium and pathogenic Escherichia coli: from pathogenesis to therapeutics.* *Infect Genet Evol* **8**:217-26.
86. **Le Minor, L., M. Veron, and M. Popoff.** 1982. *[A proposal for Salmonella nomenclature].* *Ann Microbiol (Paris)* **133**:245-54.
87. **Lerat, E., and H. Ochman.** 2005. *Recognizing the pseudogenes in bacterial genomes.* *Nucleic Acids Res* **33**:3125-32.
88. **Liu, Y., P. M. Harrison, V. Kunin, and M. Gerstein.** 2004. *Comprehensive analysis of pseudogenes in prokaryotes: widespread gene decay and failure of putative horizontally transferred genes.* *Genome Biol* **5**:R64.
89. **Lucas, R. L., C. P. Lostroh, C. C. DiRusso, M. P. Spector, B. L. Wanner, and C. A. Lee.** 2000. *Multiple factors independently regulate hilaA and invasion gene expression in Salmonella enterica serovar typhimurium.* *J Bacteriol* **182**:1872-82.
90. **Ly, K. T., and J. E. Casanova.** 2007. *Mechanisms of Salmonella entry into host cells.* *Cell Microbiol* **9**:2103-11.
91. **Lyczak, J. B.** 2003. *Commensal bacteria increase invasion of intestinal epithelium by Salmonella enterica serovar Typhi.* *Infect Immun* **71**:6610-4.
92. **Lyczak, J. B., and G. B. Pier.** 2002. *Salmonella enterica serovar typhi modulates cell surface expression of its receptor, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, on the intestinal epithelium.* *Infect Immun* **70**:6416-23.
93. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2.* *Nature* **413**:852-6.
94. **McGovern, V. J., and L. J. Slavutin.** 1979. *Pathology of salmonella colitis.* *Am J Surg Pathol* **3**:483-90.



95. **McQuiston, J. R., P. I. Fields, R. V. Tauxe, and J. M. Logsdon, Jr.** 2008. *Do Salmonella carry spare tyres?* Trends Microbiol **16**:142-8.
96. **Miller, S. I., R. K. Ernst, and M. W. Bader.** 2005. *LPS, TLR4 and infectious disease diversity.* Nat Rev Microbiol **3**:36-46.
97. **Mirza, S. H., N. J. Beeching, and C. A. Hart.** 1996. *Multi-drug resistant typhoid: a global problem.* J Med Microbiol **44**:317-9.
98. **Miyake, M., L. Zhao, T. Ezaki, K. Hirose, A. Q. Khan, Y. Kawamura, R. Shima, M. Kamijo, T. Masuzawa, and Y. Yanagihara.** 1998. *Vi-deficient and nonfimbriated mutants of Salmonella typhi agglutinate human blood type antigens and are hyperinvasive.* FEMS Microbiol Lett **161**:75-82.
99. **Monack, D. M., A. Mueller, and S. Falkow.** 2004. *Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system.* Nat Rev Microbiol **2**:747-65.
100. **Monsieurs, P., S. De Keersmaecker, W. W. Navarre, M. W. Bader, F. De Smet, M. McClelland, F. C. Fang, B. De Moor, J. Vanderleyden, and K. Marchal.** 2005. *Comparison of the PhoPQ regulon in Escherichia coli and Salmonella typhimurium.* J Mol Evol **60**:462-74.
101. **Mortimer, C. K., S. E. Gharbia, J. M. Logan, T. M. Peters, and C. Arnold.** 2007. *Flagellin gene sequence evolution in Salmonella.* Infect Genet Evol **7**:411-5.
102. **Moshitch, S., L. Doll, B. Z. Rubinfeld, B. A. Stocker, G. K. Schoolnik, Y. Gafni, and G. Frankel.** 1992. *Mono- and bi-phasic Salmonella typhi: genetic homogeneity and distinguishing characteristics.* Mol Microbiol **6**:2589-97.
103. **Murray, P. R., K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller.** 2005. *Medical microbiology*, 5th ed. Elsevier Mosby, Philadelphia.
