

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Implication des gènes de *Salmonella enterica* sérovar Typhi dans les
différentes étapes d'infection**

par
Maxime Béland

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Microbiologie et immunologie



Juin 2008

©, Maxime Béland, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Implication des gènes de *Salmonella enterica* sérovar Typhi dans les
différentes étapes d'infection**

présenté par :
Maxime Béland

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Patrick Hallenbeck
président-rapporteur

Dre. France Daigle
directrice de recherche

Dr. Hervé LeMoual
membre du jury

RÉSUMÉ

Salmonella enterica sérovar Typhi (Typhi) est l'agent étiologique de la fièvre typhoïde. Annuellement, Typhi infecte 21 millions de personnes et 200 000 succomberont à cette infection. Plusieurs études ont permis d'identifier des facteurs de virulence des salmonelles essentiels à sa survie dans les macrophages, soit une étape primordiale pour l'établissement de la fièvre typhoïde. Sachant que Typhi survit mieux dans les macrophages humains que dans les macrophages murins, nous avons émis l'hypothèse que Typhi possède des gènes différentiellement exprimés lui permettant de survivre chez l'humain. Nous avons utilisé une technique basée sur l'expression différentielle des gènes de Typhi lors d'une infection de macrophages nous permettant d'identifier des gènes de Typhi qui sont plus induits dans les macrophages humains que dans les macrophages murins. Parmi ces gènes, nous avons caractérisé l'implication du gène *sty0159* et de la région unique à Typhi *sty1358-1367*. La mutation de ces régions n'a toutefois pas affecté la survie de Typhi dans les macrophages. Dans un deuxième temps, nous avons remarqué l'expression tardive des gènes d'invasion des salmonelles (SPI-1) durant une infection de macrophages humains. Ainsi, nous voulions caractériser leur implication au niveau de la survie des salmonelles dans les macrophages. La mutation des gènes de SPI-1 a causé une augmentation significative du taux de survie des salmonelles dans les macrophages. Cette augmentation de survie des salmonelles mutantes pour les gènes de SPI-1 ne résulte pas d'une sur-expression des gènes de survie des salmonelles SPI-2. Bref, ces résultats ont accentué nos connaissances de la pathogenèse de Typhi.

Mots clés : *Salmonella enterica* sérovar Typhi, fièvre typhoïde, humain spécifique, « Differential fluorescence induction », GFP, macrophages humains, macrophages murins, SPI-1, SPI-2.

ABSTRACT

Typhoid fever is a systemic infection caused by a human restricted pathogen called *Salmonella enterica* serovar Typhi (Typhi). Annually, Typhi infects 21 million individuals and 200 000 of them will die from this infection. Many studies identified virulence factors of Typhi essential for its survival in macrophages, which is a key step in the establishment of typhoid fever. Since Typhi can survive in human macrophages, but cannot survive in murine macrophages, we hypothesized that Typhi differentially regulates its genes within these two hosts. We used a technique called differential fluorescence induction by which we identified genes that were more induced in human than in murine macrophages. From these genes we characterized gene *sty0159* and region *sty1358-1367*, which is unique to Typhi. The mutation of these two regions did not affect the survival of Typhi in macrophages. Then, we noticed that *Salmonella's* invasion genes (SPI-1) were induced late during infection of macrophages. The mutation of the SPI-1 genes significantly increased the survival of *Salmonella* in human and murine macrophages, suggesting that the invasion genes might inhibit the expression of the survival associated genes (SPI-2). To check this hypothesis, we investigated the expression of SPI-2 genes in the SPI-1 mutant and in the wild-type strains of Typhi. The expression of the survival associated genes showed a similar expression in both strains, demonstrating that SPI-1 genes do not negatively regulate survival genes. In summary, these results give us new insights on the pathogenesis of Typhi.

