



Université de Montréal

**Caractérisation des souches de *Salmonella* Typhimurium  
responsables de septicémies chez le porc**

par

Christine Lepage

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 microbiologie et immunologie

Décembre 2009

© Christine Lepage, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation des souches de *Salmonella* Typhimurium responsables de septicémies chez  
le porc

présenté par :  
Christine Lepage

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr George Szatmari, président-rapporteur  
Dre France Daigle, directeur de recherche  
Dr Patrick Hallenbeck, membre du jury

## Résumé

Depuis quelques années, il y a émergence de souches de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium multirésistantes causant une septicémie et la mort chez le porc. Ceci constitue un problème majeur pour l'industrie porcine et possiblement pour la santé publique. L'objectif de ce projet était de comparer et de caractériser une souche capable de causer une septicémie chez le porc et une souche commensale, en observant l'interaction avec des cellules épithéliales, des macrophages humains et d'identifier des gènes exprimés par les souches septicémiques et les souches commensales. Tout d'abord, l'infection de cellules épithéliales permet d'observer l'adhérence et l'invasion des bactéries, pour ainsi mettre en évidence la capacité des souches à coloniser le tractus gastro-intestinal. La souche commensale possède un pouvoir d'adhésion supérieur à la souche septicémique. Par la suite, l'infection de macrophages permet de caractériser le niveau de phagocytose et de survie. L'importance de la survie dans les macrophages pourrait permettre de faire un lien avec la septicémie. Toutefois, aucune différence n'est observable dans les conditions qui ont été testées. Ensuite, la technique SCOTS (*Selective Capture of Transcribed Sequences*) est utilisée pour capturer des gènes uniques à la souche septicémique et un autre SCOTS est fait pour capturer les gènes spécifiques à la souche commensale. Finalement, les gènes sont clonés, leur spécificité face aux souches est analysée par dot blot et ils sont identifiés par séquençage suivies d'une analyse bioinformatique. Les gènes identifiés par SCOTS, lors des captures pour la souche septicémique et la souche commensale, se trouvent à être des gènes communs aux *Salmonella*. Toutefois, la différence de pathologie causée par les deux souches, n'est peut-être pas l'acquisition de nouveaux gènes, mais plutôt une différence d'expression entre les deux souches.

**Mots-clés :** Cellules épithéliales, macrophages humains, porc, SCOTS, Typhimurium

## Abstract

For many years, there has been an emergence of new multi-drug resistant *Salmonella enterica serovar* Typhimurium strains responsible for high mortality rates in regards to swine infections. This represents a major problem for the swine industry and also for public health. The objective of this project was to characterize an isolate capable of creating swine septicemic illness and another which is naturally present in this host's intestinal tract. The study conducted here includes observations of bacteria-epithelial cell interactions, bacteria-macrophage interactions and identification of genes expressed during different epithelial cell infections. Bacterial adherence and invasion of cells were observed after epithelial cell infection. This type of assay underlines the ability of the isolates to colonize the intestinal tract. The commensal strain has a better adherence than the other. Macrophage infections allowed characterization of bacterial phagocytosis and intracellular survival. Survival within macrophages reflects the capacity of the bacterial isolates to infect and survive in the host. There's no difference between the two strains with the condition we test. A technique termed SCOTS (Selective Capture of Transcribed Sequences) was used to capture unique transcripts from the isolate which caused illness during swine infection. SCOTS was also used to find unique genes expressed by the commensal isolate. The captured fragments were cloned, their strain specificity was analyzed by dot blot and the genes transcribed were identified by direct sequencing followed by bioinformatic analysis. SCOTS carried out with the septicemic and the commensal isolates was done. During the SCOTS conducted with the strain isolated from a sick swine or with the isolate from healthy swine, common *Salmonella* genes were found. Thus, even though these two isolates cause different pathologies, virulence of the strains does not rely on the acquisition of new genes, but perhaps on differential gene expression among both.

**Keywords** : Epithelial cells, humans macrophages, SCOTS, swine, Typhimurium

# Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. GÉNÉRALITÉS SUR LES SALMONELLES.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Évolution</i> .....	1
1.2. <i>Physiologie</i> .....	3
1.3. <i>Identification</i> .....	4
<b>2. SALMONELLOSES.....</b>	<b>5</b>
2.1. <i>Maladie localisée</i> .....	6
2.2. <i>Maladie systémique</i> .....	12
<b>3. PATHOGÉNICITÉ DE TYPHIMURIUM.....</b>	<b>17</b>
3.1. <i>Ingestion</i> .....	17
3.2. <i>Attachement</i> .....	18
3.3. <i>Invasion</i> .....	19
3.4. <i>Survie et persistance</i> .....	21
<b>4. PROBLÉMATIQUE CHEZ LE PORC AU QUÉBEC.....</b>	<b>29</b>
4.1. <i>Différences entre Choleraesuis et Typhimurium</i> .....	29
4.2. <i>Plasmides</i> .....	30
4.3. <i>Résistance aux antibiotiques</i> .....	34
4.4. <i>Différents lysotypes</i> .....	36
<b>5. MÉTHODE D'IDENTIFICATION DE GÈNES.....</b>	<b>39</b>
5.1. <i>Sélection négative</i> .....	40
5.2. <i>Sélection positive</i> .....	42
5.3. <i>SCOTS</i> .....	44
<b>PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....</b>	<b>47</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>48</b>
<b>1. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DE DEUX SOUCHES DE TYPHIMURIUM.....</b>	<b>48</b>
<i>Test de sensibilité aux antibiotiques</i> .....	51
<i>Extraction de plasmides</i> .....	51
<i>Test d'adhésion et d'invasion</i> .....	52
<i>Test de l'activité cytotoxique</i> .....	54
<i>Coloration au Giemsa</i> .....	55

<i>Test de survie dans les macrophages humains</i> .....	56
<b>2. CARACTÉRISATION GÉNOTYPIQUE RESPONSABLE DE LA DIFFÉRENCE PHÉNOTYPIQUE</b> .....	57
<i>Extraction génomique</i> .....	58
<i>Photobiotinylation</i> .....	59
<i>Extraction d'ARN</i> .....	60
<i>Formation de l'ADNc</i> .....	61
<i>Normalisation</i> .....	62
<i>Capture</i> .....	62
<i>PCR</i> .....	63
<i>Southern et Dot Blot</i> .....	64
<i>Clonage</i> .....	64
<i>Transformation chimique</i> .....	65
<i>Séquençage et analyse des données bio-informatiques</i> .....	65
<b>3. MUTAGENÈSE ET CARACTÉRISATION DU GÈNE ZUR</b> .....	66
<i>Construction d'un allèle mutant</i> .....	67
<i>Transformation chimique</i> .....	67
<i>Conjugaison</i> .....	68
<i>Cellules électrocompétentes et électrotransformation</i> .....	69
<i>Courbe de croissance</i> .....	69
<i>Test de sensibilité au peroxyde d'hydrogène</i> .....	70
<i>Test d'adhésion et d'invasion et test de survie dans les macrophages humains</i> .....	71
<b>RÉSULTATS</b> .....	72
<b>1. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DE SOUCHES DE TYPHIMURIUM</b> .....	72
1.1. <i>Résistance aux antibiotiques des 2 souches de Typhimurium</i> .....	72
1.2. <i>Profil plasmidique</i> .....	73
1.3. <i>Test d'adhésion et d'invasion avec les cellules épithéliales HeLa</i> .....	74
1.4. <i>Cytotoxicité des deux souches de Typhimurium</i> .....	75
1.5. <i>Observation microscopique de l'adhésion des bactéries</i> .....	76
1.6. <i>Test de survie avec les macrophages humains THP-1</i> .....	78
<b>2. CARACTÉRISATION GÉNOTYPIQUE DE LA SOUCHE PROVENANT DE PORC MALADE LORS DE L'INVASION</b> .....	80
2.1. <i>SCOTS</i> .....	80
2.2. <i>Diversité bactérienne de l'ADNc</i> .....	82

2.3.	<i>Spécificité des transcrits</i> .....	83
2.4.	<i>Identification des gènes exprimés lors de l'invasion</i> .....	86
<b>3.</b>	<b>MUTAGENÈSE ET CARACTÉRISATION DU GÈNE ZUR</b> .....	<b>89</b>
<b>4.</b>	<b>CARACTÉRISATION GÉNOTYPIQUE POUR LA SOUCHE PROVENANT DE PORC SAIN LORS DE</b>	
	<b>L'ADHÉSION</b> .....	<b>93</b>
4.1.	<i>SCOTS</i> .....	93
4.2.	<i>Diversité bactérienne de l'ADNc</i> .....	94
4.3.	<i>Spécificité des transcrits</i> .....	96
4.4.	<i>Identification des gènes exprimés lors de l'invasion</i> .....	98
	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>101</b>
	<b>ANNEXE</b> .....	<b>I</b>
	<i>Plasmide #4 de la souche provenant de porc malade 4395</i> .....	<i>II</i>

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU I</b> : REPRÉSENTATION DE DIFFÉRENTES ESPÈCES ET SOUS-ESPÈCES DE <i>SALMONELLA</i> .....	3
<b>TABLEAU IV</b> : SOUCHES BACTERIENNES ET PLASMIDES UTILISES.....	50
<b>TABLEAU V</b> : PROFIL DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES 2 SOUCHES DE TYPHIMURIUM 4395 ET 1003.....	72
<b>TABLEAU VI</b> : RÉSUMÉ DES GÈNES DE 4395 EXPRIMÉS DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES AU TEMPS 180 MINUTES PAR LA TECHNIQUE SCOTS.....	87
<b>TABLEAU VIII</b> : RÉSUMÉ DES GÈNES EXPRIMÉS PAR LA SOUCHE 1003 DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES HELA AU TEMPS 90 MINUTES PAR LA TECHNIQUE SCOTS.....	98
<b>TABLEAU IX</b> : RÉSUMÉ DES GÈNES EXPRIMÉS LORS DU PREMIER SCOTS POUR LA SOUCHE 4395 DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES HELA 180 MINUTES POST-INFECTION.....	I

## Liste des figures

<b>FIGURE 1 : ARBRE ÉVOLUTIF .....</b>	<b>2</b>
<b>FIGURE 2 : DIVERSITÉ DES SÉROVARS AU CANADA.....</b>	<b>6</b>
<b>FIGURE 3 : DISTRIBUTION DE TYPHIMURIUM AU CANADA .....</b>	<b>7</b>
<b>FIGURE 4 : DISTRIBUTION D'ENTERITIDIS AU CANADA .....</b>	<b>10</b>
<b>FIGURE 5: ILLUSTRATION D'UNE INFECTION PAR <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS CHEZ LE POULET.....</b>	<b>11</b>
<b>FIGURE 6 : DISTRIBUTION MONDIALE DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE ADAPTÉ DE (20) .....</b>	<b>13</b>
<b>FIGURE 7 : SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE 3 DU SPI 1 .....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURE 8 : SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE 3 DU SPI 2 .....</b>	<b>23</b>
<b>FIGURE 9 : INFECTION D'UN MODEL MURIN DE GASTROENTÉRITE PAR <i>SALMONELLA</i> ...</b>	<b>25</b>
<b>FIGURE 10 : LYSOTYPE DE TYPHIMURIUM ADAPTÉ DE (25) .....</b>	<b>36</b>
<b>FIGURE 11 : TECHNIQUES DE SÉLECTION NÉGATIVE.....</b>	<b>41</b>
<b>FIGURE 12: TECHNIQUES DE SÉLECTION POSITIVE.....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURE 13 : SCOTS.....</b>	<b>46</b>
<b>FIGURE 14: REPRÉSENTATIONS DU GÈNE ET DES AMORCES.....</b>	<b>67</b>
<b>FIGURE 15 : PLASMIDES DES SOUCHES DE TYPHIMURIUM. ....</b>	<b>73</b>
<b>FIGURE 16 : INTERACTION AVEC LES CELLULES ÉPITHÉLIALES .....</b>	<b>75</b>
<b>FIGURE 17 : CYTOTOXICITÉ DES SOUCHES DE TYPHIMURIUM .....</b>	<b>76</b>
<b>FIGURE 18 : INTERACTION DE LA SOUCHE 4395 AVEC LES CELLULES ÉPITHÉLIALES .....</b>	<b>77</b>
<b>FIGURE 19 : INTERACTION DE LA SOUCHE 1003 AVEC LES CELLULES ÉPITHÉLIALES .....</b>	<b>77</b>
<b>FIGURE 20 : INFECTION DE MACROPHAGES .....</b>	<b>79</b>
<b>FIGURE 22 : DIVERSITÉ DES CAPTURES DE LA SOUCHE 4395 APRÈS SCOTS .....</b>	<b>83</b>
<b>FIGURE 23 : SPÉCIFICITÉ DES TRANSCRITS POUR 4395 .....</b>	<b>85</b>
<b>FIGURE 24 : COURBES DE CROISSANCE .....</b>	<b>89</b>
<b>FIGURE 25 : INTERACTION AVEC LES CELLULES ÉPITHÉLIALES HELA .....</b>	<b>91</b>
<b>FIGURE 26 : INFECTION DE MACROPHAGES THP-1.....</b>	<b>92</b>
<b>FIGURE 27 : BANDES DE DIVERSITÉ BACTÉRIENNE .....</b>	<b>94</b>
<b>FIGURE 28 : DIVERSITÉ DES CAPTURES DE LA SOUCHE 1003 APRÈS SCOTS .....</b>	<b>95</b>
<b>FIGURE 29 : SPÉCIFICITÉ DES TRANSCRITS POUR 1003 .....</b>	<b>97</b>

## Abréviations et sigles

AB	Alberta
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AMP	Ampicilline
APR	Apramycine
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ASP	<i>Acid shock proteins</i>
ATR	<i>Acid tolerance reponse</i> (Réponse à la tolérance de l'acide)
B	Bacitracine
BC	Colombie-Britannique
BW 1X/2X	<i>Binding and washing solution</i>
C	Chloramphénicol
CN	Gentamycine
°C	Degré Celsius
DA	Clindamycine
DAP	<i>DL-<math>\alpha,\epsilon</math>-diaminopimelic acid</i>

DEPC	Diéthyle pyrocarbonate
DMEM	<i>Dubelcco's modified eagle's medium</i>
D.O.	Densité optique
E	Érythromycine
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
IVET	<i>In vivo expressed technology</i>
IVIAT	<i>In vivo induced antigen technology</i>
K	Kanamycine
Kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharides
MB	Manitoba
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
N	Néomycine
NB	Nouveau-Brunswick
NL	Terre-Neuve et Labrador
NS	Nouvelle-Écosse
NT	Territoires du Nord-Ouest
NU	Nunavut
ON	Ontario

ORF	Cadre de lecture ouvert ( <i>open reading frame</i> )
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-DOC	<i>Phosphate buffered saline – deoxycholic acid</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Île-du-Prince-Édouard
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PMN	Polymorphonucléaire
QC	Québec
Q/D	Quinupristine/dalfopristin
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Streptomycine
SCOTS	<i>Seclective Capture Of Transcribed Sequences</i>
SK	Saskatchewan
SPI	<i>Salmonella pathogenicity island</i>
SSH	<i>Suppressive Subtractive Hybridization</i>
SST3	Système de sécrétion de type 3
SST3 SPI 1	Système de sécrétion de type 3 SPI 1 dépendant
SST3 SPI 2	Système de sécrétion de type trois SPI 2 dépendant
STM	<i>Signature-tagged mutagenesis</i>
SUL	Sulfisoxazole
SXT	Triméthoprime-sulfamethoxazole

TE	Tétracycline
UFC	Unité formatrice de colonies
VA	Vancomycine
YT	Yukon

*Il faut accepter les déceptions passagères,  
mais conserver l'espoir pour l'éternité!*  
*Martin Luther King*

## Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier France de m'avoir acceptée dans son merveilleux laboratoire où j'ai appris énormément. Quoique le projet fût magnifique, il est triste que je ne sois pas arrivée à élucider le mystère de ces deux souches de Typhimurium. Alors, merci de m'avoir permis de travailler et soutenue tout au long de cette fabuleuse expérience.

Aussi, j'aimerais remercier les gens du lab, sans qui ces années auraient pu paraître longues et pénibles. Max tu es le meilleur et je te souhaite la meilleure des chances pour ton Doc. Kath, tu es fantastique et je suis sûre que tu auras une splendide carrière de professeur. Sebounet, je t'adore même si tu es l'Homme le plus lent du monde. Avec ces derniers mois en ta compagnie, je me suis rendu compte à quel point tu vas me manquer. James le magnifique t'avoir comme voisin de bureau fût un plaisir, surtout pour nos grandes conversions sur Heroes, Fringe, Lost... Je te souhaite la meilleure des chances pour ton Doc!! Lolo, je suis contente de t'avoir connu et qu'on soit resté ami après ton départ. Merci de m'avoir aidée à élaborer des solutions pour SCOTS. Chantal, pour le labo tu es la référence pour TOUT, mais en dehors, tu es une amie géniale. Marthe, merci de m'avoir soutenue dans les temps difficiles. Cette expérience aurait été ardue si tu n'avais pas été là. Tu es ma sœur siamoise de hanche pour toujours!! Chanty et Marty, je vous AIME!!

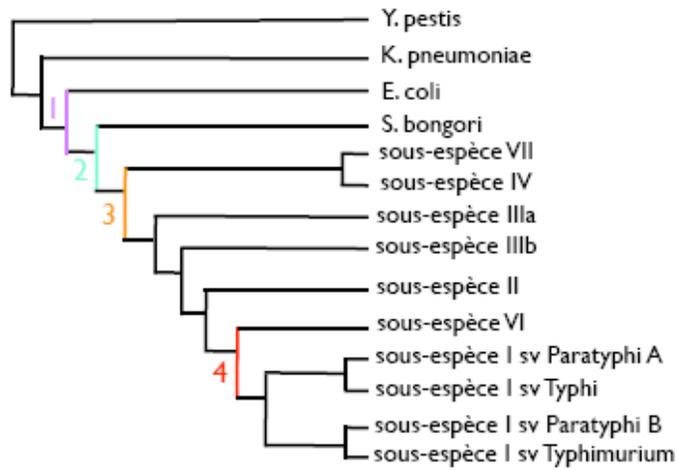
Ma famille, je vous ADORE!!! Vous êtes les meilleurs. Je n'aurais pas pu me rendre aussi loin sans vous. Vous avez toujours été là pour moi et je l'apprécie énormément. MERCI!!

# Introduction

## 1. Généralités sur les salmonelles

### 1.1.Évolution

La divergence de *Salmonella* et d'*E. coli* s'est produite il y a environ 120-160 millions d'années (1 sur la figure 1). Par la suite, il y a 25 à 40 millions d'années, les ancêtres de *Salmonella* ont acquis l'îlot de pathogénicité *Salmonella* 1 (SPI 1). L'acquisition du SPI 1 a permis de séparer *Salmonella* en deux espèces. Tout d'abord, *Salmonella bongori* est une bactérie commensale des invertébrés au sang-froid (39) qui possède 22 sérovars (62) (2 sur la figure 1). De son côté, *Salmonella enterica* a continué à évoluer en sous-espèces. Chez *Salmonella enterica*, l'acquisition du SPI 2 a permis à la bactérie de survivre dans les macrophages et de coloniser les tissus plus profonds (3 sur la figure 1). Par la suite, certaines sous-espèces (I à IV) de *S. enterica* ont acquis la possibilité de changer les sous-unités de la structure des flagelles. Cette acquisition permet de mieux esquiver le système immunitaire. Finalement, l'ancêtre de la sous-espèce I a évolué pour infecter des hôtes spécifiques (4 sur la figure 1). Un exemple de sous-espèce I est le séovar Typhi qui cause la fièvre typhoïde chez l'Homme (27).



**Figure 1 : Arbre évolutif**

Évolution des salmonelles et de leurs plus proches descendants adapté de (27).

1 : Différenciation entre *E. coli* et *Salmonella*

2 : Acquisition de SPI 1

3 : Acquisition de SPI 2

4 : Différenciation selon la spécificité d'hôte

L'espèce *S. enterica* est divisée en 6 sous-espèces qui regroupent plus de 2520 sérovars (62). La sous-espèce la plus fréquente est *S. enterica enterica* (sous-espèce I). Celle-ci regroupe la majorité des souches qui causent des maladies chez l'Homme (tableau I) (62, 77).

**Tableau I** : Représentation de différentes espèces et sous-espèces de *Salmonella* adapté de (77).

Genres	Position taxonomique			Nombre de sérotypes dans chaque espèce ou sous-espèces
	Espèces	Sous-espèces	Sérotypes (serovars)	
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica (sous-espèces I)	Choleraesuis, Enteritidis, Paratyphi, Typhi, Typhimurium	1504
		salamae (sous-espèces II)	9,46 :z :z39	502
		arizonae (sous-espèces IIIa)	43 :z29 :-	95
		diarizonae (sous-espèces IIIb)	6,7 :1,v :1,5,7 21 :mt :-	333 72
		houtenae (sous-espèces IV)	59 :z36 :-	13
		indica (sous-espèces VI)		
	<i>bongori</i>	Sous-espèces V	13,22 :z39 :-	22

## 1.2. Physiologie

Les salmonelles font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Les membres de cette famille sont appelés entérobactéries ou bactéries entériques, puisqu'elles habitent l'intestin. Plus particulièrement, cette famille contient des bactéries Gram-négative de forme bâtonnet droit à flagelles péritriches ou non mobiles, ayant une respiration anaérobie facultative et des besoins nutritifs simples (40, 64). Différents métaux ont une importance dans différents besoins tels que le zinc pour la formation de cofacteurs, le fer pour supporter la croissance

et la survie bactérienne et le manganèse dans certains mécanismes de virulence (68) (40) (18).

Le genre *Salmonella* contient des bactéries mobiles avec des flagelles péritriches. Plus précisément, *Salmonella* fermente le glucose, mais pas le sucrose et le lactose. C'est une bactérie qui peut pousser entre 7 et 48 °C. Toutefois, sa température optimale est à 37 °C, ce qui fait d'elle une bactérie mésophile. De plus, son pH optimal se situe entre 6 et 7, mais elle peut croître en présence d'un pH variant entre 4 et 9 (27).

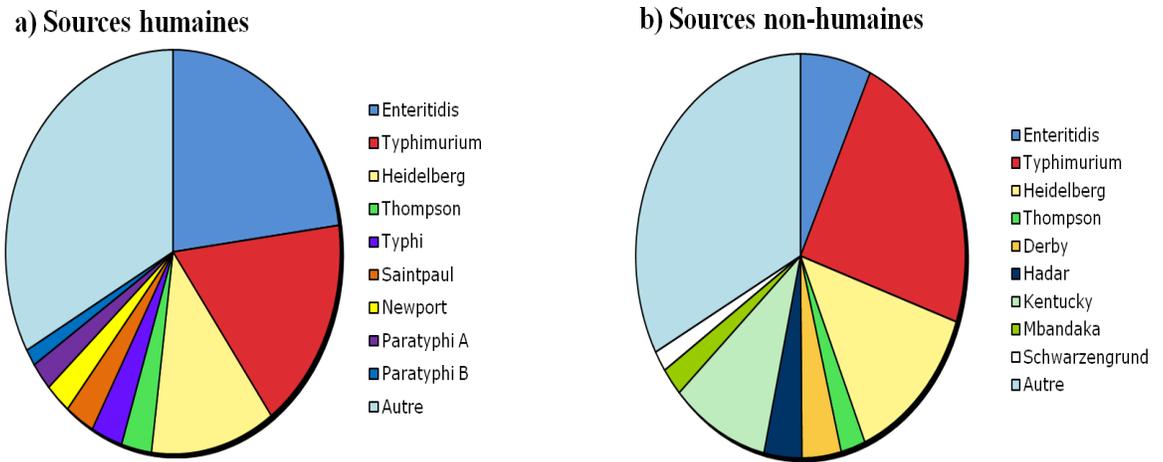
### **1.3. Identification**

Les salmonelles peuvent être identifiées par les antigènes H (flagelle), O (somatique) et Vi (capsule). L'antigène H correspond aux flagelles péritriches des bactéries. Cette structure se trouve à la surface et est fortement immunogénique (27). L'antigène O se situe à l'extrémité du lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est intégré à la membrane externe des bactéries Gram-négative et sert à protéger la bactérie de son environnement. Cette structure est composée de 3 parties, le lipide A, une portion oligosaccharidique (le coeur) et la sous-unité de polymère de l'antigène O. Le LPS joue un rôle important dans l'interaction entre la bactérie et l'hôte. Le lipide A est la partie du LPS qui cause des effets endotoxiques, tandis que l'antigène O est la partie immunodominante de la molécule. L'antigène O est très variable chez les salmonelles. Il peut varier dans sa composition en monosaccharide, dans ses liens entre les monosaccharides et au niveau de plusieurs autres modifications mineures

(27). Le remodelage de la membrane externe, incluant des modifications aux LPS, permet de résister au système immunitaire de l'hôte telle que la lyse médiée par le complément. Ces modifications sont faites selon différents systèmes, tel que le système à deux composantes PmrAB qui permet d'activer des gènes pour modifier le lipide A et le cœur du LPS (28) (37). L'antigène Vi correspond à la capsule de polysaccharide qui est produit par les sérovars Typhi et Paratyphi C. La capsule, faite d'homopolymères linéaires, requière des protéines sous le contrôle du locus *viaB* pour être synthétisée et transportée (27).

## **2. Salmonelloses**

La plupart des salmonelles se retrouvent dans le tractus intestinal des animaux. *S. enterica* peut se diviser en trois catégories. Dans la première catégorie, la bactérie possède un hôte spécifique, c'est-à-dire qu'elle est restreinte à un seul hôte. Dans la deuxième catégorie, la bactérie s'est adaptée à un hôte, mais elle est capable d'infecter d'autres organismes. Dans la dernière catégorie, la bactérie peut infecter de façon générale plusieurs hôtes, mais la maladie causée peut être variable (27, 61). La figure 2 représente les 15 sérovars les plus rencontrés au Canada dans l'année 2006 (25). Selon le sérovar, il peut y avoir 2 types de maladie qui peut être causée, localisée (gastroentérite) ou systémique (fièvre systémique). Dans la section Salmonellose, les deux types de maladies vont être représentés par deux sérovars chacune.



**Figure 2 : Diversité des sérovars au Canada**

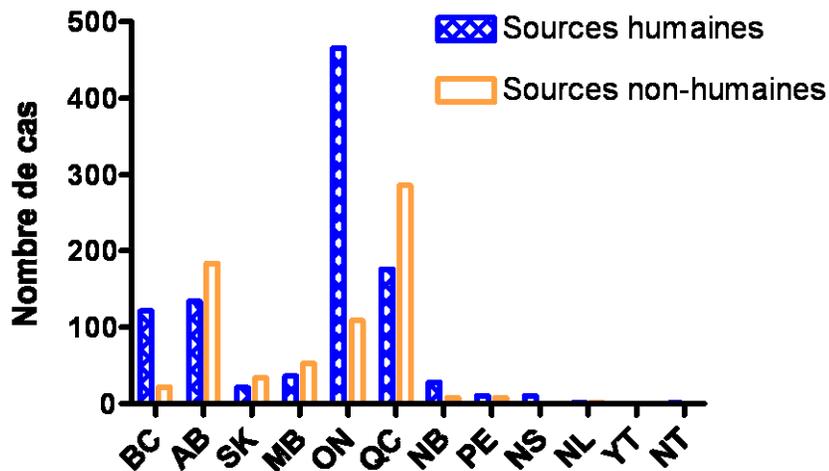
Représentation des 15 sérovars les plus rencontrés au Canada durant l'année 2006, selon leurs source adapté de (25).

## 2.1. Maladie localisée

### 2.1.1. Sérovar Typhimurium

Le sérovar le plus rencontré dans les cas de salmonellose au Canada est Typhimurium pour l'année 2006 en combinant les sources humaines et non-humaines (figure 2). De plus, les provinces les plus touchées sont l'Alberta, le Québec et l'Ontario (figure 3) (25). Le grand nombre cas en Ontario et au Québec est dû par une grande population qui équivaut respectivement au quadruple et au double de la population retrouvée en Alberta. Toutefois, la population en Alberta est moins grande qu'en Colombie-Britannique et pourtant le nombre

de cas est supérieur. Alors, de façon générale, plus il y a une grande population plus le nombre de cas est grand.



**Figure 3 :**  
**Distribution de**  
**Typhimurium au**  
**Canada**  
 Cas d'infection de  
 Typhimurium  
 provenant de sources  
 humaines et non-  
 humaines, en 2006 au  
 Canada adapté de (25)

#### 2.1.1.1. Transmission et dispersion

Typhimurium est propagé par la nourriture, mais aussi par zoonose. Une infection par des animaux porteurs asymptomatiques tels que le veau, le porc et la volaille est très fréquente. (29). Il existe 3 types de transmission. Premièrement, il y a le contact direct avec l'animal qui possède la bactérie. Deuxièmement, il y a le contact indirect, ce qui veut dire par l'environnement ou la nourriture contaminée. Dernièrement, il y a le contact avec un vecteur, qui propage l'agent pathogène de l'animal à l'Homme (76).