104. **Navarre, W. W., S. Porwollik, Y. Wang, M. McClelland, H. Rosen, S. J. Libby, and F. C. Fang.** 2006. *Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in Salmonella.* Science **313**:236-8.
105. **O'Brien, A. D., D. L. Rosenstreich, I. Scher, G. H. Campbell, R. P. MacDermott, and S. B. Formal.** 1980. *Genetic control of susceptibility to Salmonella typhimurium in mice: role of the LPS gene.* J Immunol **124**:20-4.
106. **O'Callaghan, D., and A. Charbit.** 1990. *High efficiency transformation of Salmonella typhimurium and Salmonella typhi by electroporation.* Mol Gen Genet **223**:156-8.

107. **Organization, W. H.** 2003. Background document: the diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever, p. 48. *In* D. o. V. a. B. a. D. o. C. D. D. a. Response (ed.). World Health Organization
108. **Oscarsson, J., M. Westermark, S. Lofdahl, B. Olsen, H. Palmgren, Y. Mizunoe, S. N. Wai, and B. E. Uhlin.** 2002. *Characterization of a pore-forming cytotoxin expressed by Salmonella enterica serovars typhi and paratyphi A.* Infect Immun **70**:5759-69.
109. **Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connor, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 2001. *Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18.* Nature **413**:848-52.
110. **Parry, C. M., T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White, and J. J. Farrar.** 2002. *Typhoid fever.* N Engl J Med **347**:1770-82.
111. **Payne, J. W.** 1980. Microorganisms and nitrogen sources : transport and utilization of amino acids, peptides, proteins, and related substrates. Wiley, Chichester, Eng. ;Toronto.
112. **Pflum, M. K.** 2006. *H-NS gives invading DNA the silent treatment.* Nat Chem Biol **2**:400-1.
113. **Pickard, D., J. Li, M. Roberts, D. Maskell, D. Hone, M. Levine, G. Dougan, and S. Chatfield.** 1994. *Characterization of defined ompR mutants of Salmonella typhi: ompR is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression.* Infect Immun **62**:3984-93.
114. **Pier, G. B., M. Grout, T. Zaidi, G. Meluleni, S. S. Mueschenborn, G. Banting, R. Ratcliff, M. J. Evans, and W. H. Colledge.** 1998. *Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells.* Nature **393**:79-82.
115. **Popoff, M. Y., J. Bockemuhl, F. W. Brenner, and L. L. Gheesling.** 2001. *Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme.* Res Microbiol **152**:907-9.
116. **Porwollik, S., E. F. Boyd, C. Choy, P. Cheng, L. Florea, E. Proctor, and M. McClelland.** 2004. *Characterization of Salmonella enterica subspecies I genovars by use of microarrays.* J Bacteriol **186**:5883-98.

117. **Porwollik, S., R. M. Wong, and M. McClelland.** 2002. *Evolutionary genomics of Salmonella: gene acquisitions revealed by microarray analysis.* Proc Natl Acad Sci U S A **99**:8956-61.
118. **Prost, L. R., M. E. Daley, V. Le Sage, M. W. Bader, H. Le Moual, R. E. Klevit, and S. I. Miller.** 2007. *Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH.* Mol Cell **26**:165-74.
119. **Prost, L. R., S. Sanowar, and S. I. Miller.** 2007. *Salmonella sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages.* Immunol Rev **219**:55-65.
120. **Qadri, A.** 1997. *Identification of specific recognition molecules on murine mononuclear phagocytes and B lymphocytes for Vi capsular polysaccharide: modulation of MHC class II expression on stimulation with the polysaccharide.* Immunology **92**:146-52.
121. **Raffatellu, M., D. Chessa, R. P. Wilson, R. Dusold, S. Rubino, and A. J. Baumler.** 2005. *The Vi capsular antigen of Salmonella enterica serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa.* Infect Immun **73**:3367-74.
122. **Raffatellu, M., D. Chessa, R. P. Wilson, C. Tukel, M. Akcelik, and A. J. Baumler.** 2006. *Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis.* Infect Immun **74**:19-27.