Key words: *Salmonella enterica* serovar Typhi, typhoid fever, human restricted pathogen, « Differential fluorescence induction », GFP, human macrophages, murine macrophages, SPI-1, SPI-2.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ANNEXES	xi
ABBRÉVIATIONS ET SIGLES	xii
REMERCIEMENTS	xviii
ANNEXES	xix
1. Revue de littérature	1
1.1. <i>Salmonella</i>	1
1.1.1. Nomenclature.....	1
1.1.2. Spécificité d'hôte de <i>Salmonella enterica</i>	2
1.1.3. Modèle de typhoïde murine.....	3
1.1.4. Génomes de Typhi et Typhimurium.....	3
1.1.5. Maladie — Situation globale.....	4
1.1.6. Infection.....	6
1.1.7. Lutttes et traitements.....	9
1.1.8. Émergence de souches multirésistantes.....	10
1.1.9. Vaccins.....	11
1.2. Facteurs de virulence.....	12
1.2.1. Système à deux composantes.....	12
1.2.1.1. PhoP/PhoQ.....	13
1.2.1.2. PmrA/PmrB.....	15
1.2.1.3. EnvZ/OmpR.....	15

1.2.2.	Adhérence	16
1.2.3.	Système de sécrétion de type 3 (SST3)	17
1.2.4.	Îlots de pathogénicité des salmonelles	18
1.2.4.1.	SPI-1 – Invasion	18
1.2.4.2.	SPI-2 – Survie intracellulaire.....	26
1.2.4.3.	Autres îlots de pathogénicité des salmonelles	31
1.2.5.	Résistance aux chocs acides	36
1.2.6.	Pyroptose	37
1.3.	Interaction hôte-pathogène	39
1.3.1.	Peptides antimicrobiens.....	39
1.3.2.	Composés oxydatifs toxiques	40
1.3.3.	Composés nitriques toxiques.....	40
1.3.4.	Limitation nutritionnelle macrophages-dépendants	41
1.4.	Étude génétique	42
1.4.1.	« In Vivo Expression Technology ».....	42
1.4.2.	« Signature-Tagged Mutagenesis »	43
1.4.3.	« Differential Fluorescence Induction »	45
1.4.4.	« In Vivo-Induced Antigen Technology »	46
1.4.5.	« Selective Capture Of Transcribed Sequences » - Biopuces.....	47
1.5.	Fluorescence	48
1.5.1.	Protéine verte fluorescente – « Green Fluorescent Protein »	49
1.5.2.	Protéine rouge fluorescente - « <i>Discosoma striata</i> Red »	50
2.	But - Hypothèses	52
3.	Matériels et Méthodes.....	53
4.	Chapitre I : Caractérisation des clones obtenus par « Differential Fluorescence Induction »	66
4.1.	Introduction	66
4.2.	Résultats.....	66
4.3.	Discussion	75

5. Chapitre II : Implication des gènes de SPI-1 durant la phase intracellulaire d'une infection de macrophages	81
5.1. Introduction	81
5.2. Résultats.....	81
5.3. Discussion	91
6. Discussion.....	96
6.1. Caractérisation des clones obtenus par « Differential fluorescence induction »	96
6.2. Implication des gènes de SPI-1 durant la phase intracellulaire d'une infection de macrophages.....	99
7. Conclusions	102
8. Références	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Résumé des fonctions associées aux effecteurs de SPI-1	25
Tableau II : Souches bactériennes utilisées	53
Tableau III : Séquence des amorces pour chacun des gènes testés en PCR en temps réel.....	63
Tableau IV : Séquences des amorces utilisées pour effectuer les mutations par échange allélique des gènes <i>sty0159</i> , <i>sty1358-1367</i> et <i>invA</i>	65
Tableau V : Ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 de 14 clones sélectionnés à 2 et 24 h post-infection.....	70
Tableau VI : Gènes et fonctions des gènes associés à chacun des clones triés par DFI	72
Tableau VII : Ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 des clones triés à 2 h post-infection.....	xviii
Tableau VIII : Ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 des clones triés à 24 h post-infection	xix