### *2.1.1.2.Symptômes*

Les symptômes chez l'Homme sont la diarrhée, la fièvre, les douleurs abdominales, les vomissements et parfois du sang dans les selles (63) qui peuvent durer 3 à 5 jours. Parfois, il est possible que la bactérie perdure 2 à 3 semaines. Généralement, les symptômes vont apparaître 6 à 48 heures après l'ingestion (41). Chez le porc, Typhimurium est une bactérie commensale. Toutefois, certaines souches causent une maladie qui provoque la diarrhée, la fièvre, l'anorexie, un peu ou pratiquement pas d'infection systémique et une faible mortalité (19, 61).

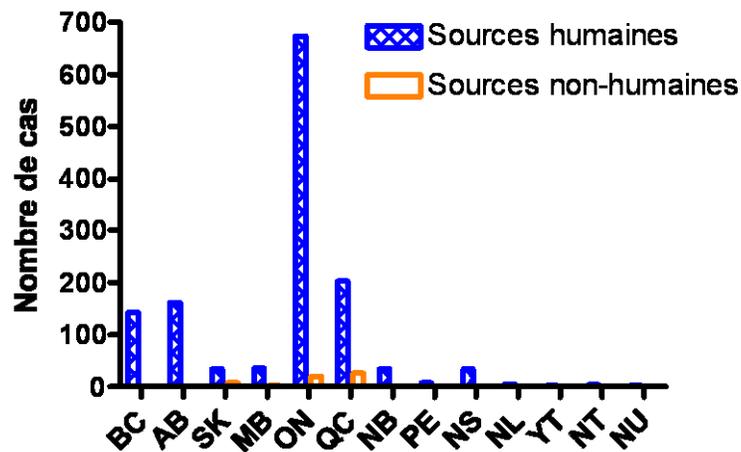
### *2.1.1.3.Traitements, diagnostic et prévention*

Les patients infectés par Typhimurium suivent une thérapie avec fluide, électrolytes et des agents contre la motilité intestinale. Il est aussi recommandé de ne pas prendre de lait ou de produits laitiers, puisque durant l'infection il est possible d'être intolérant au lactose. De plus, lors d'une gastroentérite faible à modérée, il n'est pas recommandé de prendre des antibiotiques. Cependant, lorsque la personne est à risque de développer une infection extra-intestinale ou une maladie plus sévère, l'utilisation de fluoroquinolone, triméthoprime-sulfaméthoxazole, ampicilline ou céphalosporine de troisième génération est recommandée. Le diagnostic en laboratoire est fait avec la culture bactérienne, échantillon de biopsie d'endoscopie et l'utilisation d'outils de lavage rectal (47). Les approches pour prévenir et contrôler les infections de l'Homme provenant des animaux regroupent la biosécurité, la vaccination des animaux et plusieurs autres moyens. Cependant, ces moyens

sont utilisés pour contrôler au niveau de l'industrie alimentaire qui est l'une des principale source d'infection (86).

### **2.1.2. Sérovar Enteritidis**

*Salmonella* Enteritidis est une bactérie qui possède un large spectre d'hôte (17). Enteritidis a une importance majeure en Ontario avec un total de 684 infections pour l'année 2006, tandis qu'elle est un peu moins répandue dans les autres provinces (figure 4). Son profil d'infection ressemble beaucoup à celui de Typhimurium (figure 3), mais possède un impact plus faible avec les sources non-humaines (25). La majorité des infections bactériennes telles qu'*E. coli* O157, *Shigella* et *Campylobacter* gardent un même profil. La province la plus touchée est l'Ontario dans les trois cas. Les trois provinces les plus touchées par la suite sont l'Alberta, la Colombie-Britannique et le Québec (25).



**Figure 4 : Distribution d'Enteritidis au Canada**

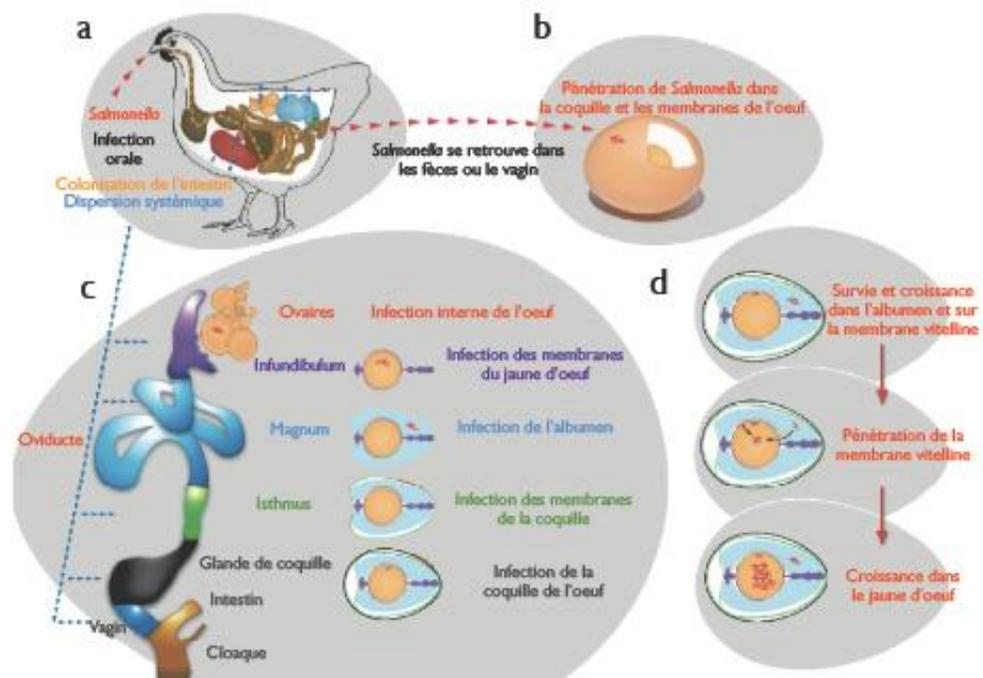
Cas d'infection d'Enteritidis provenant de sources humaines et non-humaines, en 2006 au Canada adapté de (25).

#### 2.1.2.1. Transmission et dispersion

Comme Typhimurium, Enteritidis est une bactérie qui peut se transmettre à l'Homme à partir du contact direct avec les animaux ou la consommation de nourriture contaminée. L'aliment contaminé le plus rencontré est l'œuf (34). Deux voies peuvent être utilisées par Enteritidis pour infecter les œufs (figure 5). De façon générale, après que la bactérie soit en contact avec la poule, la bactérie va se propager de façon systémique. Par la suite, elle peut contaminer directement l'œuf en pénétrant dans la coquille et les membranes. Sinon, la bactérie peut infecter les ovaires se qui va mener à la contamination du jaune, de l'albumen et des membranes (17, 32). Une fois dans l'œuf, la bactérie fait face à un milieu peu favorable, puisqu'il est riche en lysozymes, mais pauvre en fer (34).

Le poulailler n'est pas un environnement solitaire. Il abrite plusieurs niches dans lesquels la bactérie peut survivre et se multiplier (32). Elle peut se trouver dans les insectes et les petits

animaux qui vivent autour du poulailler. Toutefois, une meilleure circulation de l'air et une diminution de la quantité de poussière peuvent réduire la dissémination des bactéries (34). De plus, les rongeurs très présents sont un réservoir important (65).



**Figure 5: Illustration d'une infection par *Salmonella Enteritidis* chez le poulet.**

Il y a deux modes d'infection possibles. a) Le poulet est infecté par la voie orale. b) Il y a contamination de l'œuf lorsqu'*Enteritidis* pénètre la coquille et les membranes. Le deuxième moyen est que c) la bactérie se propage dans l'organisme et va infecter différentes parties du système reproducteur pour ensuite infecter l'œuf. Une fois dans l'œuf, d) la bactérie va survivre et se répliquer au niveau de l'albumen et sur la membrane vitelline. Par la suite, la bactérie va traverser la membrane et va aller s'établir dans le jaune de l'œuf adapté de (32).

### *2.1.2.2.Traitement et prévention*

Il n'y a pas de signe clinique permettant de savoir si le poulet est colonisé par Enteritidis. Alors, il n'est pas nécessaire d'utiliser d'antibiotiques. De plus, chez l'Homme, les salmonelloses causées par Enteritidis sont limitées et ne nécessitent pas d'antibiotiques (17). Malgré les nombreuses infections causées par Enteritidis, il est difficile de prévenir, puisque la différenciation entre les poulets sains et les porteurs asymptomatiques est ardue.

## **2.2.Maladie systémique**

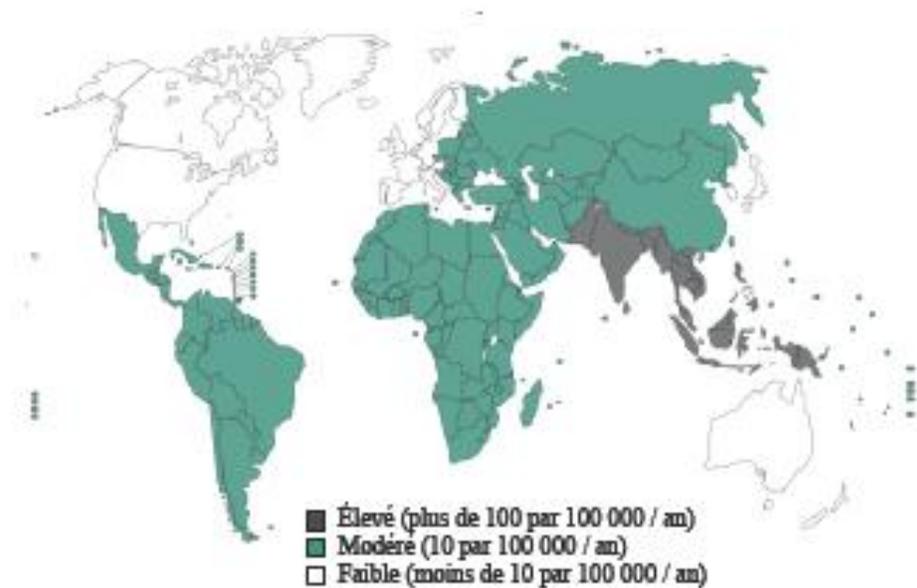
### **2.2.1. Sérovar Typhi**

*Salmonella* Typhi est une bactérie qui est hautement adaptée à l'Homme et ne possède pas de réservoir environnemental ou animal. Cette bactérie cause une maladie systémique, la fièvre typhoïde.

#### *2.2.1.1.Transmission et dispersion*

L'Homme peut être infecté par l'ingestion d'eau et de nourriture contaminée. La cause principale de propagation est les porteurs asymptomatiques ou les patients qui guérissent de la fièvre typhoïde, puisque ceux-ci peuvent sécréter la bactérie dans leurs selles. Ainsi, l'infection va se propager par la voie fécale-orale (3). Il a été estimé qu'en 2000, il y a eu

22 millions de nouveaux cas et 200,000 décès (20). Les populations les plus touchées sont celles des pays en voie de développement, puisque le niveau de salubrité n'est pas adéquat dans certaines régions endémiques (figure 6) (3).



**Figure 6 : Distribution mondiale de la fièvre typhoïde adapté de (20)**

#### *2.2.1.2.Symptômes*

Après l'ingestion de cette bactérie, il y a une période d'incubation de 5 à 21 jours. Par la suite, les symptômes rencontrés sont la diarrhée et des douleurs abdominales qui peuvent durer plusieurs jours. Ensuite, il y a l'apparition d'une forte fièvre de 39 à 40°C. Il y a plusieurs autres symptômes tels que les maux de tête, la toux, l'apparition de taches roses et

parfois des psychoses et de la confusion (5 à 10% des patients) (27). Finalement, dans 10 à 15 % des cas, il peut y avoir saignement gastrique, perforation intestinale et céphalopathie. Ces complications peuvent entraîner la mort du patient. Dans d'environ 1 à 5% des cas, les gens deviennent porteurs asymptomatiques pour plus d'un an (3).

### *2.2.1.3. Diagnostic, traitement et vaccin*

Le diagnostic de cette bactérie peut être difficile, car ses symptômes ne sont pas spécifiques. L'isolement de la bactérie provenant du sang, la moelle épinière ou d'autres sites extra-intestinaux, permet d'avoir un résultat définitif. Cependant, la culture sanguine peut être positive dans 60 à 80% des cas, tandis que les chances d'une culture de la moelle épinière est de 30%. Comme autre moyen de diagnostic, il existe des tests sérologiques (3). Pour traiter la fièvre typhoïde, il y a la prise d'antibiotiques, mais la réhydratation et le balancement d'électrolytes sont également importants (3). L'antibiotique de choix est la fluoroquinolone, mais la résistance de Typhi est de plus en plus élevée. Alors, la combinaison de plusieurs antibiotiques est parfois utile (3). De plus, comme agent de prophylaxie, il existe différents vaccins qui permettent de protéger la population. Le premier vaccin est un vaccin oral de la souche Ty2a, qui est la souche atténuée de Ty2 et se donne en 3 doses. Son efficacité est d'environ 50 à 80% et les effets secondaires sont rares (3). Le deuxième vaccin est composé d'une capsule de polysaccharides et doit être donné à tous les 2 ans. Son efficacité est de 50 à 80% et ce vaccin possède des effets secondaires tels que la fièvre et des maux de tête (3). Le dernier vaccin est fait avec la capsule Vi

modifiée et conjuguée avec l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* non toxique et recombinée. Toutefois, ce vaccin n'est pas encore commercial, mais possède une efficacité de 90% (3, 27).

### **2.2.2. Sérovar Choleraesuis**

*Salmonella Choleraesuis* est une bactérie pathogène qui s'est adaptée aux porcs, mais qui est toutefois capable d'infecter l'Homme de façon assez importante (13).

#### *2.2.2.1. Transmission et dispersion*

Choleraesuis est rarement isolé de réservoir autre que porcin, mais la bactérie peut survivre dans l'environnement. L'excrétion des bactéries par le porc amène la contamination de l'environnement, de la nourriture, des sources d'eau et ainsi de l'humain (13).

#### *2.2.2.2. Symptômes*

Choleraesuis colonise et s'introduit dans l'épithélium intestinal, se propage dans les organes en périphérie et cause une septicémie chez le porc; la paratyphoïde (13). Les symptômes vont apparaître 36 à 48 heures après l'infection (13). La léthargie, la fièvre, les problèmes respiratoires, la toux, la pneumonie et la diarrhée sont des symptômes rencontrés lors d'une infection chez le porc. La congestion du système pulmonaire, des problèmes au

niveau du foie et de la rate, ainsi que des lésions dans les ganglions lymphatiques mésentériques amènent un taux de mortalité assez élevé (61). La majorité des porcs qui vont survivre vont éliminer complètement la bactérie 9 à 12 semaines post-infection (13). Chez l'Homme, la bactérie peut se retrouver dans le sang et peut provoquer des périodes de fortes fièvres. De plus, un tiers des personnes vont avoir la diarrhée. Finalement, la bactérie est rapidement éliminée de l'intestin (72).

#### 2.2.2.3. *Traitement et vaccins*

Il est possible de donner des antibiotiques, mais la présence de résistance aux antibiotiques complique un peu plus la guérison (48). Aux États-Unis, il existe trois types de vaccin pour les porcs. Le premier vaccin est le sérotype Arco de Choleraesuis qui a été atténué par mutagenèse chimique. Le deuxième est le vaccin Nobl qui a subi des passages dans les neutrophiles et qui a perdu son plasmide de virulence. Finalement, le vaccin Argus-SC qui possède des mutations au niveau des gènes *cya*, *crp-cdt*. Ces vaccins se trouvent seulement aux États-Unis (13).

### **3. Pathogénicité de Typhimurium**

Typhimurium possède plusieurs hôtes et dans chacun la maladie produite peut être différente. Toutefois, certains animaux peuvent être des porteurs asymptomatiques. Par contre, d'autres vont avoir une maladie localisée comme la gastroentérite, tandis que d'autres vont avoir une maladie systémique qui va entraîner la mort. Alors, voici les principales étapes des deux maladies.

#### **3.1. Ingestion**

Que ce soit pour la maladie localisée ou systémique, une concentration de  $10^5$  à  $10^{10}$  bactéries doit être ingérée pour initier une infection (24). Pour que la bactérie survive à l'acidité de l'estomac, elle doit posséder les gènes responsables de la réponse à la tolérance de l'acide (ATR). Typhimurium peut supporter un pH qui peut descendre jusqu'à 4-5. Il existe deux types de systèmes distincts pour la réponse face à l'acide, un qui est activé lors de la phase logarithmique et l'autre dans la phase stationnaire (27). Le système ATR de la phase logarithmique active plus de 50 protéines appelées *acid shock proteins* (ASP). La moitié de ces protéines sont induites dans d'autres stress, comme le stress face à la chaleur. La ATR de la phase logarithmique est induite de deux façons : lors de l'adaptation face au choc pré-acide (pH 5,8) et l'adaptation au choc acide (pH 4,4). Les deux moyens sont

régulés par *rpoS* et *fur*. Le système ATR de la phase stationnaire est indépendant de *rpoS* et protège davantage les bactéries lors d'une longue période à pH 3 (30).

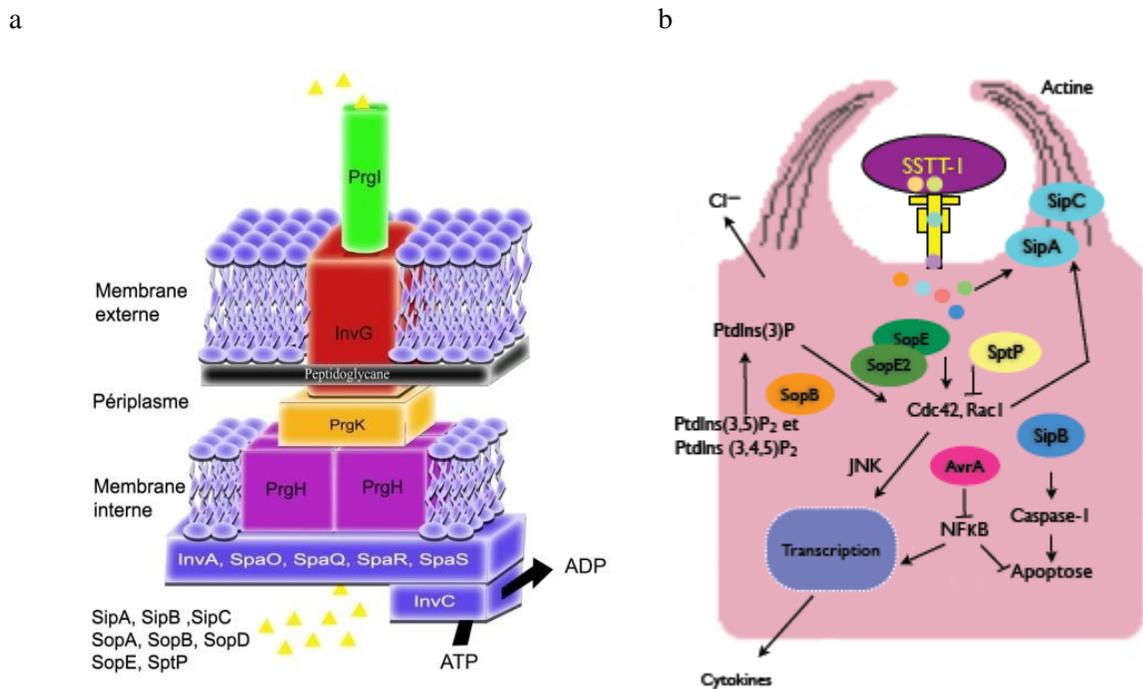
### **3.2.Attachement**

Lors de la maladie localisée et systémique, la bactérie, après avoir passé l'estomac, arrive dans les tissus intestinaux et doit s'attacher aux cellules épithéliales. Les plaques de Peyer sont le site de choix, et plus particulièrement les cellules M (27). La bactérie peut adhérer avec l'aide de plusieurs types de fimbriae ou de pili. Premièrement, le fimbria de type 1 (Fim) est spécifique pour le récepteur alpha-D-mannose qui se retrouve sur différents types de cellules eucaryotes (24). Deuxièmement, il y a le fimbria Pef qui est encodé sur un plasmide et qui permet une meilleure adhérence aux vili absorptive et sur les follicules associés à l'épithélium des plaques de Peyer du petit intestin (11, 24). Troisièmement, le long fimbria polaire Lpf médie l'adhésion sur les cellules les plaques de Peyer. Ce fimbria est situé entre deux régions homologues d'*E. coli* K-12, ce qui suppose qu'il a pu être acquis par transfert horizontal (24). Dernièrement, il y a le fimbria curli (*agf*). L'expression de ce fimbria affecte la morphologie des colonies et tend à autoagréger les cellules ensemble. Ainsi, il pourrait jouer un rôle dans la résistance à l'acide de l'estomac ou à d'autres biocides. D'autres hypothèses suggèrent que curli serait impliqué dans l'attachement des bactéries aux cellules épithéliales de l'hôte (24).

### **3.3. Invasion**

Une fois attaché aux cellules des plaques de Peyer du petit intestin, *Typhimurium* va stimuler son internalisation dans les cellules non-phagocytaires à l'aide de son système de sécrétion de type 3 (SST3). Ce système ressemble à une aiguille et se trouve sur l'îlot de pathogénicité 1 (SPI 1). La figure 7 est une représentation du SST3 du SPI 1 et les différentes étapes d'invasion d'une cellule épithéliale provenant de l'article de Hapfelmeier en 2005. Ce système permet d'injecter des protéines appelées effecteurs dans la cellule hôte (figure 7 a) (27). L'aiguille ne peut pas injecter directement dans le cytoplasme de la cellule hôte. Pour faciliter le transport des protéines dans la cellule, l'aiguille va interagir avec une structure qui se trouve dans la membrane cellulaire de l'hôte. Par la suite, les effecteurs responsables du complexe de translocation sont produits par la bactérie et sont les premières molécules effectrices du SST3 à être sécrétées. Alors, ces protéines sont pratiquement insérées dans la membrane cellulaire de l'hôte pour former un canal supplémentaire, qui permet de libérer les effecteurs dans le cytoplasme (29). Les effecteurs SipA, SipC et SopB vont entraîner le réarrangement du cytosquelette de la cellule eucaryote et la membrane cellulaire va enrober la bactérie qui sera internalisée (figure 7 b) (27, 29). De plus, l'injection de SopB va induire l'attraction des neutrophiles au site d'infection et va altérer la balance d'ions à l'intérieur de la cellule (figure 7 b). Le débalancement des ions dans la cellule induit la sécrétion de liquide dans le tractus intestinal. SopB semble aussi avoir un rôle important dans l'activation des voies sécrétrices. De plus, d'autres effecteurs vont induire une série de cytokines pro-inflammatoires qui vont occasionner l'inflammation

des muqueuses (figure 7 b). Cette réponse inflammatoire et le déséquilibre des ions contribuent aux symptômes de gastroentérite associés à une infection de *Typhimurium* (29) (24, 27). Lorsque la bactérie fait une infection systémique, au lieu de créer une réponse inflammatoire élevée, la bactérie va passer inaperçue et envahir plus profondément les tissus.



**Figure 7 : Système de sécrétion de type 3 du SPI 1**

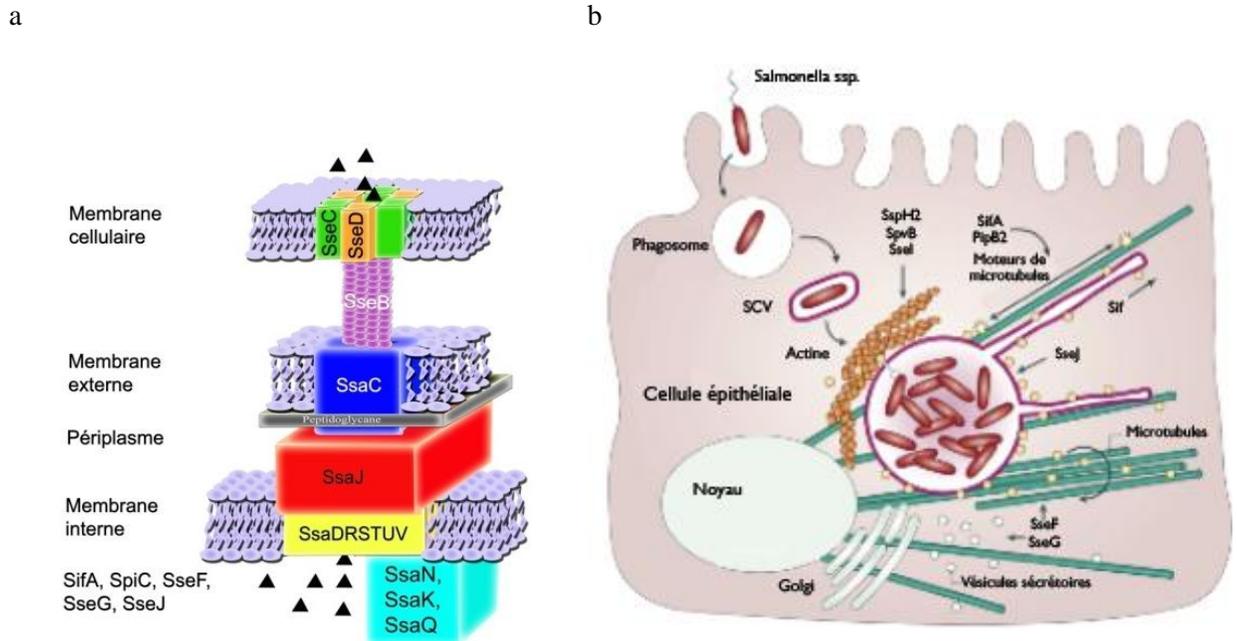
a) Représentation schématique détaillé du SST3 du SPI 1 avec ces effecteurs (Maxime Béland)

b) Interaction du SST3 du SPI avec une cellule adapté de (41)

### 3.4. Survie et persistance

Lors d'une infection systémique, les bactéries vont coloniser les cellules des plaques de Peyer et les tissus lymphoïdes. Ceux-ci présentent les antigènes, ce qui mène à une réponse immunitaire où il y a principalement une production d'IgA. L'invasion résulte en une destruction des cellules M et une inflammation des plaques de Peyer. Les bactéries vont continuer à croître, mais il n'est pas encore clair si cette croissance est intracellulaire ou extracellulaire. Cependant, il est connu que Typhimurium envahit les cellules B et T dans les cultures tissulaires. De plus, le SPI 2 serait induit et nécessaire pour la croissance intracellulaire dans les macrophages (27). Les gènes codés par le SPI 2 sont des effecteurs, des chaperonnes, des protéines de structure et des protéines régulatrices nécessaires au SST3 (29). La figure 8 représente les gènes impliqués dans l'assemblage du SST3 du SPI 2 (a), ainsi que l'interaction avec un macrophage (b) (42). Alors, une fois propagée dans les plaques de Peyer, Typhimurium va envahir systématiquement en ciblant les organes comme le foie, la rate et la moelle osseuse. Grâce au SPI 2 qui lui donne la capacité de croître dans les macrophages, Typhimurium va se répliquer dans des vacuoles spécialisées nommées SCV (*Salmonella containing vacuole*) (figure 8 b). Il y aura formation de longues structures tubulaires, appelé *Sif* (*Salmonella induced filaments*). Ces filaments sont riches en glycoprotéines lysosomales, proviennent des SCV et nécessitent la formation de microtubules (figure 8 b). Normalement, les bactéries sont tuées par des substances toxiques déversées par les lysosomes à l'intérieur des phagocytes. Le cycle normal est que le lysosome se lie au phagosome et déverse des enzymes hydrolytiques, des peptides

antimicrobiens et des oxydases NADPH dépendantes (produisant des superoxydes). De plus, les macrophages activés vont produire des oxydes nitriques. Cependant, Typhimurium possède l'habileté de prévenir l'induction et la libération de ces enzymes dans les SCV et est ainsi capable d'y survivre. Aussi, la génération de superoxyde par les macrophages est dépendante des oxydases NADPH-dépendantes. Ainsi, la libération des oxydases peut être bloquée en empêchant la fusion du lysosome et du phagosome, ceci à l'aide du SPI 2 (27). Donc, lors d'une infection septicémique, *Salmonella* envahit les cellules telles que les macrophages et les cellules dendritiques pour ainsi se disperser dans tout l'organisme. Cependant, *Salmonella* ne semble pas se multiplier dans les cellules dendritiques, mais elle demeure viable avec une activité métabolique plus faible. De plus, certains gènes encodés par le SPI 2 pourraient diminuer la présentation antigénique des cellules dendritiques. Alors, une combinaison d'un ralentissement du métabolisme et une immunosuppression contribuent à la persistance de *Salmonella* dans les cellules hôtes. Finalement, lors de la migration des macrophages ou des cellules dendritiques dans les organes du corps, *Salmonella* peut se disperser dans les cellules adjacentes et induire l'apoptose (29). Une fois dans les organes, Typhimurium peut rester et persister de quelques mois à plusieurs années, grâce à son interaction avec les macrophages. Cependant, les bactéries reviennent à l'intestin pour être excrétées. Ainsi, il est possible d'infecter un nouvel hôte.