123. **Ramu, P., R. Tanskanen, M. Holmberg, K. Lahteenmaki, T. K. Korhonen, and S. Meri.** 2007. *The surface protease PgtE of Salmonella enterica affects complement activity by proteolytically cleaving C3b, C4b and C5.* FEBS Lett **581**:1716-20.
124. **Richter-Dahlfors, A., A. M. Buchan, and B. B. Finlay.** 1997. *Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo.* J Exp Med **186**:569-80.
125. **Rychlik, I., and P. A. Barrow.** 2005. *Salmonella stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection.* FEMS Microbiol Rev **29**:1021-40.
126. **Salyers, A. A., and D. D. Whitt.** 2002. *Bacterial pathogenesis : a molecular approach*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
127. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

128. **Schmidt, H., and M. Hensel.** 2004. *Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis.* Clin Microbiol Rev **17**:14-56.
129. **Schwan, W. R., X. Z. Huang, L. Hu, and D. J. Kopecko.** 2000. *Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of Salmonella serovars within human and murine macrophages.* Infect Immun **68**:1005-13.
130. **Sedlock, D. M., L. R. Koupal, and R. H. Deibel.** 1978. *Production and partial purification of Salmonella enterotoxin.* Infect Immun **20**:375-80.
131. **Sharma, A., and A. Qadri.** 2004. *Vi polysaccharide of Salmonella typhi targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses.* Proc Natl Acad Sci U S A **101**:17492-7.
132. **Shea, J. E., M. Hensel, C. Gleeson, and D. W. Holden.** 1996. *Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium.* Proc Natl Acad Sci U S A **93**:2593-7.
133. **Silverman, M., and M. Simon.** 1980. *Phase variation: genetic analysis of switching mutants.* Cell **19**:845-54.
134. **Smith, J. L., and D. O. Bayles.** 2006. *The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis.* Crit Rev Microbiol **32**:227-48.
135. **Spano, S., and J. E. Galan.** 2008. *A novel pathway for exotoxin delivery by an intracellular pathogen.* Curr Opin Microbiol **11**:15-20.
136. **Spano, S., J. E. Ugalde, and J. E. Galan.** 2008. *Delivery of a Salmonella Typhi exotoxin from a host intracellular compartment.* Cell Host Microbe **3**:30-8.
137. **Townsend, S. M., N. E. Kramer, R. Edwards, S. Baker, N. Hamlin, M. Simmonds, K. Stevens, S. Maloy, J. Parkhill, G. Dougan, and A. J. Baumler.** 2001. *Salmonella enterica serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences.* Infect Immun **69**:2894-901.
138. **Tracz, D. M., H. Tabor, M. Jerome, L. K. Ng, and M. W. Gilmour.** 2006. *Genetic determinants and polymorphisms specific for human-adapted serovars of Salmonella enterica that cause enteric fever.* J Clin Microbiol **44**:2007-18.
139. **Tsui, I. S., C. M. Yip, J. Hackett, and C. Morris.** 2003. *The type IVB pili of Salmonella enterica serovar Typhi bind to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.* Infect Immun **71**:6049-50.

140. **Uchiya, K., M. A. Barbieri, K. Funato, A. H. Shah, P. D. Stahl, and E. A. Groisman.** 1999. *A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking.* *Embo J* **18**:3924-33.
141. **Uzzau, S., G. S. Leori, V. Petruzzi, P. R. Watson, G. Schianchi, D. Bacciu, V. Mazzeo, T. S. Wallis, and S. Rubino.** 2001. *Salmonella enterica serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep.* *Infect Immun* **69**:3092-9.
142. **Vernikos, G. S., and J. Parkhill.** 2006. *Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the Salmonella pathogenicity islands.* *Bioinformatics* **22**:2196-203.
143. **Virlogeux, I., H. Waxin, C. Ecobichon, and M. Y. Popoff.** 1995. *Role of the viaB locus in synthesis, transport and expression of Salmonella typhi Vi antigen.* *Microbiology* **141 ( Pt 12)**:3039-47.