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution mondiale de la fièvre typhoïde.....	5
Figure 2 : Ondulation cellulaire orchestrée par les salmonelles lors de l'invasion des cellules épithéliales	6
Figure 3 : Pathogénèse de Typhi.....	9
Figure 4 : Systèmes à deux composants présents chez les salmonelles	13
Figure 5 : Fimbriae <i>fim</i> de Typhimurium.....	17
Figure 6 : Phylogénie des salmonelles	19
Figure 7 : Îlot de pathogénicité 1 des salmonelles	19
Figure 8 : SST3-1 des salmonelles.....	20
Figure 9 : Régulation des gènes de SPI-1	23
Figure 10 : SST3-2 des salmonelles.....	27
Figure 11 : Implication des protéines SifA, SseF et SseG dans la formation des sifs.....	28
Figure 12 : Implication de <i>sifA</i> de Typhimurium dans l'intégrité membranaire de la SCV durant une infection de macrophages murins	30
Figure 13 : Schématisation de la technique IVET	43
Figure 14 : Schématisation de la technique STM.....	44
Figure 15 : Schématisation de la technique DFI.....	45
Figure 16 : Schématisation de la technique IVIAT	47
Figure 17 : Représentation du vecteur pBBR1-GFP.	57
Figure 18 : Induction in vivo de la GFP de la banque initiale de Typhi	67
Figure 19 : Enrichissement de la banque de clones de Typhi à 2 h post-infection.....	69
Figure 20 : Intensité de fluorescence de 7 clones de Typhi sélectionnés lors d'une infection de macrophages humains.....	71

Figure 21 : Ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 évalué en PCR en temps réel	73
Figure 22 : Implication du gène <i>sty0159</i> et de la région <i>sty1358-1367</i> au niveau de la survie à 2 et 24 h de Typhi dans les macrophages	75
Figure 23 : Expression des gènes de SPI-1	82
Figure 24 : Mutation des gènes de SPI-1 chez Typhi et Typhimurium	83
Figure 25 : Effet de la mutation des gènes de SPI-1 lors d'une infection de macrophages THP-1	86
Figure 26 : Infection de macrophages THP-1 avec différents sérovars de <i>Salmonella enterica</i>	87
Figure 27 : Effet de la mutation des gènes de SPI-1 lors d'une infection de macrophages RAW 264.7	89
Figure 28 : Expression des gènes de SPI-2	90
Figure 29 : Expression des gènes de SPI-1	xxi

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 des clones triés à 2 h post-infection.....	xviii
Annexe 2 : Ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 des clones triés à 24 h post-infection.....	xix
Annexe 3 : Expression des gènes de SPI-1	xxi
Annexe 4 : The presence of the <i>tet</i> gene from cloning vectors impairs <i>Salmonella</i> survival in macrophages.....	xxii

ABBRÉVIATIONS ET SIGLES

%GC	Pourcentage en guanine/cytosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ASPs	« Acid shock proteins »
ATP	Adénosine tri-phosphate
ATR	« Acid tolerance response »
°C	Degré Celsius
Ca ²⁺	Ions calcium
CCMB	« Calcium manganese base »
C _t	« Crossing threshold »
DAP	« DL- α,ϵ -diaminopimelic acid »
DEPC	Diéthyle pyrocarbonate
DFI	« Differential Fluorescence Induction »
DL50	Dose létale 50%

DMEM	« Dubelcco's modified eagle's medium »
D.O.	Densité optique
DsRed	« <i>Discosoma striata</i> Red »
FACS	« Fluorescence-activated cell sorting »
FITC	« Fluorescein isothiocyanate »
GFP	« Green fluorescence protein »
GTPase	Guanosine Tri-Phosphatase
IL-1 β	Interleukine 1 β
IL-8	Interleukine 8
IL-18	Interleukine 18
IVET	« In vivo expressed technology »
IVIAT	« In vivo induced antigen technology »
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
LPS	Lipopolysaccharides
Mb	Mégabases