**Figure 8 : Système de sécrétion de type 3 du SPI 2**

a) Représentation schématique du système de sécrétion de type 3 (SST3) du SPI 2 de *Salmonella* (fait par Maxime Béland)

b) Implication de ses différents effecteurs lors de la multiplication intracellulaire adapté de (42)

### 3.5. Modèles d'infection

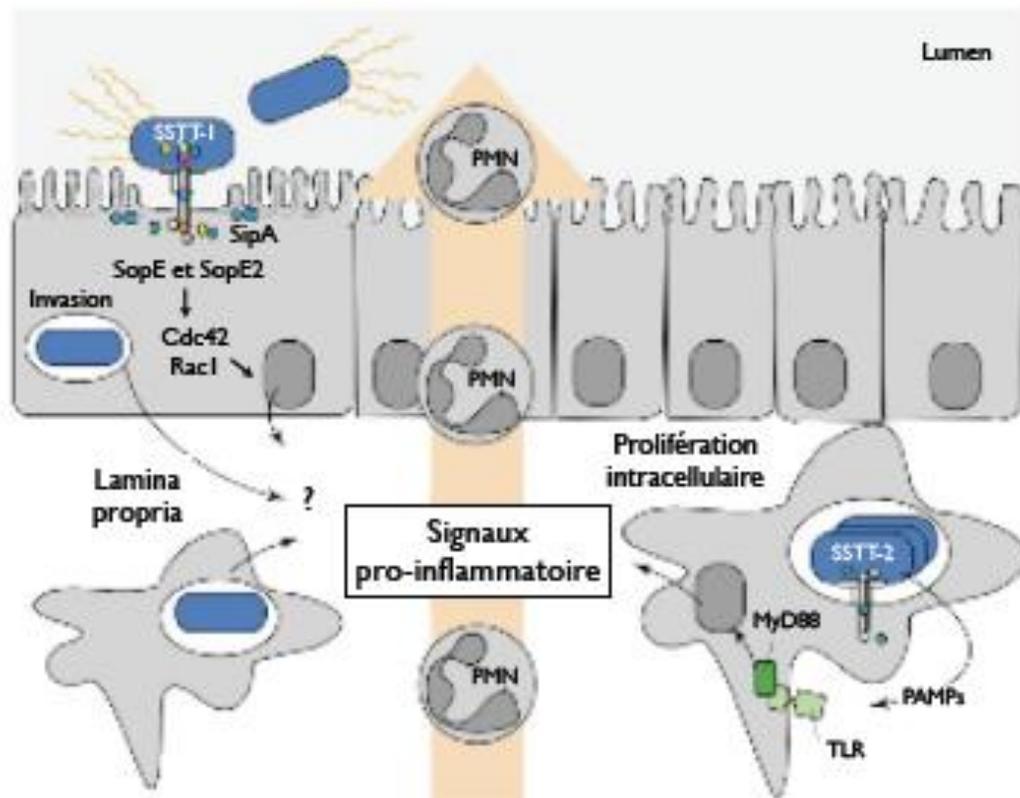
Typhimurium peut faire deux types de maladies. Il y a la gastroentérite, où Typhimurium ne fait que l'invasion dans les cellules de l'intestin et est reconnu rapidement par le système immunitaire. Ainsi, il y a inflammation et apparition des symptômes de gastroentérite. Il existe plusieurs modèles animaux pour caractériser ces différentes étapes. Parfois, Typhimurium va survivre, persister dans les organes et ainsi causer une maladie

systémique. Le seul modèle animal pour cette maladie est la souris et sert aussi pour étudier la fièvre typhoïde, puisque les symptômes retrouvés ressemblent à ceux causés par Typhi chez l'Homme. Dans cette section, différents modèles animaux trouvés dans la littérature seront abordés.

### 3.5.1. *Gastroentérite chez la souris*

Tout d'abord, l'intestin normal d'une souris est constitué de bactéries commensales, qui permettent d'établir une certaine résistance aux bactéries pathogènes. Plusieurs mécanismes ont été discutés pour expliquer cette résistance à la colonisation. Premièrement, les bactéries commensales peuvent relâcher des métabolites inhibiteurs comme des bactériocines. Deuxièmement, il peut y avoir compétition entre les bactéries pathogènes et les bactéries commensales pour la disponibilité des nutriments et des sites de colonisation. Troisièmement, la flore commensale induit un stimulus constant pour la réponse immunitaire intestinale, ce qui aide à maintenir une immunité stable (41) (75). Quatrièmement, il est possible que la flore puisse inhiber les toxines qui sont produites en les couplant avec des récepteurs bactériens (7, 21). Finalement, la flore microbienne de l'intestin produit son propre environnement (pH et métabolite toxique), ce qui peut être défavorable pour les bactéries pathogènes (41, 75). Donc, pour observer la colonisation de Typhimurium dans l'intestin de souris, il faut faire un traitement à la streptomycine pour éliminer les bactéries commensales. Alors, après une seule dose de streptomycine (20 mg), Typhimurium va coloniser le gros intestin des souris et va engendrer une sévère

inflammation diffuse du cecum et du colon (41). Les flagelles permettent à la bactérie de pénétrer la muqueuse pour se rapprocher de l'épithélium (figure 9). Les effecteurs sécrétés par le SST3 du SPI 1 permettent l'invasion de la bactérie pour avoir accès à la *lamina propria*. Une fois dans la *lamina propria*, la bactérie va survivre ou se répliquer et va induire l'inflammation (41), ce qui correspond aux symptômes de la gastroentérite chez l'Homme.



**Figure 9 : Infection d'un modèle murin de gastroentérite par *Salmonella***

Schématisation des premières étapes d'une infection par Typhimurium dans le modèle murin de gastroentérite adapté de (41).

### 3.5.2. *Maladie systémique chez la souris*

Lorsqu'une lignée de souris susceptible (Balb/c) est infectée avec Typhimurium, les signes de maladie sont présents entre 4 à 8 jours post-infection. Le développement de la maladie systémique est caractérisé par la multiplication rapide des bactéries dans le foie et la rate, sans diarrhée. La croissance bactérienne dans les ganglions lymphatiques, le foie et la rate amène la formation d'abcès contenant des leucocytes polymorphonucléaires (PMN). Les lésions microscopiques deviennent plus larges et se transforment tranquillement en granulomes avec un centre nécrosé entouré de leucocytes mononucléaires (72). C'est au niveau de ces lésions que Typhimurium réside à l'intérieur de macrophages. Les lésions des tissus hépatiques peuvent être causées par des cytokines pro-inflammatoires ou par des molécules d'oxyde nitrique produites en réponse au lipide A. Après environ 8 jours, la souris mourra, puisque la concentration de bactéries aura atteint son niveau létal dans les organes ( $10^8$  bactéries) (52, 72).

### 3.5.3. *Gastroentérite chez le porc*

Tout d'abord, comme dans le modèle de gastroentérite chez la souris, Typhimurium doit résister au pH acide de l'estomac du porc. Après le passage dans l'estomac, la bactérie doit traverser le petit intestin où l'on retrouve d'autres facteurs antibactériens (sels biliaires, lysozymes et défensines). Les sels biliaires inhibent l'invasion de Typhimurium. Donc, la bactérie va aller coloniser un peu plus loin (ileum, cecum et le colon) dans le tractus intestinal. L'adhérence se fera au niveau de la muqueuse intestinale, qui sera suivie de

l'invasion des cellules M, des entérocytes absorbants ou de cellules sécrétant du mucus. Une fois dans les cellules, Typhimurium va se répliquer rapidement, ce qui induira une réponse inflammatoire. Ce phénomène explique pourquoi généralement Typhimurium fait une maladie localisée dans l'intestin chez le porc. La propagation de Typhimurium dans l'organisme en utilisant la circulation sanguine ou le système lymphatique pour infecter les organes internes n'a pas été démontrée chez le porc (6). Ce modèle est l'un des plus fiables, puisque les symptômes du porc sont similaires à ceux retrouvés chez l'Homme.

#### 3.5.4. *Gastroentérite chez le veau*

Tout d'abord, ce modèle est un bon choix, puisque le veau est un hôte naturel pour Typhimurium et les signes cliniques et les manifestations histologiques sont similaires à la maladie que cause la bactérie chez l'Homme. Lorsque Typhimurium est ingéré, le veau va développer des signes cliniques après 12 à 48 heures. Les symptômes sont la diarrhée, la perte de poids due à la déshydratation et la fièvre. La diarrhée peut durer entre 2 à 8 jours. Donc, dans ce modèle, il est possible d'observer une inflammation dans la partie terminale de l'iléum et dans le colon proximal. De plus, la diarrhée est provoquée par l'augmentation de la perméabilité vasculaire et par la perte de l'intégrité de l'épithélium causée par l'influx de PMN et des blessures de l'épithélium. La morbidité et mortalité des veaux sont associées avec l'âge, la dose de bactéries au départ et la nature du lysotype de Typhimurium (24, 41, 72).

### 3.5.5. *Gastroentérite chez le singe*

Certaines études ont été faites dans les années 60 et 70 sur les singes rhésus, mais à l'heure actuelle, d'autres modèles tels que présentés plus haut sont davantage utilisés. Toutefois, les symptômes des singes sont semblables à ceux retrouvés chez l'humain, c'est pourquoi ce modèle était utilisé.

Durant, les 4 premiers jours, le tractus intestinal est colonisé par les bactéries et parfois le foie et la rate peuvent l'être aussi. Dans les premiers jours, le colon est infiltré par les PMN dans les muqueuses, les cellules épithéliales desquamées et il y a une sécrétion dans le lumen. Au jour 4, les bactéries se retrouvent dans les cellules épithéliales du colon et dans les macrophages de la *lamina propria*. Au jour 7, les muqueuses sont beaucoup plus colonisées de façon générale et la *lamina propria* contient plus de cellules inflammatoires. La progression dans le lumen est sensiblement la même, mais seulement plus lente (24, 51, 69).

### 3.5.6. *Gastroentérite chez le cochon d'Inde*

Tout d'abord, les cochons d'Inde vont ingérer la bactérie avec de l'opium pour ralentir le mouvement de l'intestin. Dans ces expériences, seulement l'iléum est observé. Après 12 heures, il est possible de trouver des bactéries dans les cellules épithéliales et dans les PMN. De plus, à l'endroit où les bactéries sont en contact avec la membrane, il semble y avoir dégénération des microvilli et renflement au niveau du cytoplasme. Après 24 heures, il y a la présence d'un intense exsudat d'inflammation au niveau de la membrane. À cet

instant, certaines bactéries sont retrouvées dans les cellules épithéliales desquamées et dans les PMN du lumen. Finalement, à 48 heures, l'inflammation est plus répandue, les bactéries se retrouvent dans les phagocytes et les cochons d'Inde souffrent d'une gastroentérite (24, 78). Ce modèle est un peu moins répandu que celui de la souris, mais il est toutefois utilisé pour Typhimurium et d'autres bactéries.

#### 4. **Problématique chez le porc au Québec**

##### **4.1. Différences entre Choleraesuis et Typhimurium**

Les États-Unis ont beaucoup de problèmes avec Choleraesuis qui infecte le porc et cause une maladie systémique, tandis qu'au Québec ce sérovar n'est pas retrouvé. Cependant, le Québec est dans une crise depuis quelques années, puisqu'il y a beaucoup de porcs qui meurent de maladies systémiques. Toutefois, le sérovar retrouvé dans ces épidémies n'est pas le sérovar Choleraesuis, mais plutôt le sérovar Typhimurium, qui est normalement une bactérie commensale du porc. Ce qui peut être inquiétant pour nous, c'est que les souches commensales du porc peuvent causer une gastroentérite chez l'humain. Alors, d'un point de vue de la santé publique, il est important de se demander ce que ces nouvelles souches possèdent pour ainsi causer la mort chez les porcs. Aussi, si les souches commensales du

porc causent la gastroentérite, qu'est-ce que ces souches septicémiques de porcs peuvent causer aux humains? De plus, on sait que le porc ressemble à l'Homme à plusieurs points de vue. Alors, une fois que ces souches mortelles sont bien établies, il serait possible qu'elles infectent l'Homme pour causer une épidémie. Ce phénomène s'est déjà produit avec le virus de la grippe porcine qui a fait plusieurs morts lors de sa transmission du porc à l'Homme en 2009 (12, 19, 86).

## **4.2.Plasmides**

### **4.2.1. Plasmide de virulence**

Plus du trois quarts (88%) des souches de Typhimurium possèdent un plasmide de virulence de 90-kilobase (kb) (pSLT, pSTV) (44) (1). La plupart des souches de Choleraesuis possèdent un plasmide de virulence de 50-kb (pSCV, pSCS) (16). Ce plasmide est nécessaire pour que Choleraesuis soit totalement virulent chez le porc (23). Le tableau II représente les différents gènes connus se retrouvant sur le plasmide de virulence selon le sérovar (13). La composition du plasmide peut varier selon le sérovar, à cause des pressions de sélection associées à leur hôte respectif (70). L'opéron *spv* se retrouve sur tous les plasmides de virulence et code pour des gènes de virulence qui permettent d'infecter leurs hôtes spécifiques (36). Ainsi, l'opéron *spv* du plasmide de virulence de Typhimurium est impliqué dans la survie des macrophages, dans l'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales et joue un rôle au sein de l'infection systémique chez la souris (49, 85). Le

premier gène, *spvR*, est un régulateur transcriptionnel activateur de *spvABCD* (70). *spvB* aurait un rôle dans la déstabilisation du cytosquelette de la cellule, en empêchant la transformation de la G-actine en F-actine (58). Pour Typhimurium, les gènes *spv* sont induits durant la phase stationnaire, dans un milieu pauvre en carbone et lors de l'infection de macrophages (36, 58). Sur le plasmide de Typhimurium et de Choleraesuis, on retrouve *rck*, qui est responsable de la résistance face au complément, soit en bloquant la polymérisation des composantes C9 du complément. Ainsi, il permet de résister au sérum. Il y a l'opéron *pef*, codant pour un fimbria induit à pH acide. Ce fimbria contribue à l'adhésion de Typhimurium aux cellules épithéliales des souris, mais aussi influence la sécrétion des fluides. Cet opéron se retrouve aussi sur le plasmide de Choleraesuis. Ensuite, sur le plasmide de Typhimurium, il y a *srgA*, qui est une oxidoréductase des liens disulfides. Ce gène est absent du plasmide de virulence de Choleraesuis. Finalement, *mig-5* est un gène induit dans les macrophages qui code pour une anhydrase carbonique putative. Celui-ci se retrouve au niveau du plasmide de Typhimurium et de Choleraesuis. De plus, le plasmide de virulence de Typhimurium possède la capacité d'être mobilisable, ce qui n'est pas le cas pour celui de Choleraesuis (13, 70).

**Tableau II** : Compositions des plasmides de virulence chez différents sérovars de *Salmonella* (pSTV; Typhimurium, pSPV; Pullorum, pSDV; Dublin, pSEV; Enteritidis, pSCV Choleraesuis) adapté de (13).

Opéron ou gène	Opéron présent chez :					Fonction
	pSTV	pSPV	pSDV	pSEV	pSCV	
<i>rsk</i>	+	-	-	+	+	Résistance au sérum
<i>repA</i> de RepFIB	+	-	-	+	+	Réplication
opéron <i>pef</i>						Biosynthèse des fimbriae
<i>pefBACD</i>	+	-	-	+	+	
<i>orf5</i>	+	-	-	+	-	
<i>orf6</i>	+	-	-	+	-	
<i>faeHI</i>	-	+	+	-	-	Biosynthèse des fimbriae
<i>rck</i>	+	+	+	+	-	Résistance au sérum
<i>traT</i>	+	+	+	-	+	Empêche la conjugaison
<i>oriT</i>	+	+	-	+	-	Mobilisation

#### 4.2.2. Plasmide de résistance aux antibiotiques

Les plasmides de résistance sont classés dans des groupes d'incompatibilité (Inc). L'incompatibilité des plasmides est due par une même origine de réplication ou par une similitude des plasmides. Ainsi, certains plasmides ne peuvent pas se trouver au sein d'une même cellule de façon stable. Il existe 4 groupes de plasmides incompatibles, qui sont définis par leurs ressemblances génétiques (IncF, IncP, plasmide Ti et IncI) (10).

Ce n'est pas tous les plasmides qui peuvent se transférer seul. Pour se faire, le plasmide doit posséder des gènes qui codent pour des protéines de conjugaison (gènes *tra*). Certains

plasmides ne peuvent pas se transférer seul, mais peuvent être aidés par les plasmides autotransférables. Les plasmides mobilisables sont plus petits que les autres, puisqu'ils ne possèdent pas toute la machinerie de transfert (71).

Généralement, les gènes de résistance qui se trouvent sur les plasmides sont localisés sur des transposons. Les transposons sont des éléments génétiques qui possèdent un ou plusieurs gènes de résistance (10). De plus, les transposons codent pour une enzyme située entre des séquences d'intégration. Cette enzyme est une transposase qui permet de se recombiner avec le plasmide ou le chromosome de la bactérie (71).

Un autre type d'élément fréquemment retrouvé chez *Salmonella*, qui permet de transporter des gènes de résistance est l'intégron. L'intégron est un transposon possédant des éléments supplémentaires. Ils contiennent des gènes d'intégrase et des sites d'attachement (*att*). Alors, l'intégrase capture un segment d'ADN, qui ne contient pas de promoteur et l'intègre dans le site *att*. Par la suite, l'intégron peut exprimer le segment capturé par son promoteur, qui est en amont du site d'insertion (71). Ainsi, cet élément génétique est responsable pour du recrutement et de l'assemblage en groupe des gènes de résistance. Il existe 4 classes d'intégrons (1 à 4). La classe 1 d'intégrons est normalement retrouvée avec des transposons qui contribuent à la transmission verticale. Ceci favorise la mobilisation entre le plasmide et le chromosome bactérien. La classe 2 d'intégrons a été décrite comme faisant partie de la famille de transposon Tn7. La classe 3 d'intégrons n'est pas associée avec un transposon, mais possède une cassette qui confère la résistance aux carbapénems (*bla<sub>IMP</sub>*). La classe 4

d'intégrons est associée avec un gène de virulence qui se trouve sur le chromosome de petite taille chez *Vibrio cholerae* (10).

Le plasmide de virulence de Choleraesuis est habituellement de 50 kb. Toutefois, il y a parfois apparition de plasmides entre 110 et 140 kb. Ces plasmides de virulence sont des plasmides qui ont été soumis à une cointégration ou une recombinaison avec d'autres plasmides tels que les plasmides de résistance aux antibiotiques (15, 16). Généralement, les résistances aux antibiotiques trouvées sur le plasmide de virulence de Choleraesuis protègent contre l'effet de la sulfonamide (*sulI*) et de l'ampicilline (*bla<sub>TEM-1</sub>*)(15).

### **4.3.Résistance aux antibiotiques**

La résistance aux antibiotiques est un moyen pour une bactérie de s'adapter à un nouvel environnement (10). Il existe quatre catégories de mécanismes permettant de résister. Premièrement, il est possible de restreindre l'accès de l'antibiotique au site désiré. Par exemple, chez les bactéries Gram-négative, il est possible de générer une pompe efficace pour plusieurs antibiotiques à l'aide de la famille *resistance-nodulation-division* (RND) qui s'associe à des protéines de membrane de la famille *membrane-fusion-protein* (MFP) et à la membrane externe. Ainsi l'antibiotique est rejeté directement à l'extérieur de la bactérie. Typhimurium possède cinq systèmes de sortie d'antibiotique du type RDN. La mutation de l'un des systèmes ne démontre pas d'effet significatif, mais lorsqu'ils sont tous mutés, Typhimurium est davantage sensible à plusieurs composés (57). La deuxième catégorie

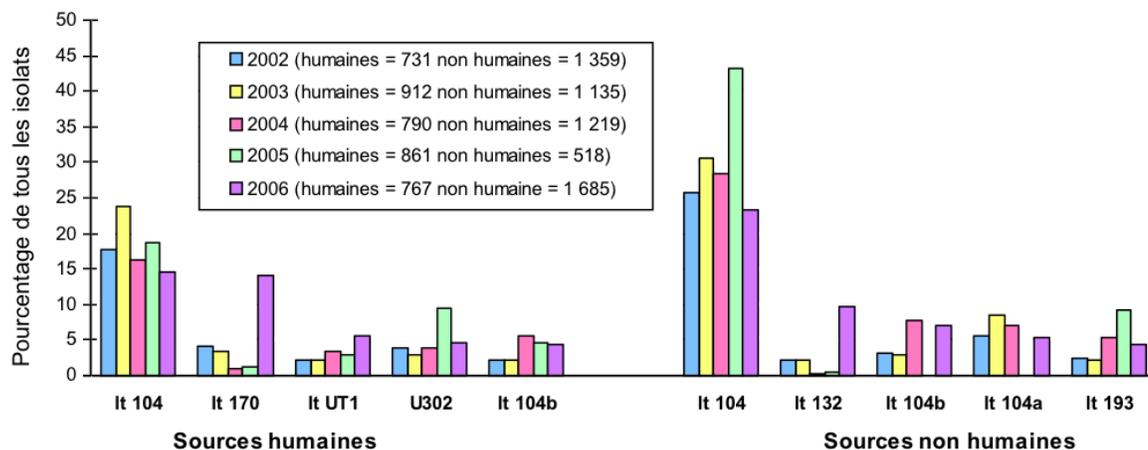
correspond aux enzymes pouvant inactiver l'antibiotique, en les hydrolysant ou en ajoutant un élément chimique dans une partie importante. La troisième catégorie est la modification du site d'action de l'antibiotique. Ce mécanisme permet d'introduire des mutations au niveau du gène qui code pour la protéine cible. Ainsi, la protéine est toujours fonctionnelle, mais ne peut plus être liée à l'antibiotique. La dernière catégorie est l'absence d'activation de l'antibiotique. Pour l'instant, un seul antibiotique (métronidazole) fait partie de cette catégorie, puisqu'il est le seul qui doit être activé avant de pouvoir attaquer l'ADN bactérien (71).

Chez *Typhimurium*, on retrouve un *Salmonella genomic island 1* (SGI 1) qui est un fragment de 43-kb possède 44 cadres de lecture ouverts (ORFs), dont la plupart ont des gènes homologues connus. Cet îlot se retrouve seulement chez le lysotype LT104 (section 4.4.4). Les ORFs peuvent être séparés en plusieurs groupes. Premièrement, il y a les gènes qui sont impliqués dans la recombinaison et dans la réplication de l'ADN. Deuxièmement, il y a les gènes impliqués dans le transfert et dans la régulation. Finalement, il y a les gènes de résistance aux antibiotiques et ceux dont la fonction est inconnue. Dans un segment de 13-kb, il y a la région MDR (*multidrug-resistance*), qui contient les gènes de résistance à cinq antibiotiques (ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, tétracycline et sulphonamide) (14, 56, 81).

Chez *Choleraesuis*, une mutation importante dans *gyrA* lui confère une résistance à la ciprofloxacine. De plus, la production de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu permet une résistance à la troisième génération de céphalosporines (15).

#### 4.4. Différents lysotypes

Au milieu des années soixante, il arrivait souvent de retrouver de la résistance aux antibiotiques chez Typhimurium. Par contre, durant les années 90, il y a eu une augmentation incroyable de la fréquence de ces gènes chez les souches isolées. Alors, de 1991 à 1994, l'incidence des souches multirésistantes de Typhimurium a augmenté pour ainsi atteindre 62% des isolats (79). Le lysotypage est une méthode qui permet de séparer les souches de Typhimurium en lysotypes, selon leur susceptibilité aux phages. Les lysotypes retrouvés fréquemment au Canada selon leur source sont représentés à la figure 10. Que ce soit de source humaine ou non, LT104 est le lysotype le plus rencontré entre les années 2002 à 2006.



**Figure 10 : Lysotype de Typhimurium** adapté de (25)

Proportion de lysotype de Typhimurium de sources humaines et non humaines pour 2002 à 2006.

#### **4.4.1. LT29**

Au courant des années 60, Typhimurium LT29 était une des premières souches multirésistantes (ampicilline, streptomycine, sulfonamide, tetracycline et furazolidone), responsable de beaucoup d'infections chez les veaux et les humains. De plus, ce lysotype peut entraîner la mort chez les groupes d'âge à risque et les gens immunosupprimés. Cette épidémie a permis la recommandation de ne pas utiliser les antibiotiques comme promoteurs de croissance dans l'industrie alimentaire (79).

#### **4.4.2. LT204**

Au fil des années 75 et durant les années 80, il y a eu apparition d'un nouveau lysotype (LT204) qui est devenu épidémique chez les veaux et l'Homme. L'arrivée d'un nouveau lysotype est une répercussion causée par l'acquisition de plasmides et de transposons codant pour des nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques (chloramphénicol, gentamycine, kanamycine et triméthoprime). Depuis 1986, LT204 est de moins en moins présent. En plus des veaux et de l'Homme, LT204 est associé au porc et à la volaille (8).

#### **4.4.3. LT35**

Comme énoncé plus haut, certaines souches de Typhimurium ne possèdent pas le plasmide de virulence (12%) (1). C'est le cas pour les LT35. Il a été démontré que les lysotypes ne possédant pas le plasmide de virulence ont une diminution de leur virulence et démontrent

une variation dans l'habileté à obtenir ou utiliser ce plasmide. Lorsque le plasmide est introduit dans la souche LT35, l'expression du plasmide devient intermédiaire. Cela veut dire que la virulence n'est pas rétablie comme une souche de Typhimurium possédant un plasmide, mais démontre tout de même une augmentation contrairement à d'autres lysotypes (58). Ainsi, dans l'évolution du lysotype LT35, celui-ci a perdu le plasmide, mais pas tout à fait la capacité de l'utiliser.

#### **4.4.4. LT104**

Typhimurium LT104 est une bactérie pathogène pour l'Homme et les animaux, qui possède une importance internationale au niveau de la santé publique. Originellement, la bactérie était associée aux veaux et causait une maladie sévère (46). Par la suite, la bactérie s'est propagée chez d'autres animaux incluant le porc, le mouton et la volaille. Plusieurs épidémies ont été répertoriées en Europe et en Amérique du Nord, provenant de produits laitiers non-pasteurisés, de viande mal cuite et du contact direct ou indirect avec les animaux infectés (19, 79). Il semble que les infections de Typhimurium LT104 sont plus sérieuses que celles causées par d'autres *Salmonella* non-typhoïdales. Le pourcentage d'admissions à l'hôpital et le pourcentage de mortalités sont plus élevés. Toutefois, malgré les conséquences plus sérieuses, Typhimurium LT104 ne possède pas un pouvoir invasif plus grand. Un élément qui apporte un avantage à Typhimurium LT104 est son évolution au niveau de sa résistance aux antibiotiques. Une population avait la résistance à 5 antibiotiques (ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, sulphonamide et tétracycline)

provenant de mutations au niveau du chromosome. La génération suivante possédait les 5 résistances, mais a aussi acquis un plasmide avec la résistance à la triméthoprine. Une autre génération avait une résistance à la fluoroquinolone. Finalement, certains isolats de Typhimurium LT104 possèdent des résistances à plus de 9 antibiotiques (46). Toutefois, certaines souches de Typhimurium LT104 ne possèdent pas le plasmide de virulence, ce qui ne les empêche pas d'être dangereuses.

## **5. Méthode d'identification de gènes**

Les bactéries expriment plusieurs gènes selon l'environnement qu'elles se trouvent ou selon les stress qu'elles subissent. Il existe plusieurs méthodes permettant d'identifier des gènes qui sont exprimés dans différentes conditions. Ces techniques peuvent être séparées en deux groupes. Premièrement, il y a la sélection négative, qui sélectionne les gènes mutés qui font en sorte que la bactérie ne survit pas à une condition. Ainsi, ces gènes sont dits « essentiels » pour cette condition particulière. Deuxièmement, la sélection positive permet d'obtenir les gènes qui sont exprimés durant la condition testée à l'aide d'un gène rapporteur. Alors, voici un survol de différentes techniques utilisées dans le milieu de la recherche et plus précisément, la technique qui a été utilisée au cours de mon projet de maîtrise.