144. **Vollaard, A. M., S. Ali, H. A. van Asten, S. Widjaja, L. G. Visser, C. Surjadi, and J. T. van Dissel.** 2004. *Risk factors for typhoid and paratyphoid fever in Jakarta, Indonesia.* *Jama* **291**:2607-15.
145. **von Rhein, C., K. P. Hunfeld, and A. Ludwig.** 2006. *Serologic evidence for effective production of cytolysin A in Salmonella enterica serovars typhi and paratyphi A during human infection.* *Infect Immun* **74**:6505-8.
146. **Wai, S. N., B. Lindmark, T. Soderblom, A. Takade, M. Westermark, J. Oscarsson, J. Jass, A. Richter-Dahlfors, Y. Mizunoe, and B. E. Uhlin.** 2003. *Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin.* *Cell* **115**:25-35.
147. **Wain, J., D. House, J. Parkhill, C. Parry, and G. Dougan.** 2002. *Unlocking the genome of the human typhoid bacillus.* *Lancet Infect Dis* **2**:163-70.
148. **Wallace, A. J., T. J. Stillman, A. Atkins, S. J. Jamieson, P. A. Bullough, J. Green, and P. J. Artymiuk.** 2000. *E. coli hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy.* *Cell* **100**:265-76.
149. **Wang, R. F., and S. R. Kushner.** 1991. *Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in Escherichia coli.* *Gene* **100**:195-9.
150. **Waterman, S. H., G. Juarez, S. J. Carr, and L. Kilman.** 1990. *Salmonella arizona infections in Latinos associated with rattlesnake folk medicine.* *Am J Public Health* **80**:286-9.

151. **WHO.** 2003. Background document: the diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever, p. 48. *In* D. o. V. a. B. a. D. o. C. D. D. a. Response (ed.). World Health Organization
152. **Wilson, R. P., M. Raffatellu, D. Chessa, S. E. Winter, C. Tukel, and A. J. Baumler.** 2008. *The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of Salmonella.* Cell Microbiol **10**:876-90.
153. **Winter, S. E., M. Raffatellu, R. P. Wilson, H. Russmann, and A. J. Baumler.** 2008. *The Salmonella enterica serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion.* Cell Microbiol **10**:247-61.
154. **Woodward, T. E., J. E. Smadel, H. L. Ley, Jr., R. Green, and D. S. Mankikar.** 2004. *Preliminary report on the beneficial effect of chloromycetin in the treatment of typhoid fever. 1948.* Wilderness Environ Med **15**:218-20.
155. **Wu, H. Y., X. L. Zhang, Q. Pan, and J. Wu.** 2005. *Functional selection of a type IV pili-binding peptide that specifically inhibits Salmonella Typhi adhesion to/invasion of human monocytic cells.* Peptides **26**:2057-63.
156. **Young, D., T. Hussell, and G. Dougan.** 2002. *Chronic bacterial infections: living with unwanted guests.* Nat Immunol **3**:1026-32.
157. **Zasloff, M.** 2002. *Antimicrobial peptides of multicellular organisms.* Nature **415**:389-95.
158. **Zdych, E., R. Peist, J. Reidl, and W. Boos.** 1995. *Maly of Escherichia coli is an enzyme with the activity of a beta C-S lyase (cystathionase).* J Bacteriol **177**:5035-9.
159. **Zhang, S., R. L. Santos, R. M. Tsolis, S. Stender, W. D. Hardt, A. J. Baumler, and L. G. Adams.** 2002. *The Salmonella enterica serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves.* Infect Immun **70**:3843-55.
160. **Zhang, X. L., V. T. Jeza, and Q. Pan.** 2008. *Salmonella typhi: from a human pathogen to a vaccine vector.* Cell Mol Immunol **5**:91-7.
161. **Zhou, D., and J. Galan.** 2001. *Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins.* Microbes Infect **3**:1293-8.
162. **Zieg, J., M. Hilmen, and M. Simon.** 1978. *Regulation of gene expression by site-specific inversion.* Cell **15**:237-44.