Mg ²⁺	Ions magnésium
mV	Millivolt
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
NO	Oxyde nitrique
NRAMP	« Natural resistance-associated macrophage protein »
PA	Peptides antimicrobiens
PAT	Protéines activatrices de la transcription
pb	Paires de bases
PBS	« Phosphate buffered saline »
PBS-DOC	« Phosphate buffered saline – deoxycholic acid »
PCR	« Polymerase chain reaction »
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
RFP	« Red fluorescent protein »
RPMI	« Roswell Park Memorial Institute »
s	secondes

SCOTS	« Selective Capture Of Transcribes Sequences »
SCV	« <i>Salmonella</i> containing vacuole »
SDC	Systèmes à deux composantes
Sifs	« <i>Salmonella</i> -induced filaments »
SNT	Salmonelles non-typhoïdiques
SPI	« <i>Salmonella</i> pathogenicity island »
SST3	Système de sécrétion de type trois
SST3-1	Système de sécrétion de type trois SPI-1 dépendant
SST3-2	Système de sécrétion de type trois SPI-2 dépendant
STM	« Signature-tagged mutagenesis »
T _m	« Melting temperature »
UFC	Unité formatrice de colonies
Zn ²⁺	Ions Zinc

À Michèle, Pierre et Pierre-Marc

« If your ain't first, your last »

Ricky Bobby
Talladega Nights: The ballad of Ricky Bobby, 2006

REMERCIEMENTS

France, j'aimerais te remercier pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire, pour m'avoir donné toute la latitude et l'indépendance que j'ai pu te demander et l'incroyable expérience en laboratoire. En restant modeste, comme je l'ai toujours été, tu m'as permis d'obtenir mon diplôme de maîtrise, mais également une expérience en laboratoire que peu d'étudiants gradués vont avoir en sortant de leur maîtrise, merci beaucoup. Continue ton bon travail d'encadrement et de recherche!!

Malgré tout, France, tu n'es pas la seule à avoir contribué à ma maîtrise. Seb, Kath, Chantal, Marthe, petit-Seb, Christine, vous méritez également un gros merci, pour les précieux conseils que vous m'avez prodigués, pour les moments mémorables (Halloween, les vins et fromages, les partys de Noël,...), pour les vendredis soir dans le bureau à discuter autour d'une bière, pour les diners sushi ou pour m'avoir redonné confiance en moi en vous laissant battre au volley-ball et au badminton. Bonne chance à vous tous pour la continuation de vos études et bonne chance à toi Kath comme professeure, vous êtes les meilleurs!!

J'ai toujours pensé que les petits accotés de la vie quotidienne de laboratoire étaient primordiaux pour la réussite de ma maîtrise. Dans ce sens, un gros merci à la grande famille des cyclones pour les merveilleux moments sur la patinoire, à Québec et à Victoriaville en votre compagnie. Marie, tu mérites également ta place sur cette page. Un gros merci pour LE « trip » que nous avons vécu ensemble en Scandinavie ce qui m'a permis d'entreprendre ma maîtrise du bon pied. Maryse, merci pour ces belles vacances au Portugal et en Espagne ainsi que tes conseils en microscopie électronique.

En terminant, un merci tout spécial à ma famille qui tout au long de ces années d'études a toujours été derrière moi dans les bons comme dans les moins bons moments d'où la raison pour laquelle je vous dédie mon mémoire.

ANNEXES

1. Revue de littérature

Historiquement, plusieurs pandémies bactériennes ont fait des ravages à travers le monde telle que la pandémie de peste noire causée par *Yersinia pestis* au 14^e siècle (243). Plus récemment, de nouvelles vagues d'infections bactériennes ont été médiatisées telles que les infections nosocomiales à *Clostridium difficile*, la maladie du hamburger causée par *Escherichia coli* O157 :H7 et la fièvre typhoïde causée par *Salmonella enterica* sérovar Typhi qui tue annuellement plusieurs centaines de milliers de personnes (61). Pour contrer ces fléaux, l'étude de ces bactéries pathogènes est primordiale. Depuis plus d'un siècle, les chercheurs étudient les salmonelles puisque celles-ci se sont avérées et s'avèrent toujours un excellent modèle pour l'étude de la génétique bactérienne, des mécanismes bactériens fondamentaux et, plus récemment, des concepts liés à l'interaction hôte-pathogène.