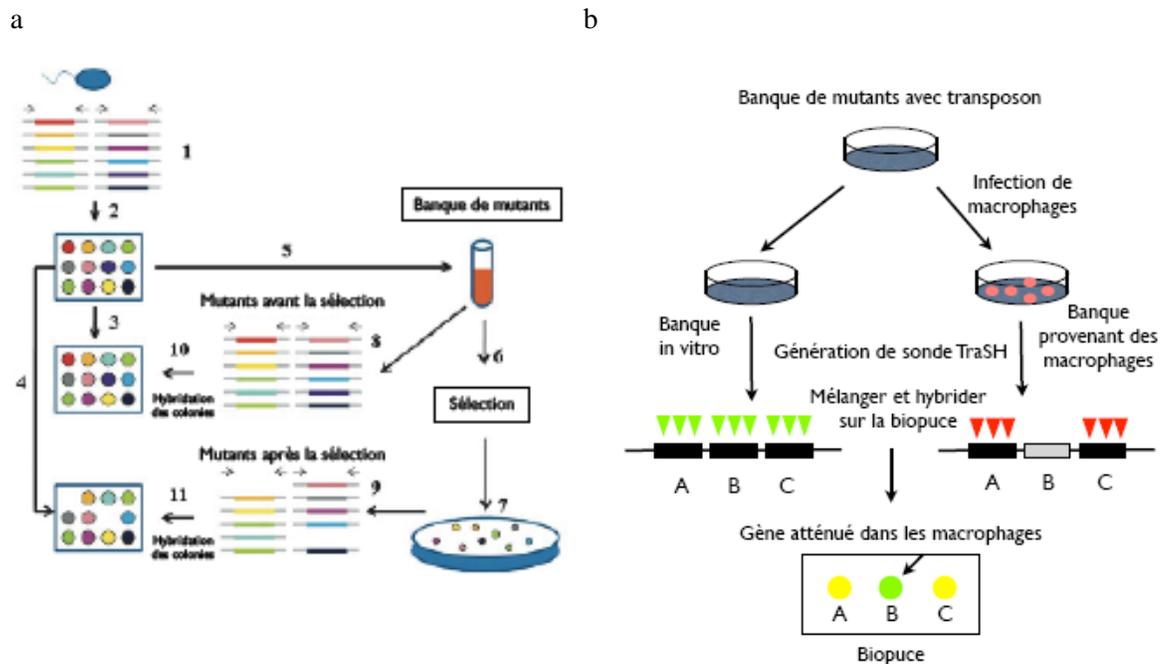
## 5.1.Sélection négative

Tout d'abord, le principe de base des techniques de sélection négative est la mutagenèse. Ainsi, les bactéries possédant une mutation dans un gène essentiel à la survie face à une condition donnée ne seront pas retrouvées à la fin de l'expérience. Deux techniques pouvant servir comme exemple d'une sélection négative sont la technique *Signature Tagged Mutagenesis* (STM) et *Transposon Site Hybridization* (TraSH). À la figure 11, il est possible d'observer une schématisation des techniques (26, 67).

La technique STM (figure 11 a) comprend la construction d'une banque de mutants possédant des transposons avec des étiquettes de séquences d'ADN différentes. Ainsi, cette séquence permet de les amplifier de façon spécifique au sein d'un mélange de mutants (55). Cependant, cette technique est limitée par la quantité de gènes à analyser en même temps (73). De plus, la création d'une banque de mutants peut prendre du temps et demeure une manipulation fastidieuse. Par contre, une fois la banque de mutants construite, il n'est pas nécessaire de créer de nouveau des mutants pour ainsi caractériser le gène, ce qui représente un avantage de ces techniques.

TraSH (figure 11 b) est une technique qui combine la mutagenèse par transposon et l'hybridation sur biopuce (73). Cette technique permet ainsi d'analyser un large spectre de gènes et plusieurs conditions à la fois (67, 74). En premier lieu, il faut construire une banque de mutants du génome de la bactérie désirée. Cette banque va être soumise à une condition expérimentale et les bactéries possédant un gène muté essentiel ne pourront pas survivre. Donc, en comparant la banque de mutants de départ et les mutants qui ont subi la

condition testée, il sera possible d'identifier les gènes essentiels à l'aide de biopuces. Ainsi, un avantage de TraSH est qu'il permet d'analyser un large spectre de gènes simultanément sous une condition expérimentale testée. Par contre, cette technique est susceptible de donner de faux positifs et des faux négatifs (83) C'est pourquoi il faut valider la technique avec la mutation individuelle des gènes trouvés, pour ainsi tester ces mutants un à la fois et s'assurer que ces gènes sont effectivement essentiels.



**Figure 11 : Techniques de sélection négative**

Représentation schématique des techniques de sélection négative a) STM adapté de (26) et b) TraSH adapté de (67).

## 5.2.Sélection positive

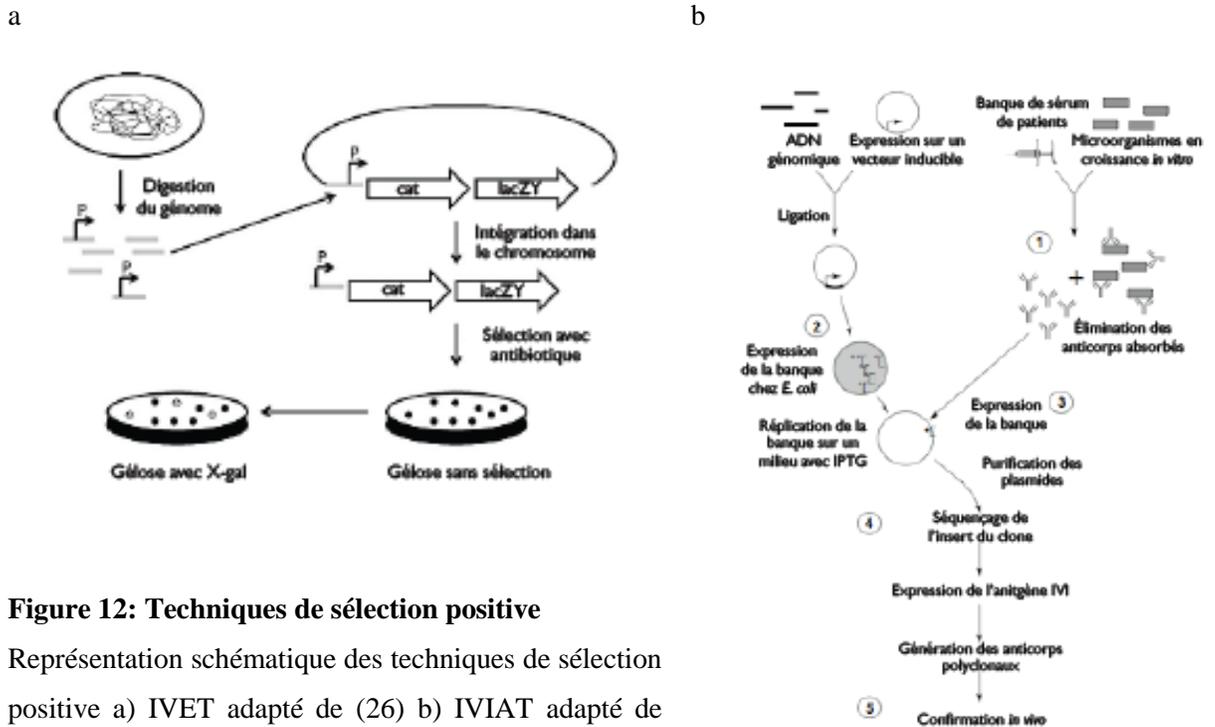
La sélection positive permet d'identifier les gènes ou des produits qui sont exprimés dans une condition donnée. Dans cette catégorie, il y a le *in vivo expression technology* (IVET), et la variante de ce dernier nommé *differential fluorescence induction* (DFI) et aussi le *in vivo induced antigen technology* (IVIAT).

Tout d'abord, la technique IVET permet d'identifier des promoteurs qui sont activés lors d'une infection. Les promoteurs sont insérés devant un gène essentiel à la survie, tel que la synthèse de purine (*purA*). Ainsi, si la bactérie survit c'est qu'elle possède un promoteur actif en condition *in vivo* (26, 43, 54, 71). Une lacune chez cette technique est qu'il n'est pas possible de sélectionner les promoteurs qui sont réprimés. De plus, la précision de la sélection va dépendra de la force de la sélection *in vitro* (66). La figure 12 représente les différentes étapes de la technique (26).

Cette technique a été modifiée pour ainsi mettre au point la technique DFI, qui permet de sélectionner les gènes qui sont induits durant une infection de cellules à l'aide d'un gène rapporteur codant une protéine verte fluorescente, la *green fluorescent protein* (GFP). Par la suite, à l'aide de l'intensité de la fluorescence, il y a sélection par le *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) (43, 80). Ainsi, il est possible d'analyser une grande population de bactéries et sélectionner les bactéries selon l'intensité de la fluorescence. Cependant, la

fluorescence de base et l'agrégation des bactéries peuvent causer des problèmes lors de l'analyse par FACS (66).

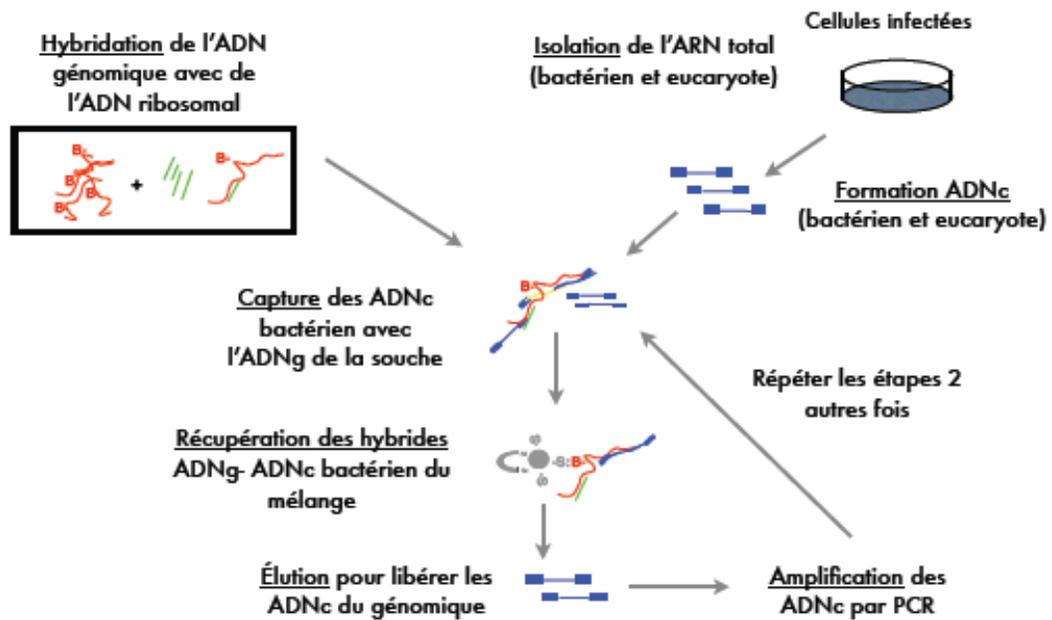
IVIAT est une technique tout à fait différente des deux autres puisqu'elle permet d'identifier des gènes qui sont exprimés durant une infection humaine à l'aide du sérum des patients infectés. Ainsi, il n'est pas nécessaire d'avoir de modèle animal pour étudier le microorganisme en question (38, 43). Tout d'abord, le génome de la bactérie est fragmenté et introduit en aval d'un promoteur au sein de plasmides. Par la suite, les plasmides sont exprimés dans *E.coli* pour ainsi avoir une bibliothèque du génome. Enfin, les anticorps du sérum sont utilisés pour sélectionner les gènes qui étaient exprimés durant l'infection. Cependant, afin que la technique fonctionne, le microorganisme doit induire une production d'anticorps (38). À la figure 12 b, les différentes étapes de cette technique sont représentées (38).



### 5.3. SCOTS

*Selective capture of transcribed sequences* (SCOTS) est une technique qui permet d'obtenir les gènes d'un microorganisme qui sont exprimés dans une condition testée. Ainsi, SCOTS peut être utilisé pour analyser l'expression des gènes de la bactérie à différents sites d'infection, mais aussi elle peut permettre de comparer le type sauvage et le mutant dans une condition spécifique (22).

Cette technique consiste à faire une banque d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN bactérien provenant d'une condition. L'ajout de séquences précises aux extrémités rend possible une amplification par PCR (*Polymerase chain reaction*) et la transformation en ADNc. À l'aide de l'ADN génomique (ADNg), il est possible de capturer les gènes bactériens exprimés dans la banque créée. La capture à l'aide de l'ADNg bloquer avec les gènes ribosomiaux permet d'augmenter la diversité des gènes et ainsi réduire la présence des gènes ribosomiaux. Après trois rondes de captures et d'amplifications, la diversité de gènes bactériens est à son maximum. Ainsi, il est possible d'obtenir les gènes qui sont exprimés dans la condition testée. La figure 13 représente les différentes étapes de la méthode (33). S'il y a comparaison avec une autre condition ou une autre bactérie, 3 nouvelles rondes de capture sont nécessaires pour enrichir l'ADNc spécifique. Lors de la capture, l'ADNg est bloqué avec les gènes exprimés durant la deuxième conditions ou avec l'ADNg de l'autre bactérie. Ainsi, les gènes qui sont exprimés dans les deux cas ne pourront pas être obtenus, puisqu'ils ne pourront pas être capturés (22).



**Figure 13 : SCOTS**

Représentation schématique de la technique SCOTS adapté de (33).

Un inconvénient d'une telle technique est qu'il n'est pas possible de quantifier l'expression des gènes exprimés. Étant donné la succession d'amplification par PCR et la normalisation (qui permet l'hybridation des fragments se trouvant en plus grand nombre), la quantification n'est pas possible. Cependant, la normalisation est un avantage, puisqu'elle permet d'aller chercher des fragments qui sont présents en plus faible quantité. Ainsi, un gène exprimé une fois a autant de chance d'être capturé qu'un gène exprimé dix fois.

## **Problématique et objectifs**

Les États-Unis ont beaucoup de problèmes avec le sérovar Choleraesuis qui infecte le porc et cause une maladie systémique, tandis qu'au Québec ce sérovar n'est pas retrouvé. Cependant, le Québec est dans une crise depuis quelques années, puisqu'il y a beaucoup de porcs qui meurent de maladie systémique. Toutefois, le sérovar retrouvé dans ces épidémies n'est pas le sérovar Choleraesuis, mais plutôt le sérovar Typhimurium, qui est normalement une bactérie commensale du porc. Ce qui peut être inquiétant pour nous, c'est que les souches commensales du porc peuvent causer une gastroentérite chez l'humain. Alors, du point de vue santé publique, il est important de se demander ce que ces nouvelles souches possèdent pour ainsi causer la mort chez les porcs. Aussi, si les souches commensales du porc causent la gastroentérite, qu'est-ce que ces souches septicémiques de porcs peuvent causer aux humains? L'hypothèse de départ est que la souche provenant de porc malade aurait acquis des gènes, lui permettant une plus grande virulence. Alors, les objectifs de ce projet sont de caractériser une souche provenant de porc malade et une souche provenant de porc sain, à l'aide d'infection de cellules épithéliales et de macrophages et de trouver les gènes qui sont exprimés dans une condition particulière à l'aide de la technique SCOTS.

# Matériels et méthodes

## 1. Caractérisation phénotypique de deux souches de Typhimurium

Ce projet de maîtrise porte principalement sur la caractérisation de deux souches de *Salmonella* Typhimurium (1003 et 4395). Ces deux souches proviennent de groupes d'isolats différents, qui renferment chacun 10 souches. Les deux souches ont été choisis pour leur différence lors de test effectué par Nadia Bergeron. Ainsi, c'est deux souches qui ont été choisies, qui permettaient de supposer une grande différence au niveau de leur potentiel infectieux. Le premier groupe renferme des souches provenant de porcs sains, tandis que le deuxième groupe est constitué de souches provenant de porcs souffrant d'une maladie systémique. Le tableau III et IV représente les souches de bactéries utilisées durant ma maîtrise, ainsi que les principales caractéristiques des 20 souches de Typhimurium provenant de porcs sains et malades. Que se soit les souches provenant de porcs sains ou malades, les bactéries sont retrouvées dans les fèces et les organes. Donc, leur localisation n'est pas un indice sur leur type de maladie. Par la suite, les deux groupes possèdent différents types de phage. Ainsi, il n'est pas possible d'associer un type phagique avec le potentiel de causer une maladie ou pas. La souche de Typhimurium 1003 est du type LT104, tandis que la souche de Typhimurium 4395 est LT35. De plus, la souche provenant de porc sain possède 12 résistances et la souche provenant de porc malade en possède 5. Alors, étant donné la grande diversité sur le type de phage et les résistances aux antibiotiques peut-être qu'il y a des différences au niveau du génome qui serait communes aux souches provenant de porcs malades.

**Tableau III** : Souches de Typhimurium provenant de porcs sains et de porcs malades.

Isolat	Source	Lysotype	Résistance aux antibiotiques
<b>Souches provenant de porcs sains</b>			
<b>1 (1003)</b>	<b>fèces</b>	<b>LT104</b>	<b>AMP, C, N, TE, K, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S</b>
2 (3829)	fèces	LT104	AMP, C, N, TE, K, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
3 (3607)	fèces	LT104	AMP, C, N, TE, K, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
4 (4628)	fèces	LT104	AMP, C, N, TE, K, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
6 (4180)	fèces	LT108	N, TE, K, E, DA, Q/D, B, VA, SUL
7 (506)	fèces	U302	AMP, C, N, TE, K, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
15 (403)	organes	LT193	TE, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
20 (1206)	fèces	LT104	AMP, C, N, TE, K, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
23 (3530)	fèces	NT	AMP, C, N, TE, K, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
<b>Souches provenant de porcs malades</b>			
34 (9479)	organes/fèces	LT104	AMP, C, N, TE, K, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
35 (E805A)	organes	LT104	AMP, C, TE, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
<b>36 (4395)</b>	<b>organes/fèces</b>	<b>LT35</b>	<b>E, DA, Q/D, B, VA</b>
37 (35)	organes	LT104	AMP, C, TE, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
38 (4390)	organes	LT27	APR, CN, TE, SXT, E, DA, Q/D, B, VA, SUL
39 (4391)	organes	LT27	APR, CN, TE, SXT, E, DA, Q/D, B, VA, SUL
40 (314)	fèces	LT104	AMP, C, N, TE, K, E, DA, Q/D, B, VA, SUL, S
47 (4394)	organes	LT186	APR, CN, TE, SXT, E, DA, Q/D, B, VA, SUL
48 (4396)	organes/fèces	NT	E, DA, Q/D, B, VA
49 (4397)	organes	LT27	E, DA, Q/D, B, VA

## Légende :

AMP ; Ampicilline	APR ; Apramycine	B ; Bacitracine	C ; Chloramphénicol
CN ; Gentamicine	DA ; Clindamycine	E ; Érythromycine	K ; Kanamycine
N ; Néomycine	Q/D ; Quinupristine/dalfopristine		S ; Streptomycine
SUL ; Sulfisoxazole	TE ; Tétracycline	VA ; Vancomycine	

\*Les souches 1 et 36 sont les souches principalement étudiées dans ce projet.

**Tableau IV** : Souches bactériennes et plasmides utilisés

Souches/plasmides	Génotype	Résistance et/ou utilisation	Référence
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( $\lambda$ pir)	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> $\lambda$ pir	Conjugaison	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Cellules compétentes	Invitrogen
<i>E. coli</i> ( $\chi$ 7213)	SM10 $\lambda$ pir <i>asd thi thr leu tonA lacY supE recA</i> RP4 2-Tc ::Mu[ $\lambda$ pir ] $\Delta$ <i>asdA4</i> F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> )	Conjugaison	(50)
<i>E. coli</i> (Top 10)	$\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> ( <i>StrR</i> ) <i>endA1 nupG</i>	Cellules compétentes	Invitrogen
<i>S. Typhimurium</i> ( $\chi$ 3339)	SL1344 <i>rpsL hisG</i> avec un passage murin	Contrôle	(35)
<i>S. Typhimurium</i> (1003)	Souche sauvage recueillie de porcs sains		(53)
<i>S. Typhimurium</i> (4395)	Souche sauvage recueillie de porcs malades		S. Messier
DEF495	4395 $\Delta$ <i>zur</i>		Cette étude
DEF497	4395 pWSK29/ <i>zur</i>	Ampicilline	Cette étude
DEF498	4395 $\Delta$ <i>zur</i> pWSK29/ <i>zur</i>	Ampicilline	Cette étude
pWSK29	Vecteur à faible copie	Ampicilline	(82)
pSIF131	pWSK29 <i>zur</i>	Ampicilline	Cette étude
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K</i>	Chloramphénicol, Vecteur suicide	Megan Health
pC6	Opéron <i>rrnB</i> d' <i>E. coli</i> dans pBR322	Ampicilline	C. Squires
pGEM-T	f1 ori <i>lacZ</i>	Ampicilline, TA Cloning	Promega

## **Test de sensibilité aux antibiotiques**

Les tests de résistance aux antibiotiques ont été effectués par Nadia Bergeron (5). Toutefois, certains antibiotiques ont été à nouveau testés pour une utilisation au niveau d'expérience génétique et de tests de virulence dans les cellules épithéliales et les macrophages. La croissance ou l'absence de croissance dans des bouillons (LB avec antibiotique d'une concentration entre 50 et 100  $\mu\text{g/mL}$ ) et sur gélose (LB agar avec antibiotique d'une concentration entre 50 et 100  $\mu\text{g/mL}$ ) a permis de déterminer si les souches sont sensibles ou résistantes.

## **Extraction de plasmides**

Une autre caractéristique vérifiée sur les deux souches de *Typhimurium* a été la présence de plasmides. La différence dans le nombre ou même dans la taille peut indiquer différents plasmides, qui apportent des éléments responsables des différences de phénotypes observés. De plus, l'extraction de plasmides en grande quantité est nécessaire pour la technique SCOTS, puisqu'il faut obtenir assez de matériel pour bloquer les sites ribosomiaux sur l'ADN. De plus, étant donné que les gènes des plasmides ne sont pas désirés, il faut extraire les plasmides de chaque souche et les bloquer lors du SCOTS. Ainsi, les chances d'obtenir

des gènes chromosomiques sont augmenté.

Les souches de Typhimurium (1003 et 4395) ont été incubées sous agitation toute la nuit dans 5 mL de LB. Par la suite, l'extraction des plasmides des souches 1003 et 4395 a été faite en suivant le protocole de mini-prep du manuel QIAGEN *Plasmid Purification*.

La souche *E. coli* contenant le plasmide pC6, qui contient les fragments d'ARN ribosomal (ARNr), a été incubée toute la nuit dans 300 mL de LB avec ampicilline (50 µg/mL) sous agitation. Par la suite, l'extraction du plasmide a été faite en suivant le protocole de midi-prep pour faible copie du manuel QIAGEN *Plasmid Purification*.

### **Test d'adhésion et d'invasion**

Tout d'abord, les souches de Typhimurium isolées de porc ont été caractérisées selon différentes approches. Le test d'adhésion et d'invasion a donc permis d'observer une des premières étapes de l'infection avec l'interaction des bactéries et des cellules épithéliales.

Les cellules épithéliales HeLa (ATCC #CCL-2) ont été mises en culture dans du DMEM (*Dubelcco's modified eagle's medium*). Ce milieu était complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé à la chaleur, 25 mM de N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acide (HEPES) à pH 7 et 4 mM L-glutamine. Les cellules ont été réparties

dans une plaque de 24 puits, à une concentration de  $2 \times 10^5$  cellules par puits. Les cellules ont été maintenues à 37 °C, sous une atmosphère de 5 % CO<sub>2</sub>, pendant 24 heures avant d'être utilisées. Les souches de Typhimurium (1003 et 4395) ont été incubées à 37 °C pendant environ 18 heures, sans agitation dans du LB-NaCl 0,3 M. Les cellules ont été infectées avec une multiplicité d'infection (MOI) de 20 : 1. Par la suite, la plaque a été centrifugée 5 minutes à 800 g, pour synchroniser l'adhérence aux cellules (T0). Après 90 minutes d'incubation (T90) à 37 °C dans une atmosphère de 5 % CO<sub>2</sub>, les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) (chlorure de sodium à 8 g/L, phosphate de potassium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) à 0.2 g/L, phosphate d'ammonium à 2.17 g/L et chlorure de potassium à 0.2 g/L à pH 7.4) qui a été préalablement chauffé à 37 °C. Les lavages permettent d'éliminer les bactéries qui n'ont pas adhéré aux cellules. Les puits servant à l'invasion ont été remplis de DMEM supplémenté contenant 100 µg/mL de gentamicine (37 °C) et incubés pendant 90 minutes (T180). Les cellules ont été lysées avec du PBS supplémenté d'acide deoxycholique à 0.1% (PBS-DOC) et le contenu a été récupéré dans un microtube. Le décompte des unités formatrices de colonies (UFC) a été fait pour la culture de départ, le T90 et le T180. Le taux d'adhésion et le taux d'invasion ont été calculés en fonction de l'UFC initiale. Le taux d'adhésion correspond au nombre de bactéries présentes au T90 divisé par le nombre de bactéries initialement inoculées dans les puits. Le taux d'invasion correspond au nombre de bactéries présentes au T180 divisé par le nombre de bactéries lors de l'inoculation. De plus, le taux d'invasion peut être divisé par le

taux d'adhésion (Taux d'adhésion = UFC T90/UFC initiale, taux d'invasion = UFC T180/UFC initiale et taux d'invasion/adhésion = UFC T180/ UFC T90).

### **Test de l'activité cytotoxique**

Le test de cytotoxicité permet de déterminer si les différences perçues entre les deux souches au niveau des cellules épithéliales sont dues au fait que l'une d'elles est plus cytotoxique que l'autre. Si c'est le cas, les bactéries qui sortent des cellules épithéliales se retrouvent dans le milieu de culture en contact avec l'antibiotique. Dans ce cas, la diminution du nombre de bactéries est due au fait que les bactéries sont tuées par la gentamicine.

Les tests de cytotoxicité ont été faits avec la trousse de détection « Cyto Tox 96 » (Promega). Lors d'une infection, les surnageants ont été récupérés et conservés à 37 °C. Les échantillons ont été distribués dans une plaque 96 puits, 50 µl dans chaque puits en triplicata. Suite à l'ajout 50 µl de substrat, la plaque a été incubée 30 minutes à température ambiante dans le noir. Par la suite, 50 µl de solution-stop a été ajouté. La lecture s'effectue à 490 nm avec un spectrophotomètre (Bio-Tek ELX800). À l'aide des données obtenues, il est possible de calculer le pourcentage de mort cellulaire associé à chacune des souches bactériennes testées. Le pourcentage de mort cellulaire causé par les souches bactériennes est calculé en fonction de la lyse normale des cellules (lyse minimale) et de la lyse

maximale : Taux de cytotoxicité =  $(D.O_{420nm}$  du surnageant – lyse minimale)/(lyse maximale – lyse minimale) \*100.

### **Coloration au Giemsa**

Il est toujours intéressant d'observer l'interaction entre les cellules et les bactéries. Alors, la coloration au Giemsa a permis de voir la relation directe entre les cellules épithéliales HeLa et les deux souches de Typhimurium.

Une lamelle a été placée dans le fond du puits avant d'ajouter les cellules, qui ont ensuite été infectées telles que décrites plus haut. Après le dernier lavage au PBS 1x, les cellules ont été fixées par l'ajout de méthanol 50 % (dilué dans de l'eau stérile) et la plaque a été incubée pendant 15 minutes. Par la suite, du méthanol 100 % a été ajouté pendant 5 minutes aux puits et les lamelles ont été séchées pendant 10 minutes dans la hotte. Par la suite, du Giemsa dilué 1:5 a été ajouté et laissé pendant 40 minutes. Une fois la coloration finie, les puits ont été rincés à l'eau stérile et séchés à l'obscurité pendant 24 heures. Pour la visualisation des lamelles au microscope, un liquide de montage (*Geltol Mounting Medium*) a été ajouté sur une lame prélavée avec éthanol 70 % et la lamelle avec les cellules a été collée du côté des cellules. La polymérisation du Geltol a pris 24 heures à 48 heures.

## **Test de survie dans les macrophages humains**

Après l'interaction avec les cellules épithéliales, les prochaines cellules qui rentrent en contact avec les bactéries sont les macrophages. Donc, le test de survie dans les macrophages humains permet de connaître s'il y a une différence au niveau de la survie pour les souches de Typhimurium. Ainsi, il est possible de voir si la survie dans les macrophages est une étape importante pour la souche septicémique.

Les monocytes humains THP-1 (ATCC #TIB-202) ont été mis en culture dans du RPMI supplémenté contenant de HEPES, 4 mM L-glutamine, 10 % de sérum de veau fœtal, 0.1 mM d'acides aminés non essentiels et 1 mM de sodium pyruvate. Les monocytes humains THP-1 ont été différenciés en macrophages à l'aide du phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) dans une plaque pendant 48 heures avant d'être infectés. Chaque puits contenait  $5 \times 10^5$  macrophages. Les souches de Typhimurium (1003 et 4395) ont été incubées à 37 °C pour 18 heures sans agitation en LB, jusqu'à l'atteinte d'une densité optique à 600 nm de 0.6 ( $6 \times 10^8$  CFU/ml). Les souches de Typhimurium ont ensuite été ajoutées à la monocouche de cellules THP-1 à une MOI de 10 bactéries par monocyte. Par la suite, la plaque a été centrifugée 5 minutes pour synchroniser la phagocytose et incubée 20 minutes à 37 °C, sous atmosphère de 5 % CO<sub>2</sub>. Après l'incubation (T0), le surnageant a été enlevé et les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS 1X à 37 °C. Pour les puits servant au temps 2 heures, 1 mL de RPMI supplémenté contenant 100 µg/mL de gentamicine (37 °C) a été ajouté pour tuer les bactéries extracellulaires. Pour les puits du temps 0, 1 mL de PBS-DOC

0,1 % a été ajouté pour permettre la lyse des cellules et le contenu a été récupéré. La plaque a été incubée pour 2 heures à 37 °C sous atmosphère 5 % CO<sub>2</sub>. Une fois l'incubation terminée (T2), les puits ont été lavés, lysés et le contenu a été récupéré comme au temps 0. Pour les puits servant au temps 24 heures, 1 mL de RPMI supplémenté contenant 12 µg/mL de gentamicine (37 °C) a été ajouté. La plaque a été incubée pour 22 heures à 37 °C sous atmosphère 5 % CO<sub>2</sub>. Une fois l'incubation terminée (T24), les puits ont été lavés, lysés et le contenu a été récupéré comme au temps 0 et 2. Le décompte des UFC a été fait pour la culture de départ, le T0, le T2 et le T24. Le taux de phagocytose correspond au nombre de bactéries présentes au T0 divisé par le nombre de bactéries initialement inoculées dans les puits. Le taux de survie à 2 heures et 24 heures correspond au nombre de bactéries présentes au T2 ou T24 divisé par le nombre de bactéries présentes au T0 (Taux de phagocytose = UFC T0/UFC initiale et taux de survie = UFC T2 ou T24/UFC T0).

## **2. Caractérisation géotypique responsable de la différence phénotypique**

Une fois que la caractérisation au niveau des cellules épithéliales et des macrophages est faite, il est possible d'aller chercher les gènes qui sont exprimés dans les cellules à l'aide de

la technique de *Selective Capture of Transcribed Sequences* (SCOTS). Cette technique comprend plusieurs étapes pour obtenir à la toute fin les gènes qui sont exprimés dans une condition précise et spécifique à une souche.

Alors, avant de commencer SCOTS, il faut préparer le matériel de départ. Tout d'abord, il faut extraire une grande quantité de plasmides qui contiennent les gènes d'ARNr et les plasmides des souches (voir section 1.2). Aussi, il faut extraire l'ADN génomique (ADNg). La combinaison de l'ADNg, l'ADN ribosomal (ADNr) et les plasmides vont constituer la base pour capturer les gènes exprimés.

### **Extraction génomique**

Les souches de Typhimurium (1003 et 4395) provenant d'une incubation de 20 heures sous agitation à 37 °C dans 5 mL de LB ont été centrifugées 5 minutes à 8000 rpm. Par la suite, le culot a été resuspendu dans 50 µl de Tris-EDTA pH 7,4 et lysé avec 200 µl de tampon de lyse (Tris-Cl 50 mM pH7,4, NaCl 0,3 M, SDS 1 % et EDTA 10 mM). Après une incubation de 5 minutes à 37 °C, 10 µl de protéinase K 20 mg/mL a été ajouté et le tout a été incubé à 65 °C pendant 30 minutes. Par la suite, une succession d'extraction au phénol, au phénol-chloroforme-isoamylalcohol 25 : 24 : 1 et au chloroforme a permis de déprotéiner la suspension d'ADN. Finalement, l'ajout d'éthanol 100 % et une incubation toute la nuit à -20 °C, a permis de précipiter l'ADNg. S'il y a présence d'ARN, il est

possible de le dégrader avec 1  $\mu\text{l}$  de l'enzyme Ribonucléase 10 U/ $\mu\text{l}$  (Promega) et une incubation de 30 minutes à 37 °C.

Une fois que l'ADNg et les plasmides sont extraits (voir section 1.2), il est possible de faire la suite des manipulations. Tout d'abord, il faut préparer le mélange qui va permettre de capturer les gènes exprimés.

### **Photobiotinylation**

La solution de photobiotine acétate (Sigma A1935) doit être à une concentration finale de 1 mg/ml avec de l'eau stérile. Ensuite, une quantité d'ADNg (0,3  $\mu\text{g}$ /réaction) et une quantité égale de biotine ont été mis dans un tube PCR, qui a été incubé pendant 20 minutes dans de la glace sous une source lumineuse (250W). Le tube doit être tourné souvent pour ne pas surchauffer. Par la suite, un volume identique de biotine doit être ajouté et le tube est éclairé de nouveau. Ensuite, il y a eu ajout de 10 fois le volume de Tris-Cl/EDTA pH 9 et 200  $\mu\text{l}$  d'isobutanol saturé d'eau, suivie de multiples lavages, qui permettent d'enlever la biotine non fixée. Finalement, par réaction, environ 5  $\mu\text{g}$  d'ADNr et 5  $\mu\text{g}$  de plasmide de la souche ont été ajoutés à l'ADNg et le tout a été fragmenté au sonicateur. Le mélange a été séparé en plus petits volumes et précipité avec 1/10 d'acétate de sodium 3 M et 2,5 fois d'éthanol 100 %. Lors d'un SCOTS où il faut comparer des souches, il y a des étapes d'enrichissement. Dans ce cas, l'ajout d'environ 3  $\mu\text{g}$  par réaction d'ADNg de l'autre

souche est nécessaire et est ajouté au mélange (ADNg, ADNr et plasmides). Toutefois, l'ADNg doit être soniqué avant d'être intégré au mélange.

Par la suite, il faut collecter le matériel qui sera capturé. Cela provient d'une extraction d'ARN d'une infection de cellules épithéliales HeLa qui a été infecté avec les souches 4395 et 1003. Après l'extraction, l'ARN doit être transformé en ADN complémentaire (ADNc).

### **Extraction d'ARN**

L'ARN provient de cellules infectées conservées dans le Trizol à -80 °C. La solution a été dégelée à température ambiante. Par la suite, il y a eu ajout de 200 µl de chloroforme, un mélange vigoureux et le tout a été laissé au repos à température ambiante pour 2 minutes. Ensuite, il y a eu centrifugation pour séparer le chloroforme de l'ARN qui se retrouve dans la partie transparente du mélange. Cette partie aqueuse a été transférée dans un nouveau tube (RNase free) pour lui ajouter de l'isopropyl alcool. Après une incubation toute la nuit à -20°C, l'ARN a été précipité, lavé et resuspendu dans de l'eau diéthyle pyrocarbonate (DEPC). Cette eau est dépourvue de contaminants qui pourraient détruire l'ARN extrait.

## **Formation de l'ADNc**

Une incubation de 10 minutes à 70 °C, de 40 pmol d'amorce RBI-RNA avec 5 µg d'ARN, permet d'ajouter une séquence 5' CGG GAT CCA GCT TCT CAC GCA NNN NNN NNN 3' sur chaque fragment d'ARN. C'est la suite de 9 N qui permet de capturer tous les fragments puisqu'il s'agit de nucléotides aléatoires pouvant se lier à toutes les séquences d'ARN présentes dans le mélange. Par la suite, le premier brin d'ADNc a été formé avec la reverse transcriptase. Ensuite, le deuxième brin d'ADNc a été synthétisé avec la polymérase. Finalement, les fragments ont été purifiés en suivant le protocole du manuel QIAGEN pour purification de produits PCR.

Les principales étapes de la technique SCOTS sont la normalisation et la capture. La première étape (la normalisation) permet de réduire le nombre de fragments identiques en leur permettant de s'hybrider ensemble. Ainsi, les fragments qui se trouvent en plus faibles copies peuvent être capturés dans l'étape suivante. La deuxième étape (la capture) permet d'aller chercher de façon spécifique les fragments d'ADNc bactérien, à l'aide de l'ADNg. Une succession de normalisation et de capture permet d'aller chercher une grande diversité de gènes. Trois rondes de normalisation et de capture sont nécessaires pour récolter un maximum de gènes. Toutefois, lorsqu'il y a comparaison avec une autre souche, comme dans ce cas-ci, il est nécessaire de faire trois rondes de plus, avec de l'ADNg hybridé avec l'ADNg de l'autre souche. Ces trois rondes supplémentaires permettent d'éliminer les

gènes communs aux deux souches, puisque les sites des gènes communs sont occupés par l'ADNg préhybridé.

### **Normalisation**

Les fragments d'ADNc (350 ng) et l'ADNg photobiotinylés ont été lavés, récupérés et resuspendus dans 5 µl de tampon d'hybridation (Dig Easy Hyb Granules Roche). Chacun a été incubé individuellement à 68 °C pendant 10 minutes, pour permettre aux brins d'ADNc de se séparer. Ensuite, les tubes ont été incubés pour 30 minutes à 42 °C pour que les brins qui se trouvent en plus grand nombre s'hybrident ensemble. Ensuite, le tube d'ADNc a été combiné avec le tube d'ADNg photobiotinylé pour permettre l'hybridation entre les fragments d'ADNc bactériens et l'ADNg. Le mélange a été incubé entre 17 et 24 heures à 42 °C pour avoir toutes les chances de capturer le plus grand nombre de fragments possibles.

### **Capture**

Les billes magnétiques de streptavidine (Promega) utilisées pour récupérer l'ADNg/ADNc ont été lavées dans un tampon de lavage (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA et 2 M NaCl) et resuspendues dans le même tampon concentré 2 fois. Par la suite, l'ADNc/ADNg a été

incubé 10 minutes à 37 °C avec les billes. Ce temps permet à l'ADN photobiotinylé de s'hybrider à la streptavidine des billes magnétiques et ainsi les hybrides peuvent être récupérés à l'aide d'un support magnétique. Ensuite, le mélange a été lavé trois fois avec un tampon de lavage (20 mM NaCl et 0,1 % SDS) préchauffé à 60 °C. Finalement, l'ADNc/ADNg a été élué avec du NaOH 0,4 N et précipité avec de l'éthanol, de l'acétate de sodium 3M et du glycogène toute la nuit à -20°C.

## **PCR**

Après la capture, le nombre de fragments est très faible. C'est pourquoi il faut faire une amplification par PCR. Cette amplification est spécifique aux fragments ADNc qui ont reçu la séquence RBI.

L'amplification des fragments d'ADNc bactériens a été réalisée selon les instructions du protocole de Feldan. L'hybridation des amorces avec les fragments a été faite à 60 °C pour 60 secondes, tandis que l'élongation a été faite à 72 °C pour 60 secondes. Le PCR compte 25 cycles au total.

Après les captures, le moyen de vérifier la diversité des fragments est le Southern Blot. Tout d'abord, l'ADNg est fragmenté par une digestion enzymatique (PSTI). Par la suite, le tout est migré sur un gel d'agarose et finalement transféré sur une membrane de nylon.

Ainsi, la membrane est découpée en bandelettes qui sont utilisées pour voir si les fragments capturés se retrouvent sur le génome en entier ou seulement sur certaines parties. Après le Southern Blot, une banque avec les fragments bactériens trouvés doit être construite. Par la suite, à l'aide de Dot Blot, il est possible de voir si ceux-ci appartiennent seulement à une des deux souches. Ainsi, à l'aide de l'intensité des taches, il est possible d'avoir une idée générale sur plusieurs clones à la fois.

### **Southern et Dot Blot**

Pour faire le Southern et le Dot Blot, le manuel d'instruction de « DIG high prime DNA labeling and detection starter kit II », de Roche version 1 avril 2000 a été suivi.

Pour faire le Dot Blot, il faut tout d'abord cloner tous les fragments obtenus suite aux 6 rondes de SCOTS et les introduire dans un vecteur. Une fois dans le vecteur, celui-ci a été introduit dans une souche bactérienne pour ainsi créer une banque.

### **Clonage**

Tout d'abord, les fragments d'ADNc bactérien provenant de la dernière capture ont été introduits dans le plasmide pGEM (pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems,

Promega) selon le protocole du fabricant.

### **Transformation chimique**

Par la suite, le plasmide a été introduit par transformation chimique dans des cellules compétentes Top10 (One shot TOP10 competent cells, Invitrogen) selon le protocole du fabricant. Les géloses ont été supplémentées d'IPTG (200 mg/mL), Xgal (20 mg/mL) et de carbénicilline (50 mg/mL) pour sélectionner les bons clones.

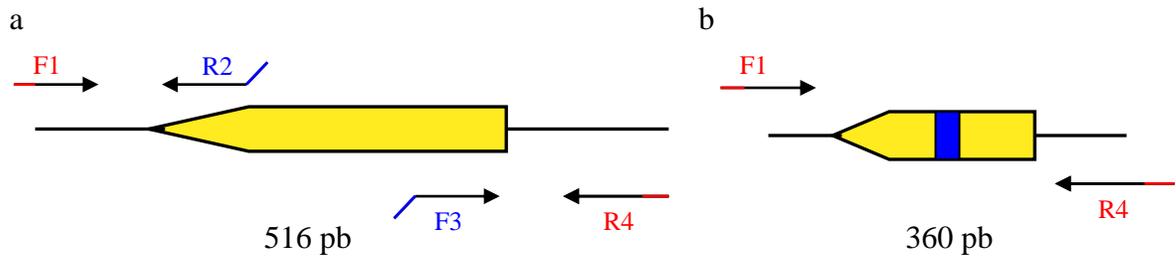
### **Séquençage et analyse des données bio-informatiques**

L'insertion des fragments dans le plasmide a aussi été vérifiée par PCR, à l'aide des amorces SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAGAA 3') et T7 (5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3') qui sont les séquences bordant l'endroit de l'insertion. Ainsi, les amplicons de différentes tailles ont été purifiés et testés par Dot blot. Finalement, ceux qui possédaient les caractéristiques désirées ont été envoyés à séquencer.

Les fragments d'ADN ont été séquencés à l'IRC en utilisant l'amorce SP6. De cette façon, chacun des clones a pu être identifié par le programme informatique BLAST sur le site internet du « National Center for Biotechnology Information » ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)).

### **3. Mutagenèse et caractérisation du gène *zur***

Le gène *zur* est le répresseur du système *znuABC*, qui est impliqué dans le transport du zinc (9, 60, 84). Une fois le gène *zur* identifié par séquençage, celui-ci a été amplifié par PCR (protocole PCR) selon différentes amorces que nous avons construites pour permettre de muter le gène. La figure 14 a est la représentation du gène *zur* avec les amorces utilisées. Les extrémités rouges des amorces F1 et R4 sont des sites de digestion pour les enzymes BamHI et XbaI. Les sites en bleus sur les amorces R2 et F3 sont l'ajout de 8 nucléotides, qui permettent une hybridation entre les deux amorces. Une première amplification par PCR a été faite avec les amorces F1/R2 et F3/R4. À partir des fragments obtenus du premier PCR, un deuxième PCR a été fait avec les amorces F1/R4. Grâce à l'hybridation des séquences du milieu (en bleus), on obtient le gène tronqué (b). Par la suite, le gène muté a été introduit sur un plasmide (voir section 3.1) et introduit par électroporation dans des cellules compétentes (voir section 3.4). Finalement, par conjugaison (voir section 3.3), le plasmide suicide portant le gène muté a été introduit dans la souche de départ et par échange allélique le gène de type sauvage a été muté.



**Figure 14: Représentations du gène et des amorces**

Représentations du gène *zur* et des amorces utilisées pour la mutagenèse du gène *zur* a) gène sauvage  
b) gène muté.

### Construction d'un allèle mutant

Après amplification, le gène *zur* muté et le plasmide pMEG375 ont été digérés par des enzymes de restriction (BamHI et XbaI). Cette digestion de 2 heures à 37 °C permet de rendre les extrémités cohésives. Par la suite, *zur* et pMEG375 ont été incubés ensemble toute la nuit à 16 °C avec la ligase T4 d'ADN (40 U/μl) (NEB), qui permet de les associer et de créer le plasmide pMEG/Δ*zur*.

### Transformation chimique

Par la suite, le plasmide pMEG/Δ*zur* a été introduit par transformation chimique dans des cellules compétentes d'*E. coli* (χ7213) selon le même protocole de la section 2.10. DL-α,ε-

*diaminopimelic acid* (DAP) (50mg/mL) et chloramphénicol (50 mg/mL) sont les sélections utilisées.

### **Conjugaison**

*E. coli* ( $\chi$ 7213) contenant le plasmide  $\Delta$ zur et la souche de Typhimurium 4395 ont été poussées toute la nuit sans agitation à 37 °C dans du LB avec les sélections nécessaires (DAP et chloramphénicol pour  $\chi$ 7213). Au centre d'une gélose DAP, il a été déposé 400  $\mu$ L d'*E. coli* (donneur) et 100  $\mu$ L de la souche 4395 (receveur) pour incubation de 4 à 6 heures à 37 °C. Après l'incubation, une bouclée du mélange a été prise pour faire des dilutions jusqu'à  $10^{-3}$  et 100  $\mu$ L de chacune de ces dilutions a été étendu sur gélose LB avec chloramphénicol. Finalement, après une incubation toute la nuit à 37 °C, les colonies maintenant chloramphénicol résistante ont été repiquées et quelques-unes ont été choisies pour poussées dans 5 mL de LB 4 à 6 heures à 37 °C sans sélection. Ainsi, il peut y avoir réarrangement allélique et le gène muté peut prendre la place du gène sauvage. Ainsi, il y a crossover double et la mutation est vérifiée par PCR en observant la taille du gène amplifié.

## **Cellules électrocompétentes et électrotransformation**

La complémentation de la souche de Typhimurium 4395 mutant pour le gène *zur* est faite en ajoutant le plasmide pWSK29/*zur*, qui contient le gène complet (section 3.1).

Un bouillon LB a été inoculé avec une dilution de 1 : 50 à partir d'une culture de Typhimurium 4395 (souche sauvage et mutante *zur*), qui a poussé toute la nuit et croît pendant 2 heures sous agitation à 37 °C. Avant d'être utilisées, les bactéries doivent refroidir sur glace. Une succession de centrifugation a permis de culotter les bactéries et de les laver. Le culot a été resuspendu dans 40 µl de glycérol 10 % et 2 µl du plasmide pWSK29/*zur* ont été ajoutés. Finalement, le plasmide a été introduit dans les souches de Typhimurium par électroporation et selon la résistance à l'ampicilline, il y a eu sélection.

Les étapes suivantes sont pour caractériser le gène et voir s'il y a une différence au niveau des infections des cellules épithéliales et dans les macrophages.

## **Courbe de croissance**

Tout d'abord, la croissance de la souche mutante a été comparée avec la croissance de la souche sauvage pour ainsi pouvoir faire les autres tests par la suite.

À partir d'une dilution 1 dans 5 d'une culture des souches de Typhimurium, qui a poussé toute la nuit, la densité optique a été observée chaque heure par spectrophotomètre pour établir la courbe de croissance des deux souches (type sauvage et mutante pour *zur*).

### **Test de sensibilité au peroxyde d'hydrogène**

Les souches de Typhimurium, le type sauvage (4395), le mutant *zur*, la souche complémentée avec le plasmide pWSK29/*zur* et la souche sauvage avec le plasmide pWSK29/*zur* ont été inoculées dans un bouillon LB et incubées toute la nuit à 37 °C sous agitation. À partir de ces cultures, une dilution 1 dans 100 a été faite et mise sous agitation pour 2 heures à 37 °C. Ainsi, une série de cultures était en phase stationnaire et une autre série était en phase exponentielle. À l'aide des bouillons, des géloses ont étéensemencées de façon à avoir un tapis complet de bactéries. Par la suite, un disque de peroxyde d'hydrogène 3 % a été déposé au centre de la gélose. Finalement, les géloses ont été incubées toute la nuit à 30 °C et un diamètre d'inhibition a été observé selon la sensibilité des souches (31).

## **Test d'adhésion et d'invasion et test de survie dans les macrophages humains**

Les infections de cellules épithéliales HeLa et de macrophages humains THP-1 ont été faites selon les protocoles décrits à la section 1.3 et 1.6 en utilisant la souche sauvage, la souche mutante *zur*, ainsi que la souche mutante qui a été complémentée pour le gène *zur* avec le plasmide pWSK29/*zur* et la souche de type sauvage qui surexprime le gène *zur* avec le plasmide pWSK29/*zur*.

# Résultats

## 1. Caractérisation phénotypique de souches de Typhimurium

La caractérisation phénotypique des 2 souches de Typhimurium (4395 et 1003) permet de connaître plusieurs éléments importants tels que le profil de résistance aux antibiotiques, la présence de plasmide et l'interaction avec les cellules épithéliales et les macrophages humains.

### 1.1. Résistance aux antibiotiques des 2 souches de Typhimurium

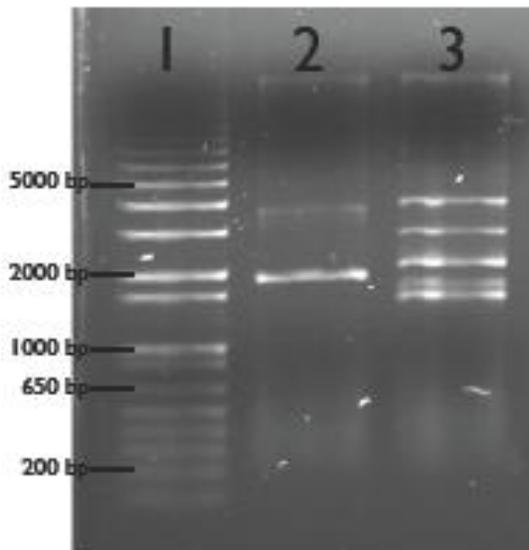
Les souches multirésistantes causent beaucoup de problèmes dans les domaines alimentaires et hospitaliers. La caractérisation de la résistance aux antibiotiques des deux souches de Typhimurium (1003 et 4395) a été faite par Nadia Bergeron (5). Toutefois, les antibiotiques utilisés tout au long du projet ont été refaits par précaution (tableau V). La souche de Typhimurium 4395 est sensible à tous les antibiotiques testés, tandis que la souche 1003 est résistante à l'ampicilline, le chloramphénicol, la kanamycine et la tétracycline.

**Tableau V** : Profil de résistance aux antibiotiques des 2 souches de Typhimurium 4395 et 1003.

Antibiotiques	4395	1003
Ampicilline (100 µg/mL)	Sensible	Résistant
Chloramphénicol (50 µg/mL)	Sensible	Résistant
Gentamicine (50 µg/mL)	Sensible	Sensible
Kanamycine (50 µg/mL)	Sensible	Résistant
Polymixine B (50 µg/mL)	Sensible	Sensible
Tétracycline (50 µg/mL)	Sensible	Résistant
Trimetoprim (50 µg/mL)	Sensible	Sensible

## 1.2.Profil plasmidique

Le profil plasmidique de chacune des souches de Typhimurium a été obtenu par l'extraction plasmidique (figure 15). Il a été démontré que la souche de Typhimurium 1003 possède 2 plasmides, tandis que la souche 4395 en possède 4 (une différente dans la conformation du dernier plasmide fait que deux bandes sont présentes). Toutefois, l'absence de bande de haut poids moléculaire indique qu'aucune des deux souches ne possède le plasmide de virulence.



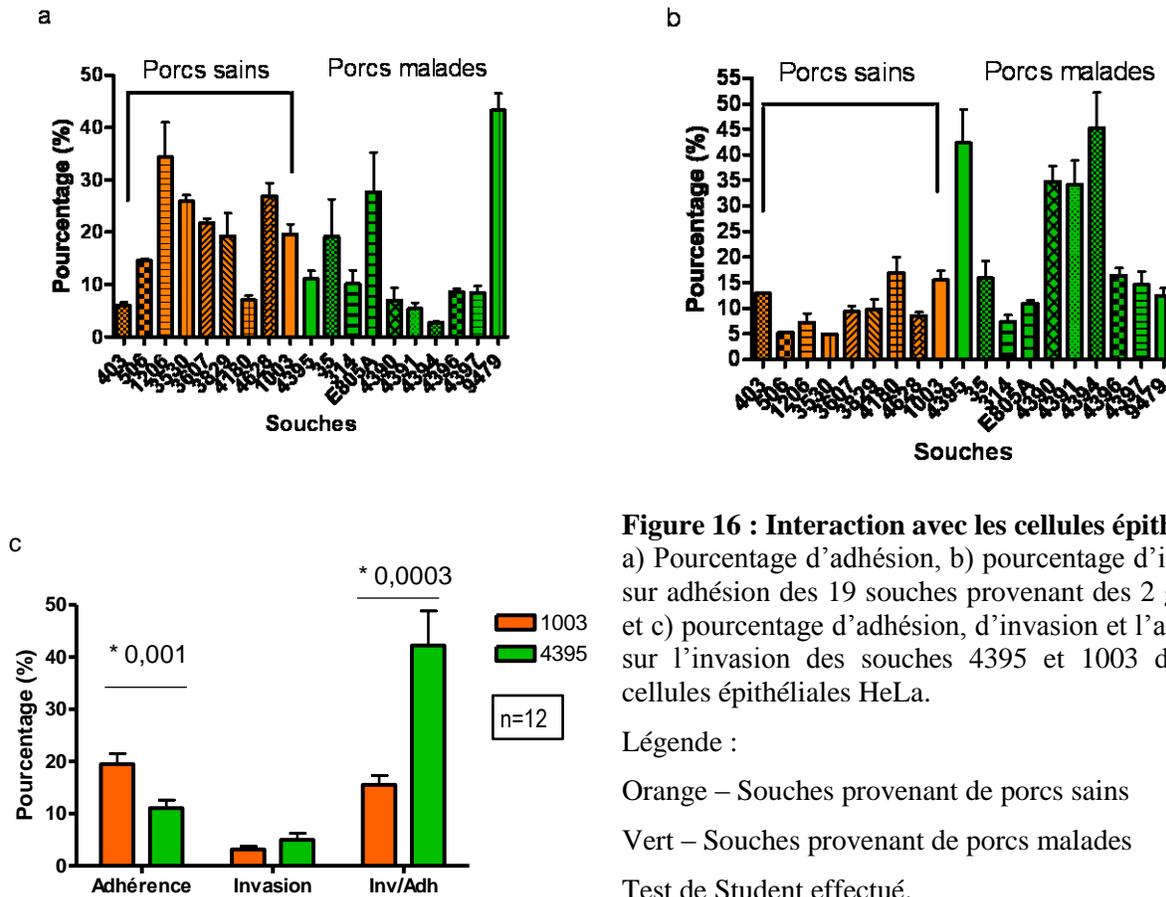
**Figure 15 : Plasmides des souches de Typhimurium.**

Photo de gel d'agarose 0,7 % de l'extraction de plasmides.

Légende :      1 – Marqueur (1Kb plus)      2 – Plasmides 1003      3 – Plasmides 4395

### **1.3. Test d'adhésion et d'invasion avec les cellules épithéliales HeLa**

Les cellules épithéliales humaines (HeLa) permettent d'observer les premières étapes d'une infection par des bactéries, soit l'adhésion. Par la suite, les bactéries vont envahir les cellules à l'aide du SST3 du SPI1. Ainsi, une différence dans l'adhérence ou l'invasion pourrait expliquer le contraste de maladie causée par les deux types de souches. Cependant, il n'est pas possible d'observer un profil spécifique, mais de façon général l'adhésion est plus élevée chez les souches de porcs sains (figure 16 a) et l'invasion sur l'adhérence semble plus élevée chez les souches provenant de porcs malades (figure 16 b). Toutefois, lorsque les deux souches à caractériser (1003 et 4395) sont isolées, on observe que la souche provenant de porc sain (1003) adhère davantage que la souche provenant de porc malade (4395). Pour l'invasion, la souche 4395 possède un pouvoir d'invasion sur adhérence plus élevé que pour la souche 1003 (figure 16 c).



**Figure 16 : Interaction avec les cellules épithéliales**  
 a) Pourcentage d'adhésion, b) pourcentage d'invasion sur adhésion des 19 souches provenant des 2 groupes et c) pourcentage d'adhésion, d'invasion et l'adhésion sur l'invasion des souches 4395 et 1003 dans les cellules épithéliales HeLa.

Légende :

Orange – Souches provenant de porcs sains

Vert – Souches provenant de porcs malades

Test de Student effectué.

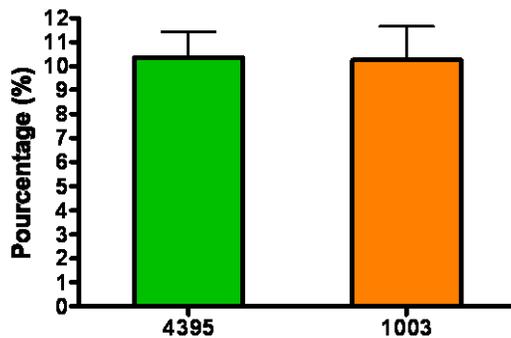
Toutes ces infections ont été faites durant cette maîtrise.

#### 1.4. Cytotoxicité des deux souches de Typhimurium

Lorsqu'une souche possède un pouvoir d'invasion supérieur à une autre souche, parfois le phénomène qui se produit est que la souche moins invasive est seulement plus cytotoxique.

Ainsi, la souche paraît moins invasive, mais c'est parce qu'elle se retrouve dans le milieu

de culture en lysant les cellules et ainsi l'antibiotique ne lui permet pas de survivre. Toutefois, ce n'est pas le cas des deux souches de Typhimurium (1003 et 4395), puisque les deux possèdent un même niveau de cytotoxicité qui n'est pas élevé (figure 17).