1.1. *Salmonella*

Tout comme plusieurs bactéries d'importance médicale : *Escherichia coli* O157 :H7, *Shigella dysenteriae* et *Yersinia pestis*, les salmonelles appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les salmonelles sont des bacilles à coloration GRAM négative, intracellulaires facultatives, mésophiles et mobiles.

1.1.1. Nomenclature

La nomenclature des salmonelles s'avère assez complexe. En 2005, le « Judicial Commission of the International Committee for Systematics of Prokaryotes » a reconnu la présence de seulement deux espèces dans le genre *Salmonella* soit *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica* (244). Toutefois, *Salmonella enterica* se subdivise en plus de 2500 sérovars qui eux-mêmes ont été

classés en 6 sous-espèces : *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) et *indica* (VI) (156, 244, 265). Les sérovars de *Salmonella enterica* sont donc connus sous le nom de *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sérovar Typhi (Typhi) ou *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sérovar Typhimurium (Typhimurium) par exemple.

1.1.2. Spécificité d'hôte de *Salmonella enterica*

Moins formellement, les sérovars de *Salmonella enterica* peuvent être encore subdivisés selon leur spectre d'hôte. Certains sérovars ont un spectre d'hôte unique, d'autres sont adaptés à un hôte en particulier, mais ont également la capacité d'infecter d'autres hôtes et, finalement, la majorité des sérovars de *Salmonella enterica* ont la capacité d'infecter un large spectre d'hôte. Parmi les sérovars ayant un spectre d'hôte unique, on retrouve Typhi qui présente une spécificité d'hôte pour l'homme (268). Outre Typhi, les sérovars Paratyphi A et C, Gallinarum, Pullorum et Abortusovis sont également des sérovars de *Salmonella enterica* ayant un spectre d'hôte unique infectant respectivement l'être humain, la volaille, les dindes et les ovins (66, 79, 156, 271, 284). Les sérovars Choleraesuis, Dublin et Arizonae sont respectivement adaptés aux ruminants, aux porcs et aux reptiles, mais ces sérovars causent également des maladies chez différents animaux (50, 79, 156, 284, 298). Les sérovars hôte spécifique et hôte adapté ne représentent qu'une infime partie des sérovars de *Salmonella enterica*. Selon l'agence de santé publique du Canada, près de 2000 sérovars sont connus pour causer une maladie chez l'humain en plus d'être responsables de diverses maladies chez d'autres animaux (45). Ce groupe comprend notamment les sérovars Typhimurium et Enteritidis, soit les deux sérovars les plus souvent isolés des gastro-entérites humaines (265).

Le concept de spécificité d'hôte a été démontré de façon élégante par l'étude de Schwan *et al.* en 2000 (268). Ces derniers ont utilisé différentes souches de Typhi et de Typhimurium pour infecter des lignées cellulaires de macrophages

humains et murins. Leurs résultats montrent que Typhi survit et se multiplie à l'intérieur des macrophages humains contrairement à Typhimurium (268). Inversement, Typhi survit moins bien que Typhimurium aux infections de macrophages murins (268).

1.1.3. **Modèle de typhoïde murine**

Malgré son importance médicale mondiale, l'étude de Typhi s'avère difficile puisqu'aucun modèle animal adéquat, autre que l'homme, n'a été identifié. De son côté, Typhimurium a été largement étudié puisqu'il a la capacité d'infecter plusieurs hôtes. En effet, Typhimurium peut infecter l'homme et causer une gastro-entérite, mais il peut également infecter les souris causant, non pas une gastro-entérite, mais une maladie systémique mortelle similaire à la maladie causée par Typhi chez l'homme (110). Par conséquent, les données recueillies lors d'infections de souris ou de lignées cellulaires de souris par Typhimurium (modèle de typhoïde murine) ont beaucoup été utilisées et le sont encore pour tenter d'élucider les principes de la pathogénie de Typhi chez l'humain. Ainsi, la plupart des concepts de virulence connus chez Typhi dans le cadre de la fièvre typhoïde ont été extrapolés du modèle de typhoïde murine (150, 226, 310). Toutefois, ces deux sérovars pathogènes causent des maladies distinctes dans des hôtes différents et les données recueillies avec le modèle de typhoïde murine doivent être interprétées avec un certain recul.