**Figure 17 : Cytotoxicité des souches de Typhimurium**

Pourcentages de cytotoxicité des deux souches de Typhimurium 4395 et 1003 dans les cellules épithéliales au temps 180 minutes.

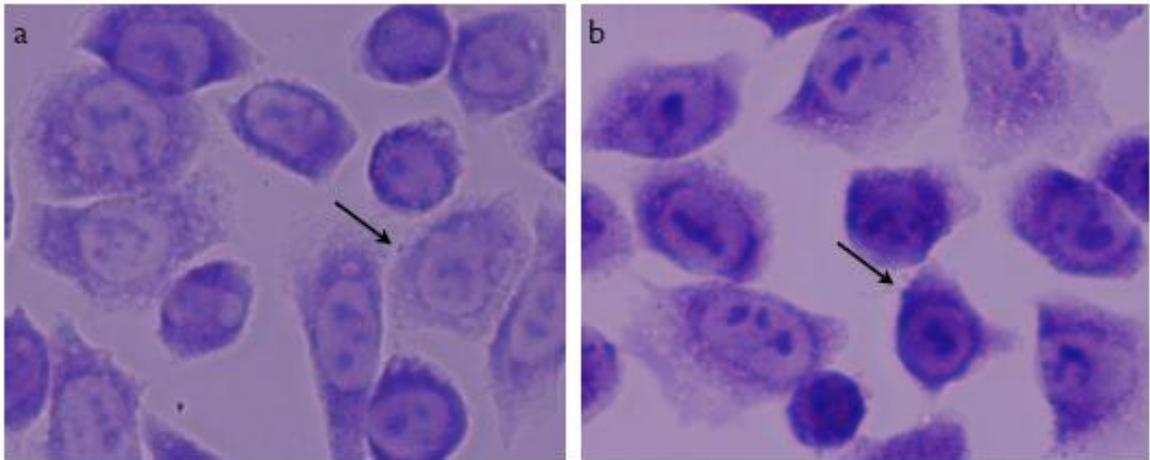
Légende :

Orange – Souche provenant de porc sain

Vert – Souche provenant de porc malade

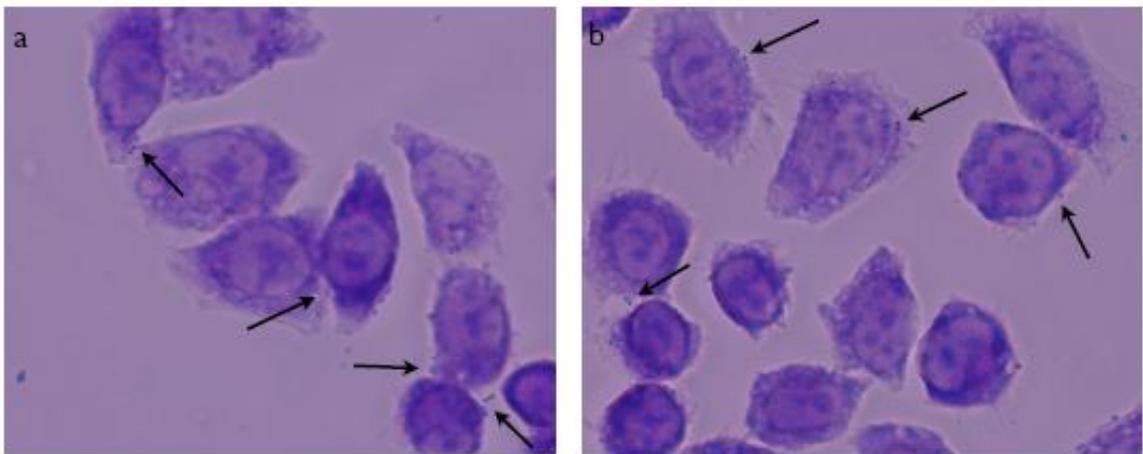
### 1.5.Observation microscopique de l'adhésion des bactéries

L'utilisation du microscope permet d'observer les résultats d'adhérence. Les premières images sont la souche de Typhimurium 4395 au temps 90 minutes (figure 18). Il est possible d'observer deux bactéries qui sont collées à la paroi des cellules. Les images suivantes (figure 19) sont la souche de Typhimurium 1003 au temps 90 minutes. Cette fois-ci, on observe beaucoup de bactéries collées aux parois des cellules. De plus, pour les deux souches, les cellules semblent en pleine forme.



**Figure 18 : Interaction de la souche 4395 avec les cellules épithéliales**

Images au microscope d'une coloration au Giemsa d'une infection de cellules épithéliales avec 4395 au temps 90 minutes. Grossissement 100X

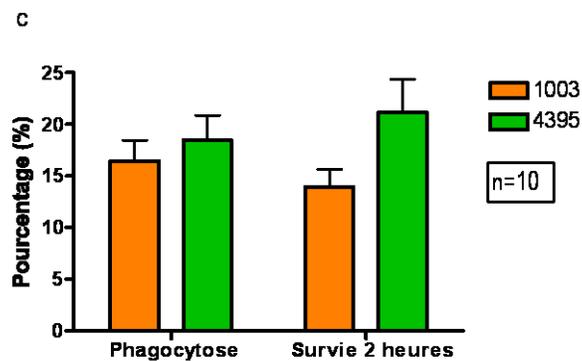
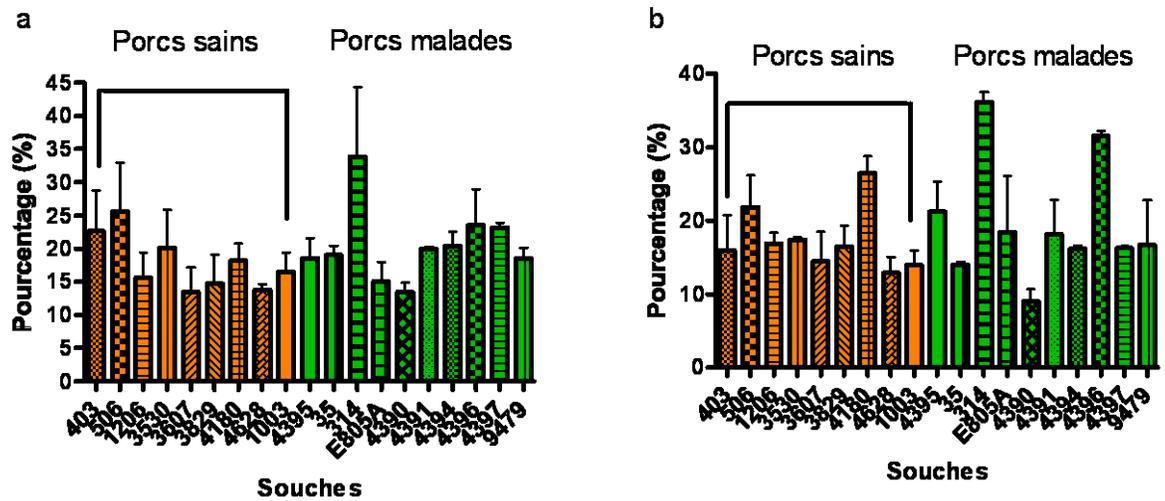


**Figure 19 : Interaction de la souche 1003 avec les cellules épithéliales**

Images au microscope d'une coloration au Giemsa d'une infection de cellules épithéliales avec 1003 au temps 90 minutes. Grossissement 100X

### **1.6. Test de survie avec les macrophages humains THP-1**

Pour une bactérie causant une maladie systémique, l'étape suivant l'invasion est la survie dans les macrophages. Alors, la phagocytose et la survie dans les macrophages peuvent être un indicateur des différents phénotypes des deux catégories de souches. Malheureusement, il était impossible de faire une survie 24 heures, puisque les bactéries sortaient des macrophages et se retrouvaient dans le milieu extracellulaire. Donc, la survie 2 heures dans les macrophages a été observée. Toutefois, rien ne permet de différencier le groupe de bactéries provenant de porcs sains de ceux provenant de porcs malades (figure 20 a et b). Cependant, il y a une faible différence de survie après 2 heures lorsque la souche 1003 est comparée directement avec la souche 4395 (figure 20 c).



**Figure 20 : Infection de macrophages**

a) Pourcentage de phagocytose (T0/CFU), b) pourcentage de survie après 2 heures (T2/CFU) des 19 souches provenant des 2 groupes et c) pourcentage de phagocytose et du taux de survie après 2 heures pour les souches de Typhimurium 1003 et 4395 dans les macrophages. Test de Student effectué

Légende :

Orange – Souches provenant de porcs sains

Vert – Souches provenant de porcs malades

Toutes ces infections ont été faites durant cette maîtrise.

Selon la caractérisation phénotypique des deux souches de Typhimurium (1003 et 4395), à l'aide des cellules épithéliales et des macrophages, certaines différences sont observées. Pour la suite de la caractérisation, chaque souche est analysée par SCOTS individuellement.

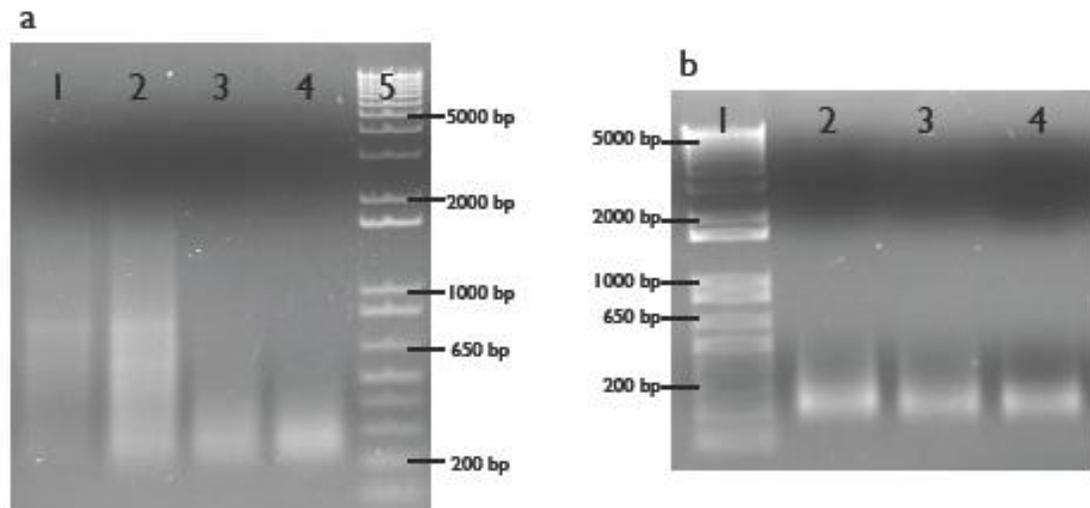
## **2. Caractérisation géotypique de la souche provenant de porc malade** **lors de l'invasion**

Selon les infections dans les cellules épithéliales, la souche 4395 possède un pouvoir d'invasion supérieur à la souche 1003 (Figure 16 c). Pour identifier des gènes spécifiques à la souche 4395 lors de l'invasion, la technique SCOTS a été utilisée.

### **2.1.SCOTS**

La technique regroupe plusieurs étapes, qui sont une succession de normalisation et de capture permettant d'aller chercher les gènes exprimés dans une condition. Pour voir si la capture d'ADN bactérien se déroule bien, les produits PCR sont vérifiés après chaque capture. Initialement, l'ADNc est une mixture complexe comprenant l'ADNc des cellules épithéliales et des bactéries. Suite aux captures, l'ADNc devrait être composé spécifiquement d'ADNc bactérien. Cette spécification peut être visualisée par une diminution de la quantité de fragments observés par migration sur gel d'agarose. La complexité de l'ADNc initial et celui obtenu après chacune des rondes de capture par SCOTS est vérifiée.

La technique SCOTS a été faite pour la souche de Typhimurium 4395 provenant de porc malade après 180 minutes de contact avec les cellules épithéliales HeLa. Par la suite, la complexité des captures a été vérifiée par gel d'agarose 1,5% (Figure 21). Les rondes de capture et d'amplification par PCR vont permettre de perdre les fragments eucaryotes, mais aussi sélection de petits fragments. Alors, la spécificité des fragments est observée par la diminution des bandes sur gel d'agarose lors des trois premières captures (Figure 21 a). De plus, une étape d'enrichissement (rondes 4 à 6) en bloquant contre l'ADNg de la souche 1003 provenant de porc sain, a été réalisée pour obtenir des transcrits spécifiques à la souche 4395. Pour les trois dernières captures, la diminution est moindre, mais tout de même observable (Figure 21 b). Ceci montre qu'il y a encore sélection de certains fragments.



F

**Figure 21 : Bandes de diversité bactérienne**

Bandes de produits PCR de chaque ronde de capture, a) 3 premières rondes et b) 3 rondes spécifiques de la souche 4395 provenant d'une infection de cellules épithéliales au temps 180 minutes.

Légende :

a) 1 –ADNc

2 à 4 – Rondes 1 à 3

5 – Marqueur (1Kb plus)

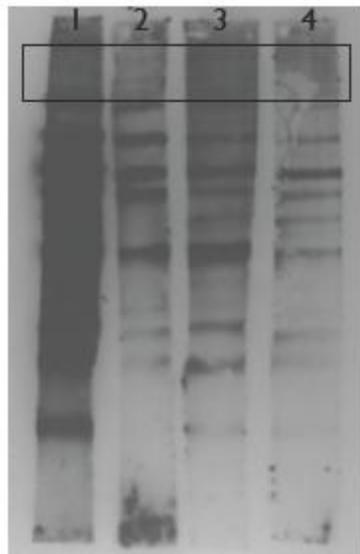
b) 1 – Marqueur (1Kb plus)

2 à 4 – Rondes 4 à 6

## 2.2.Diversité bactérienne de l'ADNc

Après avoir fait les 6 rondes de SCOTS, un Southern Blot est effectué pour connaître la diversité des gènes capturés de la souche 4395 durant l'invasion de cellules épithéliales (T180). Le Southern Blot permet de visualiser si les fragments d'ADNc obtenus sont bactériens et s'hybrident avec le génome de la souche 4395. Alors, les bandelettes utilisées sont faites avec l'ADNg de la souche 4395 et les sondes sont faites avec l'ADNc obtenu après chacune des captures. Ainsi on peut aussi obtenir une idée de la diversité en vérifiant

que le profil d'hybridation est réparti sur tout le génome ou de façon spécifique à quelques fragments. Pour la souche 4395, les fragments capturés sont principalement regroupés et semblent correspondre aux bandes plasmidiques. Certaines bandes retrouvées au niveau de l'ADNc disparaissent, mais de façon générale, les bandes plasmidiques restent présentes tout au long des captures, tandis qu'il y a une diminution des fragments correspondant à l'ADN ribosomal (Figure 22).



**Figure 22 : Diversité des captures de la souche 4395 après SCOTS**

Légende :

1 – Sonde des plasmides de 4395

2 – Sonde ADNc

3 – Sonde de la troisième capture

4 – Sonde de la sixième capture

Rectangle : emplacement de l'ADN ribosomal

### 2.3. Spécificité des transcrits

Après la vérification par Southern Blot, les fragments d'ADNc sont clonés pour ainsi obtenir une banque de fragments correspondant aux gènes de la souche 4395 exprimés

pendant l'invasion. Plus grande est la banque plus les chances d'obtenir une diversité de fragments est grande. Par la suite, pour cribler les clones de façon générale, il est possible de faire un Dot blot. Ainsi, il est possible d'observer si les fragments capturés se retrouvent au niveau du génome de la souche provenant de porc malade, mais aussi s'ils se trouvent au niveau du génome de la souche provenant de porc sain. De plus, étant donné que les plasmides étaient encore très présents au niveau du Southern Blot, il est intéressant de savoir si les fragments trouvés sont associés avec les plasmides de la souche 4395. Certains clones démontrent une hybridation plus forte pour la souche 4395, tandis que d'autres sont aussi forts ou plus forts pour la souche 1003. Toutefois, chaque point s'hybride de façon similaire avec la sonde plasmidique (Figure 23). Les sondes sont faites à partir de l'extraction d'ADNg de la souche poussant dans un bouillon LB. Alors, les différences d'intensités d'une souche à l'autre sont dues à une différence de souche.



## **2.4. Identification des gènes exprimés lors de l'invasion**

Les 31 clones possédant une intensité élevée pour la sonde génomique de 4395, mais faible ou nulle pour la sonde génomique 1003 et plasmidique ont été sélectionnés et envoyés séquencés. Par la suite, les séquences ont été analysées avec des logiciels tel que BLAST et les fonctions ont été associées aux fragments sélectionnés. Le tableau VI est un résumé des gènes trouvés.

**Tableau VI :** Résumé des gènes de 4395 exprimés dans les cellules épithéliales au temps 180 minutes par la technique SCOTS.

<b>Fonction</b>	<b>Gène</b>	<b>Nombre de fois retrouvé</b>	<b>Origine</b>
<i>Putative mobilization protein</i>	<i>mobC</i>	1	<i>E. coli</i>
<i>Zinc uptake transcriptional repressor</i>	<b>STM4241 (<i>zur</i>)</b>	2	<i>Salmonella</i>
<i>Putative cytoplasmic protein</i>	<i>ybiU</i>	2	<i>Salmonella</i>
<i>Fumarate hydratase</i>	<i>fumC</i>	2	<i>Salmonella</i>
<i>30S ribosomal / 50S ribosomal</i>	<i>rpsS</i> et <i>rpmE</i>	2	<i>Salmonella</i>
<i>rRNA-16S ribosomal RNA</i>	<i>rrsA</i>	3	<i>Salmonella</i>
<i>Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase</i>	STM2487 ( <i>purC</i> )	1	<i>Salmonella</i>
<i>ABC transporter ATPase component</i>	<i>uup</i>	1	<i>Salmonella</i>
<i>Paraquat-inducible protein A</i>	<i>pqiA</i>	1	<i>Salmonella</i>
<i>Putative inner membrane protein</i>	<i>ydgK</i>	1	<i>Salmonella</i>
<i>Transcriptionnal regulateur</i>	<i>rcsB</i>	1	<i>Salmonella</i>
<i>Putative aminomutase</i>	STM4333 ( <i>yjeK</i> )	1	<i>Salmonella</i>
<i>Putative glycosyl hydrolase</i>	STM1559	1	<i>Salmonella</i>
<i>Putative cell wall-associated hydrolase</i>	<i>ydhO</i>	1	<i>Salmonella</i>
<i>Coproporphyrinogen III oxidase</i>	STM2451 ( <i>hemF</i> )	1	<i>Salmonella</i>
<i>Transposase for IS200</i>	<i>tnpA</i>	1	<i>Salmonella</i>
<i>Valyl-tRNA synthetase</i>	STM4475 ( <i>valS</i> )	1	<i>Salmonella</i>
<i>Putative GntR family transcriptional repressor</i>	STM2794 ( <i>ygaE</i> )	1	<i>Salmonella</i>
<i>Exodeoxyribonuclease I (Exonuclease I)</i>	STM2067 ( <i>sbcB</i> )	2	<i>Salmonella</i>
<i>Dipeptide transporter ATP-binding subunit</i>	STM3626 ( <i>dppF</i> )	4	<i>Salmonella</i>
<i>Putative outer membrane lipoprotein</i>	STM3810 ( <i>vidQ</i> )	1	<i>Salmonella</i>

Parmi les trente fragments, le gène *zur* semblait un gène intéressant à approfondir. Alors, le séquençage complet du gène a été fait pour les deux souches. Toutefois, il y n'a aucune différence entre les deux séquences.

*zur* 1003/4395

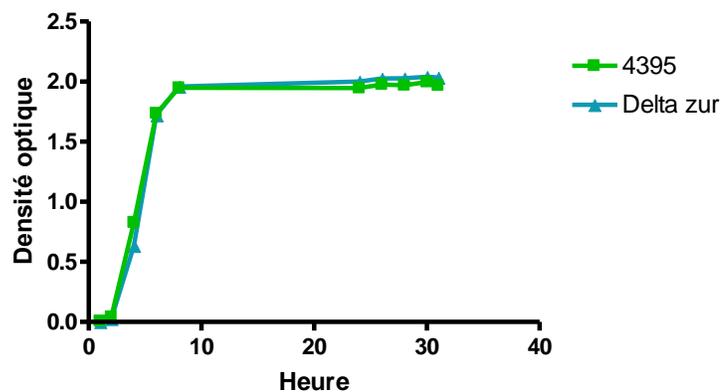
CAGTGAAAGTTTGACGTTTTGTTTCACAGTTAGCCCATCTTATTATCAGGTGAAGTAATTCCTCCACCACGCT  
 CAGTGAAAGTTTGACGTTTTGTTTCACAGTTAGCCCATCTTATTATCAGGTGAAGTAATTCCTCCACCACGCT  
 TTACCGGACAGAGGCCGAAC TATTGCTGTGAAATAG TGATGTAAATCCTGTTGTTATAATATCGACCCTCATT  
 TTACCGGACAGAGGCCGAAC TATTGCTGTGAAATAG TGATGTAAATCCTGTTGTTATAATATCGACCCTCATT  
 ATGTATAGATGAGAATACTGGCGCGGAAAAGCTTAGCAGGCGATATATTGTCGCGGGTAATTCAGAGTTTT  
 ATGTATAGATGAGAATACTGGCGCGGAAAAGCTTAGCAGGCGATATATTGTCGCGGGTAATTCAGAGTTTT  
 AAGCAGCTCGTGGTAAAGTAACGGATTAGACTTTCATGCCATTCGAGGTGCTACATGGAAAAGACCACAACG  
 AAGCAGCTCGTGGTAAAGTAACGGATTAGACTTTCATGCCATTCGAGGTGCTACATGGAAAAGACCACAACG  
 CAAGAGTTACTGGCGCAAGCTGAAAACTCT GCGCGCAGCGCAACGTGCGCCTGACGCCTCAGCGCCTCG  
 CAAGAGTTACTGGCGCAAGCTGAAAACTCT GCGCGCAGCGCAACGTGCGCCTGACGCCTCAGCGCCTCG  
 AAGTGCTGCGCCTGATGAGTCTGCAACAGGGTGCCATCAGCGCATACGATTTGCTCGATTTGCTGCGCGAAA  
 AAGTGCTGCGCCTGATGAGTCTGCAACAGGGTGCCATCAGCGCATACGATTTGCTCGATTTGCTGCGCGAAA  
 CGGAACCACAGGCCAAACCGCCACCATTACC GCGCGCTGGATTTTTGCTCGAACAGGGTTTTGTCCATA  
 CGGAACCACAGGCCAAACCGCCACCATTACC GCGCGCTGGATTTTTGCTCGAACAGGGTTTTGTCCATA  
 AAGTGGAATCCACCAATAGTTATGTGGTTG CCACCTGTTGACCAGCCGACGCACAGCTCGGCCATGTTTATC  
 AAGTGGAATCCACCAATAGTTATGTGGTTG CCACCTGTTGACCAGCCGACGCACAGCTCGGCCATGTTTATC  
 TGCGATCGTTG CGGCGTGGTGAAGGAAGAGTGTGCCGAGGGCGTGAAGACATCATGCATACG CTGGCGGCT  
 TGCGATCGTTG CGGCGTGGTGAAGGAAGAGTGTGCCGAGGGCGTGAAGACATCATGCATACG CTGGCGGCT  
 AAAATGGGCTTTGCGCTACGACATAACGTTATTGAGGCGCACGG TCTGTGCCCTGCGTGCGTAGAAGTAGAAGCG  
 AAAATGGGCTTTGCGCTACGACATAACGTTATTGAGGCGCACGGTCTGTGCCCTGCGTGCGTAGAAGTAGAAGCG  
 TGTCGCCNTCCGGGAAACTGTGGTCACGATCACTCGGTGCTGGTGAAGAAAAACCACGTTAGCCTGAACGGAAA  
 TGTCGCCNTCCGGGAAACTGTGGTCACGATCACTCGGTGCTGGTGAAGAAAAACCACGTTAGCCTGAACGGAAA  
 ACGGGCGGCAGTAGAGAGG GGCACGCCCGCATT CATAAGCAAACAGGGGGAA GCACATCCATGTACTCCTGGT  
 ACGGGCGGCAGTAGAGAGG GGCACGCCCGCATT CATAAGCAAACAGGGGGAA GCACATCCATGTACTCCTGGT

### 3. Mutagenèse et caractérisation du gène *zur*

Une fois l'analyse informatique faite, le gène *zur* est sorti plus d'une fois du criblage. Ce gène fait partie des salmonelles et est impliqué dans le transport de zinc. *zur* est un répresseur, qui joue sur l'opéron *znuABC*. (2), (60)

#### 3.1.1. Courbe de croissance

La densité optique des cultures de la souche 4395 et du mutant *zur* a été prise à chaque heure à partir d'une dilution 1 dans 100 d'une culture qui a poussé toute la nuit dans du LB. On peut voir qu'il n'y a aucune différence lorsque les souches poussent dans un milieu riche comme le LB (Figure 24).



**Figure 24 : Courbes de croissance**

Courbes de croissance de 4395 souche sauvage (carré vert) et 4395  $\Delta zur$  (triangle bleu).

### 3.1.2. Stress oxydatif

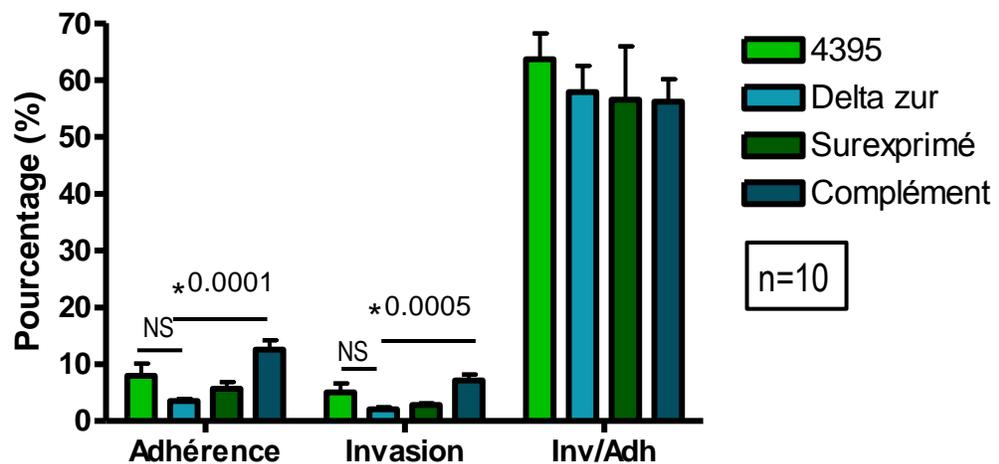
Pour vérifier si le régulateur *zur* est impliqué dans la résistance au stress oxydatif, la sensibilité au peroxyde d'hydrogène est testée sur la souche sauvage, le mutant *zur* et les compléments. Selon les résultats obtenus, la mutation ou la surexpression du gène *zur* n'a aucun effet face à la sensibilité au peroxyde d'hydrogène 3 %. Aucune des souches n'a démontré de différence face au peroxyde d'hydrogène, indépendamment de la phase de croissance (phase stationnaire et phase exponentielle) (Tableau VII). De façon globale, les bactéries poussées en phase stationnaire sont plus résistantes au peroxyde d'hydrogène que celles poussées en phase exponentielle.

**Tableau VII :** Zone d'inhibition du peroxyde d'hydrogène sur les souches de *Typhimurium*

Souches	Phase stationnaire	Phase exponentielle
4395	2 mm	4 mm
4395 $\Delta zur$	2 mm	4 mm
4395 avec (pWSK29/ <i>zur</i> )	2 mm	4 mm
4395 $\Delta zur$ (pWSK29/ <i>zur</i> )	2 mm	4 mm

### 3.1.3. Adhésion et invasion de cellules épithéliales

Les cellules épithéliales humaines (HeLa) permettent d'observer les premières étapes de l'infection par les bactéries, qui sont l'adhésion et l'invasion. Lors du test d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales, les deux souches à caractériser (1003 et 4395) ont une différence au niveau de l'adhésion et de l'invasion (Figure 16 c). Cette fois-ci, les infections sont faites à nouveau pour connaître l'implication du gène *zur*. Le mutant démontre une diminution au niveau de l'adhérence et de l'invasion ainsi que pour la souche sauvage qui surexprime le gène. Tel qu'attendu, la souche complémentée possède les mêmes caractéristiques que la souche sauvage. Toutefois, la différence entre le type sauvage et le mutant n'est pas significative. Par contre, la différence entre la souche mutant et la souche mutante complémentée avec le gène fonctionnel est significative.