1.1.4. **Génomes de Typhi et Typhimurium**

Depuis quelques années, l'avancement des technologies a rendu possible le séquençage de génomes de plusieurs bactéries. Les génomes de Typhi et de Typhimurium ont été séquencés, ce qui a facilité l'étude de ces deux sérovars. Leur génome contient environ 4,8 Mb codant pour environ 4600 gènes (200, 232). Ces derniers présentent un pourcentage en guanine – cytosine (%GC) d'environ 52 % suggérant fortement la présence d'un ancêtre commun et une séparation récente

sur l'arbre phylogénique. Sur le plan comparatif, les génomes de Typhi et Typhimurium présentent une similarité d'environ 89 % (200, 232). Les différences se situent principalement au niveau des séquences uniques à chacun des sérovars telles que certains îlots de pathogénicité ou certains prophages, de la présence de nombreux pseudogènes dans le génome de Typhi et de la présence de séquences extrachromosomiques (voir section 1.2.4.3). Ces différences se retrouvent au centre des hypothèses tentant d'expliquer le spectre d'hôte unique de Typhi et multiple de Typhimurium.

1.1.5. Maladie — Situation globale

En règle générale, on associe deux maladies humaines bien distinctes aux salmonelles soit une gastro-entérite ou une infection systémique. Ces deux maladies représentent un pourcentage important des toxi-infections bactériennes à travers le monde (62, 216, 280). Habituellement sans conséquence, la gastro-entérite est majoritairement causée par les salmonelles non typhoïdiques (SNT) : Typhimurium et Enteritidis (265). Cette maladie est caractérisée par une très courte période entre l'ingestion des salmonelles et l'apparition des premiers symptômes. Ceux-ci apparaissent de 8 à 72 heures suivant l'ingestion et se retrouvent généralement sous la forme de nausées et de vomissements (55). Ces symptômes s'estompent généralement en l'espace d'une semaine, mais les personnes infectées restent généralement colonisées pour une période de trois mois (263). Ceux-ci s'avèrent d'excellents disséminateurs des SNT. Rarement chez les gens en santé ou dans près de 80 % des patients immunosupprimés, la gastro-entérite peut progresser en infection systémique mortelle si elle n'est pas traitée (voir section 1.1.7) (46, 155).

La seconde maladie associée aux salmonelles s'avère nettement plus sérieuse et dangereuse que la gastro-entérite causée par les SNT. Cette maladie est une infection systémique, nommée fièvre typhoïde, principalement causée par Typhi, mais également par les sérovars Paratyphi A et C de *Salmonella enterica*

(31). En 2004, l'organisation mondiale de la santé estimait que plus de 21 millions de personnes étaient infectées par Typhi annuellement à travers le monde, et que plus de 200 000 succomberaient de cette infection (61). Dans les pays industrialisés, l'incidence de la fièvre typhoïde est nettement moins marquée, résultant en forte majorité de voyageurs ayant contracté la maladie dans les