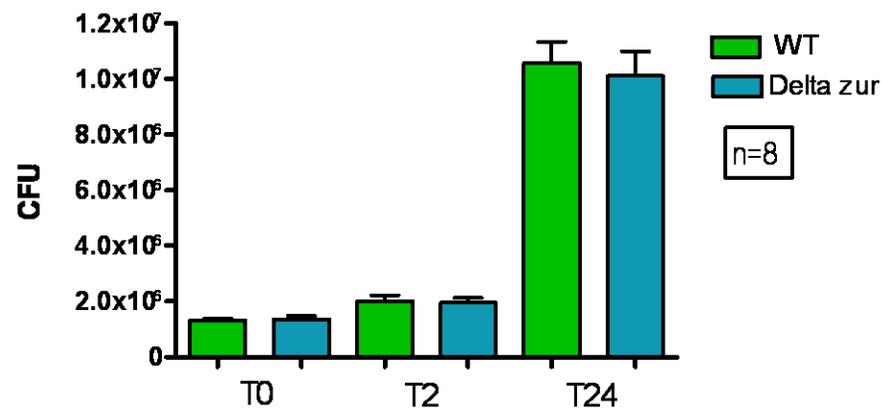


**Figure 25 : Interaction avec les cellules épithéliales HeLa**

Infections de cellules épithéliales avec la souche de type sauvage, mutante pour le gène *zur*, complémentée avec *pWSK29/zur* et surexprimée avec *pWSK29/zur*.

### 3.1.4. Infection THP-1

Lors des premières infections de macrophages humains, il y avait une différence au niveau de la survie après 2 heures pour la souche 1003 et la souche 4395 (Figure 20 c). Cette fois-ci, la survie dans les macrophages a été évaluée jusqu'à 24 heures post infection. À 24 heures, il y a des bactéries présentes dans le milieu extracellulaire, mais rien d'aussi important que lors des premières infections avec la souche 1003. Il n'y a pas de différence entre les souches testées au niveau de la survie que ce soit après 2 ou 24 heures (Figure 28).



**Figure 26 : Infection de macrophages THP-1**

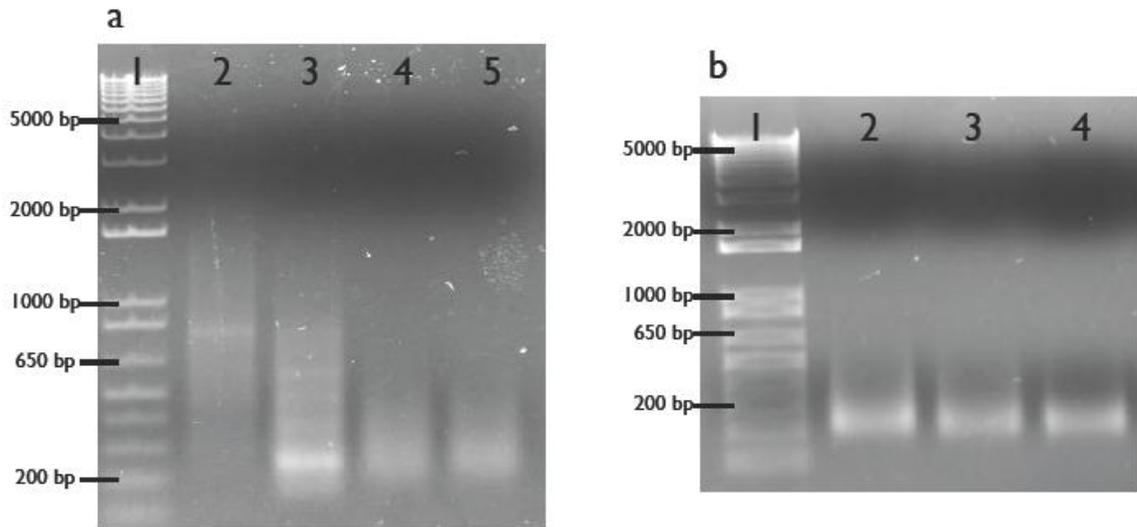
Infections de macrophages humains avec la souche de type sauvage, mutante pour le gène *zur*.

#### **4. Caractérisation génotypique pour la souche provenant de porc sain lors de l'adhésion**

Selon les infections dans les cellules épithéliales, la souche 1003 possède un pouvoir d'adhésion supérieur à la souche 4395 (Figure 16 c). Alors, la technique SCOTS a été utilisée pour identifier les gènes qui sont exprimés durant l'adhésion (T90 minutes dans les HeLa) et de façon spécifique à la souche provenant de porc sain.

##### **4.1.SCOTS**

La technique a été réalisée telle que décrite à la section 2.1. Toutefois, les cellules épithéliales HeLa en contact avec la souche de Typhimurium 1003 pendant 90 minutes ont été utilisées. Par la suite, la complexité des captures a été vérifiée par gel d'agarose 1,5% (Figure 27). La spécificité des fragments est observée par la diminution des bandes sur gel d'agarose lors des trois premières captures (Figure 27 a). De plus, une étape d'enrichissement (rondes 4 à 6) en bloquant contre l'ADNg de la souche 4395 provenant de porc malade, a été réalisée pour obtenir des transcrits spécifiques à la souche 1003 provenant de porc sain. Pour les trois dernières captures, la diminution est moindre, mais tout de même observable (Figure 27 b).



**Figure 27 : Bandes de diversité bactérienne**

Bandes de produits PCR de chaque ronde de capture de la souche 1003 provenant d'une infection de cellules épithéliales après 90 minutes

a) 3 premières rondes b) 3 rondes spécifiques

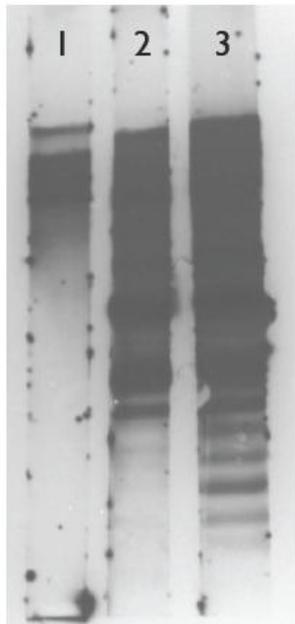
Légende : a) 1 – Marqueur (1 Kb plus)  
 2 – ADNc  
 3 à 5 – Rondes 1 à 3

b) 1 – Marqueur (1Kb plus)  
 2 à 4 – Rondes 4 à 6

## 4.2. Diversité bactérienne de l'ADNc

Après avoir fait les 6 rondes de SCOTS, un Southern Blot est effectué pour connaître la diversité des gènes capturés de la souche 1003 durant l'adhérence de cellules épithéliales (T90). Le Southern blot permet de visualiser si les fragments d'ADNc obtenus sont bactériens et hybrident avec le génome de la souche 1003. En utilisant l'ADNg de la souche 1003 et l'ADNc obtenu après chacune des captures comme sonde. On peut aussi obtenir une idée de la diversité en vérifiant que le profil d'hybridation est réparti sur tout le

génomique ou de façon spécifique à quelques fragments. Pour la souche 1003 (Figure 28), les fragments capturés démontrent une belle répartition tout au long de la bande. La majorité des fragments se retrouve dans le haut de la bande avec les fragments ribosomiaux. Toutefois, il y a apparition de nouvelles bandes entre la troisième et la sixième ronde. Ce qui montre que la diversité s'est accrue durant les rondes de spécification.



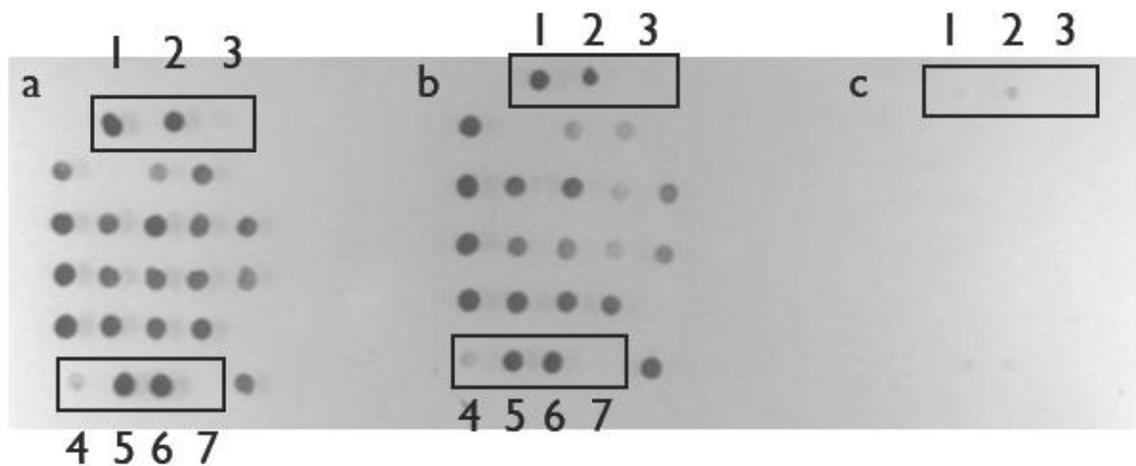
**Figure 28 : Diversité des captures de la souche 1003 après SCOTS**

Légende :

- 1 – Sonde ribosomale
- 2 – Sonde de la troisième capture
- 3 – Sonde de la sixième capture

### **4.3. Spécificité des transcrits**

Après la vérification par Southern Blot, les fragments sont clonés pour ainsi obtenir une banque de fragments correspondants à des gènes de la souche 1003 dans les cellules épithéliales exprimées lors de l'adhérence (T90). Par la suite, la banque d'ADNc est criblée par Dot Blot pour identifier les clones spécifiques à la souche de Typhimurium 1003. Ainsi, il est possible d'observer si les fragments capturés se retrouvent au niveau du génome de la souche provenant de porc sain, mais aussi s'ils se trouvent au niveau du génome de la souche provenant de porc malade. Étant donné que les plasmides avaient une importance pour la souche 4395, ceux de la souche 1003 ont aussi été utilisés comme sonde. Certains clones démontrent une hybridation plus intense pour la souche 1003, tandis que d'autres sont aussi forts pour la souche 4395 (Figure 29). Toutefois, aucun point n'allume au niveau de la sonde plasmidique.



**Figure 29 : Spécificité des transcrits pour 1003**

Dot blot des clones d'ADNc hybridés avec a) une sonde d'ADNg de la souche 1003, b) une sonde d'ADNg de la souche 4395 et c) une sonde plasmidique de 1003.

Légende : Contrôles (carrés)

Clones sélectionnés (cercles)

1 et 6 – 4395    2 et 5 – 1003

3 et 4 – clone d'une colonie bleue

7 – clone sans insert

Sur une vingtaine de clones, 5 clones possédaient une intensité élevée pour la sonde génomique de 1003, mais faible ou nulle pour la sonde génomique 4395. La sonde plasmidique n'apparaît pas sur la figure 29, mais une exposition plus longue n'a démontré aucun clone pouvant être de source plasmidique.

#### 4.4. Identification des gènes exprimés lors de l'invasion

Les 5 clones possédant une intensité élevée pour la sonde génomique de 1003, mais faible ou nulle pour la sonde génomique 4395 et plasmidique, ont été envoyés pour séquençage. Par la suite, les séquences ont été analysées avec les logiciels tels que BLAST et les fonctions ont été associées aux fragments sélectionnés. Le tableau VIII est un résumé des 5 gènes trouvés.

**Tableau VIII :** Résumé des gènes exprimés par la souche 1003 dans les cellules épithéliales HeLa au temps 90 minutes par la technique SCOTS.

Fonction	Gène	Nombre de fois retrouvé	Origine
Ethanolamine ammonia-lyase, large subunit	STM2456 ( <i>eutB</i> )	1	<i>Salmonella</i>
Putative endochitinase	STM0233	1	<i>Salmonella</i>
Putative LysR family transcriptional regulator	<b>STM1523</b> ( <i>yneJ</i> )	1	<i>Salmonella</i>
Putative cytoplasmic protein	STM4088 ( <i>yiiU</i> )	1	<i>Salmonella</i>
Regulatory factor of maltose metabolism	<b>STM3306</b> ( <i>nlp</i> )	1	<i>Salmonella</i>

Deux de ces clones correspondant aux gènes *yneJ* et *nlp*, des amorces ont été construites et le séquençage complet des séquences a été fait pour les deux souches de *Typhimurium* (1003 et 4395). La grande différence d'intensité au niveau du Dot blot laisse croire qu'il y a peut-être une variation dans la séquence. Toutefois, une fois les deux séquences alignées,

aucune différence n'est présente pour le gène *yneJ* et la modification d'une seule base est présente pour le gène *nlp*. Cette modification apporte un changement d'acide aminé (alanine en proline), mais ceux-ci font partie de la même famille (hydrophobe non-polaire). Donc, cette modification n'apporte aucun changement dans la protéine.

*yneJ* 1003/4395

TCCGTCAGCTTGAAGCCGACCTGGGCGTCTCTCTGTTTATTTCGCGAAAACCAGC  
TCCGTCAGCTTGAAGCCGACCTGGGCGTCTCTCTGTTTATTTCGCGAAAACCAGC  
GACTCAGGCTGTCACCAGCCGGGCATAACTTTTTACGTTACAGCCAGCAGATCC  
GACTCAGGCTGTCACCAGCCGGGCATAACTTTTTACGTTACAGCCAGCAGATCC  
TGGCGCTGGTCGATGAAGCCCGCATGGTGGTTGCCGGAGAGGAACCGCAAGGA  
TGGCGCTGGTCGATGAAGCCCGCATGGTGGTTGCCGGAGAGGAACCGCAAGGA  
CTGTTTTCACTCGGCGCGTTAGAAAGTACTGCCGCCGTACGTATCCCCGCGCTG  
CTGTTTTCACTCGGCGCGTTAGAAAGTACTGCCGCCGTACGTATCCCCGCGCTG  
CTGGCGGGTTATAACCAGCGTTACCCTAAAATTCAGTTCGCGTTAACGACCGGT  
CTGGCGGGTTATAACCAGCGTTACCCTAAAATTCAGTTCGCGTTAACGACCGGT  
CCTTCCGGCGCCATGCTGGATGGCGTGCTCGAGGGAAAGCTGAACGCCGCCTT  
CCTTCCGGCGCCATGCTGGATGGCGTGCTCGAGGGAAAGCTGAACGCCGCCTT  
TATTGATGGCCCGCTAATGCATCCGGGGCTGGAAGGTATACCGGCTTACCAGG  
TATTGATGGCCCGCTAATGCATCCGGGGCTGGAAGGTATACCGGCTTACCAGG  
AAGAGATGATGATCGTCGCGCCACACGGCCATTCCGTCGTTTCGCGGGCCAGC  
AAGAGATGATGATCGTCGCGCCACACGGCCATTCCGTCGTTTCGCGGGCCAGC  
GAGGTGAATGGTTATAACATCTATGCTTTTCGCGCCAACCTGTTCTTACCGACGG  
GAGGTGAATGGTTATAACATCTATGCTTTTCGCGCCAACCTGTTCTTACCGACGG  
CATTTCGAAAGCTGGTTTCATGCCGATGGCGCGACCCCCGGTACGATTCACGAA  
CATTTCGAAAGCTGGTTTCATGCCGATGGCGCGACCCCCGGTACGATTCACGAA  
ATGGAGTCATATCATGGAATGTTGGCGTGCGTAA  
ATGGAGTCATATCATGGAATGTTGGCGTGCGTAA

*nlp* 1003/4395

GTGATGGATGTATGGAAAGCAAGCTTATTGACTGGCATCCGGCCGATATCATT  
GTGATGGATGTATGGAAAGCAAGCTTATTGACTGGCATCCGGCCGATATCATT  
GCCGGACTACGTAAAAAAGGGACTTCAATGGCCGCTGAGTCACGTCGGAATGG  
GCCGGACTACGTAAAAAAGGGACTTCAATGGCCGCTGAGTCACGTCGGAATGG  
ATTGAGTTCATCCACGCTGGCCAATGCATTAACGCGCCCATGGCCGAAAGGAG  
ATTGAGTTCATCCACGCTGGCCAATGCATTAACGCGCCCATGGCCGAAAGGAG  
AGTTGATTATCGCGAAAGCATTGGGAACGGAACTCTGGGTTATTTGGCCATCG  
AGTTGATTATCGCGAAAGCATTGGGAACGGAACTCTGGGTTATTTGGCCATCG  
CGTTATCACGATCCGCGCACGCATGAGTTTATCGACAGAACGCGGCTTATGAG  
CGTTATCACGATCCGCGCACGCATGAGTTTATCGACAGAACGCGGCTTATGAG  
AGCGCGTAATAAAAAACAAACAGAATGTAGAGTAAGTGCCTGTAAAACAACCCC  
AGCGCGTAATAAAAAACAAACAGAATGTAGAGTAAGTGCCTGTAAAACAACCCC  
CGCATCGCGTTCGCGGGGGTTGT  
CGCATCGCGTTCGCGGGGGTTGT

## Discussion

La bactérie *Salmonella* peut causer deux types de maladie, une maladie localisée et une maladie systémique. Les symptômes sont différents selon l'hôte et le sérovar qui infecte. Plus particulièrement, le sérovar Choleraesuis peut infecter le porc et produire une maladie systémique. Ce sérovar est un problème majeur aux États-Unis, mais n'est pas retrouvé au Québec. Par la suite, le sérovar Typhimurium est une bactérie qui peut infecter plusieurs hôtes. Toutefois, seulement la souris était reconnue pour avoir une infection systémique causée par Typhimurium, tandis que certains hôtes pouvaient avoir une gastroentérite ou même n'avoir aucune maladie. Malheureusement, depuis quelques années, l'industrie porcine québécoise est confrontée à une crise par l'apparition d'une maladie systémique causant la mort provoquée par le sérovar Typhimurium. Pourtant, le sérovar Typhimurium fait normalement partie de la flore endogène du porc. Ces nouvelles souches possèdent de multiples résistances aux antibiotiques et ressemblent beaucoup aux souches commensales du porc. Parallèlement ce qui est inquiétant en terme de santé publique, c'est que les souches commensales du porc peuvent causer une gastroentérite chez l'humain. Alors, il est donc important de s'interroger sur les éléments de pathogénicité de ces nouvelles souches leur permettant de causer la mort chez les porcs. Aussi, si les souches commensales du porc causent la gastroentérite, à quelle pathologie humaine peut-on s'attendre pour ces nouvelles souches? Ainsi, les objectifs de ce projet sont de caractériser une souche isolée d'un porc sain (1003) et une souche isolée d'un porc malade (4395), à l'aide d'infection de cellules épithéliales et de macrophages et d'identifier les gènes qui sont exprimés durant l'interaction avec des cellules épithéliales.

La résistance aux antibiotiques est souvent associée aux plasmides présents dans les souches. Toutefois, les plasmides ne sont pas les seuls moyens de résistance, puisqu'il se peut que des gènes codant pour des résistances antimicrobiennes viennent s'introduire dans le génome.

Les souches de Typhimurium sont séparées par lysotype. Cette classification est due à la résistance des souches face aux phages. Plusieurs lysotypes sont reconnus pour posséder de nombreuses résistances aux antibiotiques, comme le lysotype LT104 qui en possède au niveau de son génome et sur des plasmides (63).

La souche 1003 isolée de porc sain est une LT104 et possède 2 plasmides, mais ne possède pas le plasmide de virulence. La souche 4395 isolée de porc malade est une LT35 et possède 4 plasmides, mais ne possède pas le plasmide de virulence (figure 15). Les plasmides de la souche 4395 sont présentement séquencés et pourront fournir plus d'informations. Aussi, la souche 1003 possède des résistances à douze antibiotiques (ampicilline, bacitracine, chloramphénicol, clindamycine, érythromycine, kanamycine, quinupristine/dalfopristine, streptomycine, sulfisoxazole, tétracycline et vancomycine), tandis que la souche 4395 n'en possède que cinq (bacitracine, clindamycine, érythromycine, quinupristine/dalfopristine et vancomycine).

Dans le but de comparer les souches de Typhimurium, une caractérisation phénotypique a été effectuée. L'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales HeLa ont été faites. Ces

infections ont permis de mettre en évidence la différence d'adhésion et d'invasion entre les souches (figure 16 c). La souche 1003 possède un pouvoir adhésion supérieur à la souche 4395. Toutefois, ce pouvoir d'adhésion n'est pas retrouvé chez toutes les souches de Typhimurium provenant de porcs sains (figure 16 a). La grande majorité des souches commensales ont une adhérence supérieure (7/9) à la souche 4395, mais certaines souches provenant de porcs malades ont une adhérence égale ou supérieure à la souche 1003 (3/10). C'est connu que l'adhésion aux cellules intestinales est une étape importante de l'infection, puisque celle-ci permet à la bactérie de rentrer en contact avec les cellules et par la suite d'envahir les cellules intestinales (27). Toutefois, les bactéries de la flore intestinale ne se propagent pas à l'intérieur des cellules. Elles restent à l'extérieur, puisque l'environnement leur convient. Alors, peut-être que la forte adhérence de la souche 1003 lui confère une grande stabilité aux parois de l'intestin et ainsi d'acquérir ses nutriments sans avoir besoin d'aller plus profondément dans les organes de l'hôte. De plus, la différence d'adhésion est observable par microscopie (figure 18 et 19). Quelques bactéries sont retrouvées pour la souche 4395, tandis que plusieurs bactéries de la souche 1003 sont observables sur une même cellule. Toutefois, ces résultats ne correspondent pas particulièrement avec les résultats obtenus avec les cellules épithéliales HeLa. Il est possible que les différences observées sont dû par la différence de lignée cellulaire (Int-407 cellules intestinales humaines, HeLa cellules épithéliales du col de l'utérus humain). De plus, le protocole d'adhérence n'est pas tout à fait le même (30 minutes Int-407 pour 90 minutes HeLa).

Certaines souches provenant de porcs sains et malades ont été testées par Nadia Bergeron dans les cellules Int-407. Pour les souches 1003 et 4395, aucune différence n'a été remarquée pour l'adhérence. De plus, l'adhérence sur la muqueuse intestinale porcine a été testée et il y a présence d'une légère différence (40 % 1003 et 50 % 4395) (4).

L'étape après l'adhérence est l'invasion. Ce qui a pu être vérifié par une infection des cellules épithéliales HeLa. Le pouvoir d'invasion, lorsqu'il est divisé par l'adhésion, est supérieur pour la souche 4395. Cette différence est observable pour la majorité des souches provenant de porcs malades (8/10). De façon générale, les souches provenant de porcs sains ont une invasion/adhésion semblable à la souche 1003 (entre 5 et 20 %) (figure 16 b). Toutefois, l'invasion des bactéries n'a pas été observée par microscopie. Le vecteur GFP a été construit pour la souche 4395, mais à cause des multiples résistances aux antibiotiques que la souche 1003 possède, le vecteur n'a pas pu être utilisé. L'invasion est une étape importante pour une bactérie qui cause une maladie. Que ce soit pour une gastroentérite ou une maladie systémique, Typhimurium doit entrer dans les cellules épithéliales à l'aide du SST3 du SPI 1. L'invasion induit une forte réponse immunitaire qui cause une gastroentérite ou sinon la bactérie passe inaperçue et colonise plus profondément les organes. Si une bactérie provient d'un porc malade, cela indique qu'elle n'est pas déficiente dans sa capacité à envahir les cellules intestinales.

En plus de l'adhérence, Nadia Bergeron a aussi observé l'invasion dans les cellules Int-407. Le pourcentage d'invasion est vraiment plus élevé chez la souche 4395 (60 %) que la

souche 1003 (5 %). (4). Cette différence d'invasion correspond bien à ce qui a été observé avec les cellules HeLa. De plus, ce pouvoir d'invasion semble présent pour la majorité des souches provenant de porcs malades qui ont été testés.

Les macrophages ont été utilisés pour observer une différence de phagocytose et de survie des souches de Typhimurium provenant de porcs sains et malades. Toutefois, le taux de phagocytose est similaire pour toutes les souches, que ce soit provenant de porcs sains ou malades. Alors, ce n'est pas à ce niveau et aux conditions utilisés qu'il y a une différence pour les souches de Typhimurium. De plus, la phagocytose par les monocytes humains et porcins a été observée après 15 minutes de contact, par Nadia Bergeron. Pour la souche 1003, il y a une grande différence entre la phagocytose porcine (45 %) et humaine (5 %), tandis que la souche 4395 a une différence moins grande pour la phagocytose (porcine 35 % et humaine 15 %) (4). Toutefois, la différence entre les deux souches est de 10 % que ce soit pour les monocytes humains ou porcins. Alors, le taux de phagocytose aurait pu être une indication sur les différences de maladies (figure 20 a). Une bactérie qui est capable d'esquiver la phagocytose par les macrophages à moins de chance de se faire détruire et ainsi envahir les organes en périphérie. Par la suite, la survie dans les macrophages THP-1 peut être un autre indice pour la différence entre les types de maladie. Il est connu que les souches de Typhimurium peuvent survivre dans les macrophages pour ainsi causer une maladie systémique chez la souris (72). Alors, théoriquement, les souches provenant de porcs malades devraient avoir un taux de survie supérieur aux souches provenant de porcs

sains. Toutefois, 24 heures post-infection, les bactéries provenant de porcs sains et de porcs malades se retrouvaient dans le milieu extracellulaire. Ainsi, il n'était pas possible de calculer exactement la survie des bactéries dans les macrophages. Alors, le temps de survie observé n'a pas pu être très long. Donc, il a été choisi d'observer le taux de survie après 2 heures. Toutefois, le taux de survie 2 heures post infections ne démontre aucune différence générale entre les souches de porcs sains et malades (figure 20 b). Cependant, lorsque les taux de survie spécifiques aux deux souches (1003 et 4395) sont comparés, une légère différence significative (0,03) est remarquée (figure 20 c). La souche 4395 a un taux de survie d'environ 115 %, tandis que la souche 1003 à un taux de survie après deux heures de 70 %. Pour la survie, seulement la survie dans le sang de porc 6 heures post-infection a été testé et aucune différence n'était visible entre les deux souches (4).

Une différence entre les souches au niveau de l'adhésion et l'invasion a été observée. La souche 1003 provenant de porc sain adhère davantage, tandis que la souche 4395 provenant de porc malade envahit plus. Ainsi, ces étapes ont été ciblées pour effectuer une comparaison génétique entre les deux souches. Malgré la petite différence du taux de survie entre les deux souches, la technique SCOTS n'a pas été faite sur cette condition, puisque cette différence n'était pas observée pour les autres souches. Pour la caractérisation génétique, la technique SCOTS a été faite et elle a permis de capturer les fragments

d'ADNc exprimés par les souches de Typhimurium lors d'une infection avec les cellules épithéliales.

Tout d'abord, la caractérisation génétique a été faite avec la souche de Typhimurium provenant de porc malade, qui possède une invasion supérieure à celle de la souche provenant de porc sain. Cette différence entre les deux souches pour cette condition permettait de vérifier l'hypothèse qu'il y avait des gènes différents permettant une plus grande invasion. Alors, la technique SCOTS a été faite avec l'ARN provenant d'une infection dans les cellules épithéliales avec la souche de Typhimurium 4395 au temps 180 minutes, qui correspond à l'invasion. La technique SCOTS permet d'aller chercher les gènes bactériens durant l'invasion et qui sont spécifiques à la souche 4395. Chacune des étapes de normalisations et de captures s'est bien déroulée (figure 21). Ceci peut être vérifié par amplification par PCR des fragments d'ADNc récupérés après chaque capture. Ainsi, une diminution des bandes démontre une spécification des fragments. Par la suite, le profil d'hybridation du Southern Blot (figure 22) ne correspondait pas exactement à ce qui était attendu. Normalement, la diversité des fragments d'ADNc capturés devrait correspondre à une hybridation sur l'ensemble du génome. Toutefois, l'apparition de bandes qui s'hybride de façon spécifique à certains fragments d'ADN démontre que l'ADNc capturé se regroupe dans certaines portions du génome et ainsi il n'y a pas une très grande variété de gène. De plus, la ressemblance des bandes de la sonde plasmidique avec les bandes obtenues à la troisième et sixième capture portait à croire que beaucoup de gènes trouvés étaient des

gènes de plasmide. Par la suite, la spécificité a été déterminée, à l'aide du Dot Blot. Tel qu'attendu, une grande partie des gènes hybridés avaient une forte réponse avec la sonde plasmidique (figure 23). Toutefois, trente clones sur deux cents ont été identifiés comme étant des fragments potentiels et ont été envoyés au séquençage.

Sur trente clones, vingt-deux gènes différents ont été trouvés. Ceux-ci se retrouvent partout sur le génome. Parmi les gènes (tableau VI), plusieurs ont des fonctions putatives (7/22), d'autres sont des régulateurs transcriptionnels (2/22) et certains sont des gènes ribosomiaux qui n'ont pas été bloqué (3/22). Les autres gènes capturés sont impliqués dans des mécanismes de physiologie d'homéostasie de la bactérie et un gène a été identifié faisant partie d'un plasmide d'*E. coli*. Ainsi, les résultats de l'expérience de SCOTS dans les conditions testées n'étaient pas ceux attendus et ne permettent pas d'expliquer la supériorité d'invasion observée antérieurement dans les cellules épithéliales HeLa. Tout d'abord, la différence de phénotype était plutôt en lien avec le rapport de l'invasion sur l'adhérence, et non sur l'invasion uniquement. Ceci peut expliquer la difficulté à trouver des gènes spécifiques à la souche provenant de porc malade, puisque la différence d'invasion est très faible et non significative. La présence de faux positif peut être dû par la trop grande ressemblance des souches, qui empêche de bien retrouver le peu de gène différent. De plus, il est possible que la différence dans l'invasion se situe davantage dans la différence d'expression plutôt que dans l'acquisition de nouveau gène. Cette hypothèse peut être vérifiée par des biopuces. De plus, il est possible que la souche 4395 n'ait acquis aucun

gène, mais au contraire que ce soit la souche 1003 qui ait perdu la capacité d'exprimer certains gènes importants. Toutefois, cette approche est plus ardue à vérifier, puisqu'il n'est pas possible d'obtenir un gène qui est présent, mais pas exprimé.

Toutefois, parmi les gènes obtenus, le gène *zur*, un des régulateurs transcriptionnels a été identifié à deux reprises. Ce gène est le répresseur transcriptionnel de l'opéron *znuABC* responsable du transport du zinc. Le gène était sorti deux fois sur trente, laisse présager qu'il a peut-être une importance au niveau de l'invasion. Pour caractériser l'importance de ce gène dans l'invasion de la souche 4395, une délétion a été créée dans le gène *zur*. Par la suite, une complémentation et une surexpression du gène ont été créées comme contrôle. La croissance du mutant *zur* a d'abord été comparée à la souche sauvage (figure 24). Ainsi, il est possible de voir si la mutation entraîne des effets importants sur la croissance de la bactérie. Dans ce cas, la mutation *zur* n'affecte aucunement la croissance bactérienne quand la bactérie se retrouve dans un milieu riche tel que le LB. Ensuite, le stress oxydatif est un élément souvent observé lors de mutation dans les systèmes de base. Toutefois, aucune différence n'a été observée entre la souche sauvage, la souche mutante, la souche complétementée et la souche qui surexprime le gène (tableau VII). Toutefois, il a été démontré par Susana Campoy en 2002 qu'une mutation au niveau de *znuC* abaisse la résistance au stress oxydatif, mais rien n'est démontré pour le gène *zur* (9).

Le mutant a ensuite été utilisé pour évaluer sa capacité d'interaction avec les cellules. Les infections de cellules épithéliales HeLa sont faites avec les quatre souches pour voir à quel point la non-expression ou la surexpression du gène *zur* peut affecter l'adhésion et, ou l'invasion (figure 25). La souche sauvage 4395, ainsi que la souche mutante complémentée ont un profil semblable (adhérence 9-12 % et invasion 5-7 %) ce qui indique que la complémentation est efficace. Toutefois, il y a une baisse remarquable dans l'adhérence et l'invasion pour la souche mutante et la souche qui surexprime le gène *zur*. Il est possible que la surexpression et la non-expression affectent autant la bactérie dans les cellules épithéliales. Si la bactérie empêche complètement le transport de zinc en surexprimant le répresseur, celle-ci ne pourra pas obtenir le zinc nécessaire à son bon fonctionnement. Toutefois, si le répresseur n'est pas exprimé, la bactérie peut avoir une accumulation de zinc qui est toxique pour la bactérie. Dans les deux cas, ce n'est pas souhaitable (40).

Pour les infections de macrophages humains THP-1, celles-ci ont été faites jusqu'au temps 24 heures. Malgré quelques bactéries extracellulaires, il est possible de voir qu'il n'y a pas de différence au niveau de la survie pour le mutant *zur* (figure 26). Étant donné que le zinc est utilisé par le macrophage, les quantités disponibles doivent être faibles. Ainsi, le système de transport n'a pas besoin d'être réprimé, puisque les quantités présentes ne sont pas assez fortes pour causer de dommage à la bactérie. Il est connu dans la littérature que la mutation de *znuABC* ou de seulement *znuC* abaisse la dose létale de bactéries chez la souris. Toutefois, rien de significatif n'a été démontré pour le gène *zur* chez *Typhimurium* (9, 59).

Pour caractériser le gène *zur* dans l'optique d'une différence entre les deux souches, le séquençage et l'alignement des séquences ont été faits. Toutefois, aucune différence de nucléotide n'a été observée. Par contre, même si les séquences sont similaires, il y a peut-être une différence au niveau de l'expression qui pourrait être quantifiée par qPCR. Cependant, cette approche ne peut pas indiquer s'il y a une différence post-transcriptionnelle.

Ensuite, nous avons déterminé les différences au niveau des gènes exprimés par la souche de Typhimurium provenant de porc sain (1003), qui possède une adhérence supérieure à celle de la souche provenant de porc malade (4395). Cette différence pour cette condition permettait de croire qu'il y avait des gènes différents permettant une plus grande adhérence. Alors, la technique SCOTS a été faite sur l'ARN extrait lors de l'adhésion aux cellules épithéliales HeLa. La technique suivie était la même que celle utilisée pour la souche 4395 lors de l'invasion. Chaque étape (normalisations et captures) s'est bien déroulée (figure 27). La diminution des bandes après amplification par PCR démontrait une spécificité des fragments. Le profil d'hybridation par Southern Blot était prometteur par l'apparition de nouvelles bandes tout au long des captures et aussi une belle diversité pouvait être remarquée, parce que l'ADNc semblait avoir hybridé partout sur le génome (figure 28). Par la suite, la spécificité de l'ADNc à la souche 1003 a été vérifiée à l'aide du Dot Blot, et 5

clones sur 20 ont été identifiés comme étant des fragments potentiels (figure 29). Leur différence d'hybridation supposait que ces gènes n'étaient pas présents dans la souche provenant de porc malade (4395). Cependant, une fois les fragments d'ADNc séquencés, ceux-ci se retrouvaient chez la majorité des salmonelles. Alors, étant donné leur grande différence d'hybridation, deux gènes ont été choisis (*yneJ* et *nlp*) pour être séquencés au complet pour les deux souches. Donc, peut-être qu'il y avait une mutation chez la souche 4395, qui ne lui permettait pas d'hybrider avec la sonde. Le gène *yneJ* est un régulateur transcriptionnel qui n'est pas encore bien défini, tandis que le gène *nlp* est un régulateur impliqué dans le métabolisme du maltose. Une mutation dans l'un des gènes pourrait entraîner une différence d'expression des souches. De plus, les deux gènes étant des régulateurs, leur influence dans la bactérie aurait pu affecter plusieurs éléments. Cependant, ce n'était pas le cas, puisque la séquence est identique pour le gène *yneJ* et seulement une base est différente pour le gène *nlp*. Cette mutation entraîne un changement dans l'acide aminé qui n'affecte en rien la protéine, puisque les deux acides aminés font partie de la même famille. Pour les autres gènes trouvés (*eutB*, *STM0233* et *yiiU*), eux aussi se retrouvent dans les salmonelles. Ainsi, les résultats obtenus n'étaient pas ceux escomptés, puisqu'il n'explique pas la différence d'adhérence entre les deux souches. Toutefois, il est possible que 90 minutes après l'infection, le phénotype soit présent, mais qu'il soit trop tard pour observer l'expression des gènes.

La technique IVET a été faite avec Typhimurium chez le cochon et cinquante gènes ont été identifiés (45). Le groupe de Huang a identifié une protéine cytoplasmique putative, *yiiG*,

induit dans l'intestin. Dans les gènes capturés par SCOTS, *yiiU*, une protéine cytoplasmique putative a été aussi trouvée. Sur les cinquante gènes trouvés dans cette expérience seulement, *yii*, est semblable. Encore une fois, il est possible que la souche provenant de porc sain n'ait pas acquis de nouveaux gènes, mais plutôt la souche provenant de porc malade a perdu la capacité de bien adhérer ce qui pousse à envahir les cellules et les organes pour survivre. De plus, une différence dans l'expression des gènes peut aussi amener des phénotypes différents.

La technique *Suppressive Subtractive Hybridization* (SSH) a été faite par un collaborateur, qui n'a pas obtenu plus de renseignement. Le seul élément qui est ressorti est l'importance des plasmides. Cependant, il n'y a pas de corrélation entre la distribution des plasmides et la maladie causée. De plus, cette technique n'est applicable qu'*in vitro*.

De plus, il a été montré que durant cette période de maladie systémique chez le porc, une épidémie de circovirus avait lieu. Alors, il est possible que l'apparition d'une maladie systémique provoquée par Typhimurium soit seulement une combinaison avec une infection avec le virus.

## Conclusion

Il a été démontré que la souche provenant de porc sain (1003) avait une adhérence supérieure à la souche provenant de porc malade (4395). L'inverse se produit pour l'invasion, la souche 4395 possède un pouvoir d'invasion supérieur à la souche 1003. Aussi, il a été remarqué qu'il n'y avait pas vraiment de différence lors de la phagocytose et la survie dans les macrophages humains. Alors, il est possible de dire que pour l'instant, aucun des éléments observés ne permet de différencier les deux souches de Typhimurium. Toutefois, seulement le côté acquisition de nouveau gène a été étudié. Il est possible que les souches provenant de porcs malades n'aient pas acquis des nouveaux facteurs de virulence, mais plutôt il y aurait une différence dans l'expression. Par exemple, il est connu que Typhi possède plusieurs pseudogènes, alors que ce pathogène est plus virulent pour l'Homme que peut l'être Typhimurium. Conséquemment, il est possible que les souches provenant de porcs malades aient une expression différente de certains gènes qui leur confère une virulence accrue ou les souches provenant de porcs sains aient perdu la capacité d'envahir les cellules et les organes. Pour observer la différence d'expression entre les deux souches de Typhimurium (1003 et 4395), les biopuces seraient un bon moyen de cribler le génome en entier. Ainsi, les gènes différemment exprimés lors d'infection de cellules épithéliales après 90 ou 180 minutes sont mis en évidence à l'aide de la technique SCOTS et mis sur biopuce par la suite. Finalement, le criblage permettrait d'obtenir les gènes qui sont fortement exprimés ou réprimés chez les souches provenant de porcs malades et de porcs

sains. Alors, la mutation de gène fortement exprimé durant une infection pourrait rendre la bactérie moins virulente. Donc, il est important de poursuivre la caractérisation de ces deux souches pour ainsi développer un potentiel vaccin pour l'industrie porcine.

## Bibliographie

1. Ahmer BM, Tran M, Heffron F. 1999. The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol* 181: 1364-8
2. Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, et al. 2007. High-affinity Zn<sup>2+</sup> uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 75: 5867-76
3. Basnyat B, Maskey AP, Zimmerman MD, Murdoch DR. 2005. Enteric (typhoid) fever in travelers. *Clin Infect Dis* 41: 1467-72
4. Bergeron N, Corriveau J, Letellier A, Daigle F, Lessard L, Quessy S. 2009. Interaction between host cells and septicemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolates from pigs. *J Clin Microbiol* 47: 3413-9
5. Bergeron N, Corriveau J, Letellier A, Daigle F, Quessy S. 2009. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates associated with septicemia in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research*
6. Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F. 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet Microbiol* 130: 1-19
7. Brandao RL, Castro IM, Bambirra EA, Amaral SC, Fietto LG, et al. 1998. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 64: 564-8
8. Butaye P, Michael GB, Schwarz S, Barrett TJ, Brisabois A, White DG. 2006. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes Infect* 8: 1891-7
9. Campoy S, Jara M, Busquets N, Perez De Rozas AM, Badiola I, Barbe J. 2002. Role of the high-affinity zinc uptake znuABC system in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence. *Infect Immun* 70: 4721-5
10. Carattoli A. 2003. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Issues Mol Biol* 5: 113-22

11. Chessa D, Dorsey CW, Winter M, Baumler AJ. 2008. Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *J Biol Chem* 283: 8118-24
12. Chiou CC, Chen TL, Tsao KC, Shih SR, Huang CG, et al. Detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus by allele discrimination. *Clin Chim Acta*
13. Chiu CH, Su LH, Chu C. 2004. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin Microbiol Rev* 17: 311-22
14. Chiu CH, Su LH, Chu CH, Wang MH, Yeh CM, et al. 2006. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 44: 2354-8
15. Chu C, Chiu CH. 2006. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. *Microbes Infect* 8: 1931-6
16. Chu C, Hong SF, Tsai C, Lin WS, Liu TP, Ou JT. 1999. Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars typhimurium, enteritidis, choleraesuis, and dublin. *Infect Immun* 67: 2611-4
17. Chu C, Wong DW, Wang MH, Lin HH, Chen YS, et al. 2009. Genotyping, Plasmid Analysis, and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans and Chickens in Central Taiwan. *J Formos Med Assoc* 108: 765-71
18. Collins HL. 2003. The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunol Lett* 85: 193-5
19. Cote S, Letellier A, Lessard L, Quessy S. 2004. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *Can J Vet Res* 68: 241-8
20. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. 2004. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* 82: 346-53
21. Czerucka D, Roux I, Rampal P. 1994. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. *Gastroenterology* 106: 65-72
22. Daigle F, Hou JY, Clark-Curtiss JE. 2002. Microbial gene expression elucidated by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Methods Enzymol* 358: 108-22

23. Danbara H, Moriguchi R, Suzuki S, Tamura Y, Kijima M, et al. 1992. Effect of 50 kilobase-plasmid, pKDSC50, of *Salmonella choleraesuis* RF-1 strain on pig septicemia. *J Vet Med Sci* 54: 1175-8
24. Darwin KH, Miller VL. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 12: 405-28
25. Demczuk W, Pankhurst R. 2006. Données de surveillance en laboratoire des entéropathogènes au Canada. In *Sommaire annuel 2006*, pp. Sommaire annuel 2006. Canada: Agence de la santé publique du Canada
26. Dudley EG. 2008. In vivo expression technology and signature-tagged mutagenesis screens for identifying mechanisms of survival of zoonotic foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Dis* 5: 473-85
27. Ellermeier CD, Schlauch JM. 2006. The Genus *Salmonella*. *Prokaryotes* 6: 123-58
28. Ernst RK, Guina T, Miller SI. 2001. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect* 3: 1327-34
29. Foley SL, Lynne AM. 2008. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci* 86: E173-87
30. Foster JW. 1995. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Crit Rev Microbiol* 21: 215-37
31. Francis KP, Taylor PD, Inchley CJ, Gallagher MP. 1997. Identification of the ahp operon of *Salmonella Typhimurium* as a macrophage-induced locus. *J Bacteriol* 179: 4046-8
32. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, et al. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev* 33: 718-38
33. Graham JE, Clark-Curtiss JE. 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
34. Guard-Petter J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environ Microbiol* 3: 421-30
35. Gulig PA, Curtiss R, 3rd. 1987. Plasmid-associated virulence of *Salmonella Typhimurium*. *Infect Immun* 55: 2891-901

36. Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M. 1993. Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* 7: 825-30
37. Gunn JS. 2008. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol* 16: 284-90
38. Handfield M, Brady LJ, Progulske-Fox A, Hillman JD. 2000. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. *Trends Microbiol* 8: 336-9
39. Hansen-Wester I, Chakravorty D, Hensel M. 2004. Functional transfer of *Salmonella* pathogenicity island 2 to *Salmonella bongori* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 72: 2879-88
40. Hantke K. 2005. Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr Opin Microbiol* 8: 196-202
41. Hapfelmeier S, Hardt WD. 2005. A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol* 13: 497-503
42. Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. 2008. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6: 53-66
43. Hautefort I, Hinton JC. 2000. Measurement of bacterial gene expression in vivo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 601-11
44. Helmuth R, Stephan R, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A, Bulling E. 1985. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect Immun* 48: 175-82
45. Huang Y, Leming CL, Suyemoto M, Altier C. 2007. Genome-wide screen of *Salmonella* genes expressed during infection in pigs, using in vivo expression technology. *Appl Environ Microbiol* 73: 7522-30
46. Humphrey T. 2001. *Salmonella* Typhimurium definitive type 104. A multi-resistant *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* 67: 173-86
47. Ina K, Kusugami K, Ohta M. 2003. Bacterial hemorrhagic enterocolitis. *J Gastroenterol* 38: 111-20
48. Jean SS, Wang JY, Hsueh PR. 2006. Bacteremia caused by *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 39: 358-65

49. Jones GW, Rabert DK, Svinarich DM, Whitfield HJ. 1982. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella* Typhimurium with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect Immun* 38: 476-86
50. Kaniga K, Compton MS, Curtiss R, 3rd, Sundaram P. 1998. Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* 66: 5599-606
51. Kent TH, Formal SB, Labrec EH. 1966. *Salmonella* gastroenteritis in rhesus monkeys. *Arch Pathol* 82: 272-9
52. Khan SA, Everest P, Servos S, Foxwell N, Zahringer U, et al. 1998. A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Mol Microbiol* 29: 571-9
53. Letellier A, Messier S, Quessy S. 1999. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. *J Food Prot* 62: 22-5
54. Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ. 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* 259: 686-8
55. Mazurkiewicz P, Tang CM, Boone C, Holden DW. 2006. Signature-tagged mutagenesis: barcoding mutants for genome-wide screens. *Nat Rev Genet* 7: 929-39
56. Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckert A. 2006. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect* 8: 1915-22
57. Nishino K, Latifi T, Groisman EA. 2006. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 59: 126-41
58. Olsen JE, Brown DJ, Thomsen LE, Platt DJ, Chadfield MS. 2004. Differences in the carriage and the ability to utilize the serotype associated virulence plasmid in strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium investigated by use of a self-transferable virulence plasmid, pOG669. *Microb Pathog* 36: 337-47
59. Pasquali P, Ammendola S, Pistoia C, Petrucci P, Tarantino M, et al. 2008. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking the ZnuABC transporter confers immune-based protection against challenge infections in mice. *Vaccine* 26: 3421-6
60. Patzer SI, Hantke K. 2000. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275: 24321-32

61. Paulin SM, Jagannathan A, Campbell J, Wallis TS, Stevens MP. 2007. Net replication of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Choleraesuis in porcine intestinal mucosa and nodes is associated with their differential virulence. *Infect Immun* 75: 3950-60
62. Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 155: 568-70
63. Poppe C, Smart N, Khakhria R, Johnson W, Spika J, Prescott J. 1998. *Salmonella* Typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Can Vet J* 39: 559-65
64. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2003. *Microbiologie: de Boeck*. 1137 pp.
65. Rabsch W, Tschape H, Baumler AJ. 2001. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect* 3: 237-47
66. Rediers H, Rainey PB, Vanderleyden J, De Mot R. 2005. Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 217-61
67. Rengarajan J, Bloom BR, Rubin EJ. 2005. Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8327-32
68. Rishi P, Jindal N, Bharrhan S, Tiwari RP. 2009. *Salmonella*-Macrophage Interactions upon Manganese Supplementation. *Biol Trace Elem Res*
69. Rout WR, Formal SB, Dammin GJ, Giannella RA. 1974. Pathophysiology of *Salmonella* diarrhea in the Rhesus monkey: Intestinal transport, morphological and bacteriological studies. *Gastroenterology* 67: 59-70
70. Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* 112: 1-10
71. Salyers AA, Whitt DD. 2002. *Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach*. Washington DC: ASM Press. 539 pp.
72. Santos RL, Zhang S, Tsohis RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ. 2001. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* 3: 1335-44

73. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. 2001. Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12712-7
74. Sassetti CM, Rubin EJ. 2003. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12989-94
75. Stecher B, Macpherson AJ, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. 2005. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. *Infect Immun* 73: 3228-41
76. Stirling J, Griffith M, Dooley JSG, Goldsmith CE, Loughrey A, et al. 2007. Zoonose Associated with Petting Farms and Open Zoos. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8: 85-91
77. Su LH, Chiu CH. 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J* 30: 210-9
78. Takeuchi A. 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am J Pathol* 50: 109-36
79. Threlfall EJ. 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev* 26: 141-8
80. Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S. 1996. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene* 173: 47-52
81. Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, Wannet WJ, Verbruggen AJ, et al. 2006. Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovars in The Netherlands. *Int J Antimicrob Agents* 28: 172-9
82. Wang RF, Kushner SR. 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100: 195-9
83. Wei JR, Rubin EJ. 2008. The many roads to essential genes. *Tuberculosis (Edinb)* 88 Suppl 1: S19-24
84. Yang W, Liu Y, Chen L, Gao T, Hu B, et al. 2007. Zinc uptake regulator (zur) gene involved in zinc homeostasis and virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Curr Microbiol* 54: 307-14

85. Yu CY, Chou SJ, Yeh CM, Chao MR, Huang KC, et al. 2008. Prevalence and characterization of multidrug-resistant (type ACSSuT) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains in isolates from four gosling farms and a hatchery farm. *J Clin Microbiol* 46: 522-6
86. Zhao S, McDermott PF, White DG, Qaiyumi S, Friedman SL, et al. 2007. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. *Vet Microbiol* 123: 122-32

## Annexe

**Tableau IX :** Résumé des gènes exprimés lors du premier SCOTS pour la souche 4395 dans les cellules épithéliales HeLa 180 minutes post-infection.

Clone	Nombre d'ORF	Descriptions		
A1	1	89 a.a. histidyl-tRNA synthetase [Desulfatibacillum alkenivorans AK-01]		
A2	3	35a.a. reduced viability upon starvation protein 161 [Candida dublinsiensis]	67a.a. plasmid mobilization protein MobA [E.coli]	42a.a. mobilization protein MobD [Salmonella choleraesuis]
A3	3	42a.a. unknown [E.coli]	59a.a. mobilization protein [E.coli]	54a.a. putative mob4 protein [E.coli]
A4	2	41a.a. hypothetical protein [Pectobacterium atrosepticum] Motif superfamille		84a.a. hypothetical protein A55_A0481 [Vibrio cholerae 1587]
A5 Plasmide #4 de 4395	3	51a.a. hypothetical protein BRAFLDRAFT_131352 [Branchiostoma floridae]	35a.a. Rien	52a.a. Rien
A6	0	Fait parti du clone 24 (deux clones différents possédant une même partie de fragment)		
A20	1	33a.a. Rien/ peut s'assembler avec le clone 1		
A22	3	46a.a. Rien	37a.a. mobilization protein 10 [Plasmid ColE1]	53a.a. Rien
A24	2	43a.a. Rien	52a.a. hypothetical protein pB_01 [Salmonella enteritidis]	
A25	2	34a.a. Rien	126a.a. DNA restriction subunit (type III restriction and modification system), similar to LlaFI [Erwinia tasmaniensis Et1/99]	

**Plasmide #4 de la souche provenant de porc malade 4395**

(3563 pb)

ACCATTGCATCAAGAATAGGTGTATCTAAAAGAACAATTCAACGCGGGGTTAG  
TAACCTAGAGGCATTGGGGATATTAAGTACCAATCAACAAGGAATGACC  
CTCTAACCAATGGCGCTAATATATTCGACTCAACTCCTCTAAAAGAATATTTAA  
ACAAAAAGCTAAAGGCATAACAATTAGCAACAGCAACAAAAAGAAAGAAAG  
AAAGAAAANNCGGAATTACACCCAACATAAAATTACCACGCATTTGCCCAAAA  
TGTTNGAAAATAAGCAACCAGCCACGAAGAAATTGTTAAATTTTTTGGCGT  
GCGAAAACAATGGCTGGGGAAATAATAAATTCATATTGCAAAGAATGCCGAG  
CTTCTGAAAAAGATCTATTTTAAACAGTTGACCATTTTTTATATGGCCAACTGC  
CCCCCACTCAAGTAAATGGGACTGTTTCTAACGCTCCCATTTACCATAACGTC  
TCATTACGCGCACCCGAGAACGCGCTGAACGCGATTCTGCCGCAAACACCCG  
AAAAATAGATGTTTTCCCGGGGTAAACCGGAAAAATGCGGCAGGATCGCTTT  
CAGCTCACTGCATAGCTATGTATGAAAGTGAATGGCGATCGGTTTGTGGGCTTA  
CGGCGTTCATACCGTCTGTTTTCGACAGTTTCCCTCCGGGAAGCTAATCTGCCA  
TAAGCCTGGATAACAGGGCCCGGTGATACTCCGTAATAGCTATCAGCACCTCC  
GCATACTCTCTGTCCCGACACGCTTGCCGTCGATAAAGAGTTTTTTCTGTAAC  
GCCCCAGCCTCATAACTTCTTTCAGTACCCGATCATCAGTCAGTGAGTTAACT  
TTCTTACCGAGAGCTGCCGCCCGTAAAAAACCGGAAACGGTCTTGCCGCATTC  
AGCAGCCCTTTTTCTGATTTCCCTGGTCTTCTTCTGCCGTCAGACGAACAGGGCG  
ACTGATAGCCCGCCTGCGCGTATTACTTCCACTTCGTTTTGTCATAAAACATGG  
CTCCGTATCTGACATGGGTGTGCGGGGCAAAGCCCTGACCAGGGTAATTGTAAT  
AGCGTGCATGTATGCGCGGTATAACAATTGCACATCCTGTCCTGTCNGCAAGCT  
CGAATTACCGACAAAAGCACGGCAGTTTTTTGGCAGTGACAGTGTTGTCTGAC  
AGAAATGCCCGTCAAAGAGTCAGACAGCAGAATACCGGCGGTAAAACAGTCG  
AAAAGTGGTACTCGATATAATCACACAACGCAGATGACAGAAAGAACGGAGA  
AAACAGAAAGATGAACAAGCAGCAGCAAACCGTACTCAACATGGCGGGATTC

ATAAAAAGCCAGAGCCTGAGGCTGCTCGAAAACTGGACGCACTTGATGCT  
GACGAACAGGCCGCCATGTGTGAGAAGCTGCACGAACTCGCGGAAGAACTTCA  
GAACAGCATAACAGACACGCTTTGAAGCGGAAAATCGCACCGGGATATAACGCA  
CCCGGACAGGATGCAGAACGGCATAGCGGAGCGTAAGGAGAAAATGCCACGT  
CAGACGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTTCGTTGACT  
GCGGCGAGCGGTGTCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAT  
CAGGGGATAACGCCGGAAGAACATGTGAGCAAAAAGCAAAGCACCGGAACA  
AGCCAGCGCCGATGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA  
AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATA  
CCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC  
GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT  
AGCTCACGCTGTTGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGC  
TGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT  
CGTCTTGAGTCCAACCCGGAAGACACGACTTAACGCCACTGGCAGCAGCCAT  
TGGTAACTGATTTAGAGGAGTTGAGTCTTGAAGTTATGCACCTGATAAGGCTAA  
ACTGAAAGAACAAGTTTTGGCGACTGTGCTCCTCAAAGCCAGTTACCTCGGTTC  
AAAGAGCGCCAACCTCTATGAACCTTCGAAAAACCGCCCGCCAAGGCGGTTTTT  
TCGTTTTCAACCTAGTTAGATTAATCTCCTTGCCTAGCTGCGTCAACAAAGCC  
TAACGACTTCTAGCCCTTCTTTGCCTGGTATTGGCAACAGCTCGCCATTCCTGA  
GGCCTTCTGGCTACAAGTACTCCATCTTTGTAGAACTCATCACGCATACAGCAG  
GCTCTCAAAGCATCATTCTTGATCTCCATACTTCTCGATGACAGAGAGCAGAGA  
TCTGTGCTCGCCTGATTCTCCCCGGAGGAGCTACAAGCCAAAGCTCTTTATTA  
GGGAATCGCTCTTACGTATCTAATAGGGGGGCATAAGTCAGAATCCGCAGT  
GATAATAATGGCTATATCATACTCATCATTACACGCAC**CAGACACTAGACT**  
**TATAGCCAAATTAACATCGGACTCTTTTTCTTCATGCTTATGGA**  
**AACTCCACCACATCCATTATCAGCTTCGCACGTTACATTCTTT**  
**TTTTTAAAACGTCCACCGATAACATCAACACCACATTCGGTTAA**  
**AGCGTTAGTGTAATTTTGATAATTTTCATTTATGGCTCTTGATA**  
**AATGTGATGGCTTAGCGGAAAACCAAAAAACATTATCAATAGA**

**TGCATTTTTAGGAAGGTATCTCTTGCATAAAGATTTAAGATCA  
ACCCAATGAAGAGCTTTATTACCAGTCTCTTCNATTGCATGATA  
TAAATTATACCCATCAATAAAGCACTGCACTCGCTTTGTTTTTA  
CTTCGATTTGCTCAGTAGTTTGTGTTGTGGTTGCTGCTCTGTTTCCATA  
CTTGCCATTTTTGACCTCTAGATAGCAAAAAGGCCTGCATATGCAGGCCTTTTT  
GCGTCTCTTAACCGCAGTTAACAGACCACTGTATGGACGCATCCAATACAGGA  
AGAATTTTGTACAATGCGCTTCCAAGCCTCGACTTGGATAGCCACTAAGAGCAT  
AACTCTTAGGTAGTGGACTCAACTTAAGTTCTATATAAAAAAAGAGCAAATGG  
ATGACATTTATGTCATCCTAAAAGATACATGTTACTACCTAACTACTCTTATATT  
AAGAGTAGTTAGGTAGTAACTGTTACATTTTGGATTTTTTTTTTCGCGAGAAAAG  
CATCTATGAGCACAAAAACGCACAGAAAGAACAAAAAAAAGAGTCATTAAT  
CACTACTCACTGGGGAGATGATGCAACCATACATGGGTGGACGGCTATACCAA  
ATAGCCTCCTTATGCTGCAAGGTGATCTTGGTATTGGGAGTACTGAGATGTGTA  
TTCTGCTGAATATATTGATGCATCAATGGCCTGAGTCAGGGGAGTCAATATCTT  
TTCCGTCAATTGGTACCATT**