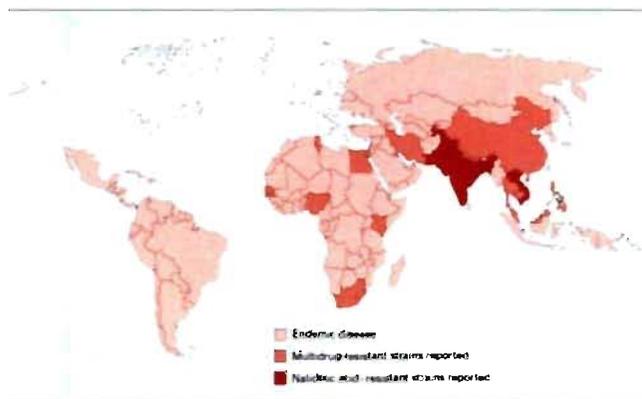


Figure 1 : Distribution mondiale de la fièvre typhoïde. Zones blanches sont pratiquement exemptes de cas de fièvres typhoïde. Zones oranges présentent une incidence moyenne quant aux nombres de cas de fièvres typhoïde. Zones rouges présentent une forte incidence quant aux nombres de cas de fièvres typhoïde (58).

régions endémiques (figure 1) (31 , 58). Inversement, l'incidence importante de la fièvre typhoïde dans les pays en voie de développement résulte de leurs installations sanitaires déficientes, de leur piètre qualité d'eau potable et de leurs régions surpeuplées (figure 1) (58).

Les symptômes associés à la fièvre typhoïde diffèrent de ceux retrouvés dans le cas de gastro-entérites causées par les SNT. Les premiers signes cliniques de la fièvre typhoïde ne sont généralement visibles que 3 semaines après la contamination (58, 226). Comme son nom l'indique, la fièvre est un signe clinique très important qui s'échelonne sur une dizaine de jours et peut s'accompagner de maux de tête sévères, de frissons, de périodes de délire, de douleurs abdominales, d'un gonflement de la rate et du foie, dans certains cas, de diarrhées passagères ou de constipations et la présence de taches rosées sur le tronc (45, 58, 226). Cette maladie nécessite l'hospitalisation du patient sans quoi, des complications majeures comme la perforation de l'intestin, ainsi que des saignements gastro-intestinaux peuvent survenir (voir section 1.1.7) (58, 234). Une fois l'infection guérie, environ 1 patient sur 5 continue à excréter Typhi, et ce, pour une période

pouvant être supérieure à un an (95, 234). Ces porteurs asymptomatiques sont ainsi une cause importante de la dissémination de Typhi dans l'environnement.

1.1.6. Infection

Au niveau de l'infection, les deux maladies causées par les salmonelles sont transmises par la voie fécale orale. Par conséquent, la voie d'entrée de prédilection des salmonelles est la voie orale résultant principalement de la consommation d'aliments ou d'eau contaminés (66, 90). Entre 100 et 1000 salmonelles sont suffisantes pour causer une gastro-entérite ou une fièvre typhoïde (35, 45).

Suite à l'ingestion, les salmonelles passent l'estomac pour se retrouver dans le petit intestin. À cet endroit, les salmonelles doivent traverser le mucus intestinal pour interagir avec les cellules épithéliales par le biais de molécules favorisant l'adhésion cellulaire (figure 3A) (voir section 1.2.2) (23, 101, 150, 226, 312). Le rapprochement entre les salmonelles et les cellules épithéliales facilite l'invasion subséquente des cellules épithéliales par les salmonelles. Deux processus ont été décrits pour caractériser l'invasion et le passage de la barrière intestinale par les salmonelles. La barrière intestinale étant composée de cellules non phagocytaires : des entérocytes et des cellules M, les salmonelles induisent leur invasion en créant une ondulation cellulaire similaire aux pseudopodes observés durant la phagocytose (voir section 1.2.4.1) (figure 2) (99, 106, 107, 109, 125, 158, 171, 278). Les salmonelles peuvent également traverser la barrière intestinale conjointement avec les cellules CD18 positives (cellules phagocytaires) de l'hôte (290). Le passage de la barrière intestinale mène les salmonelles dans la *lamina propria* intestinale où celles-ci doivent



Figure 2 : Ondulation cellulaire orchestrée par les salmonelles lors de l'invasion des cellules épithéliales (226).

faire face aux cellules immunitaires de l'hôte et c'est à cet endroit que les destinées de Typhi et Typhimurium divergent.

La gastro-entérite causée par les SNT est dépendante de l'invasion cellulaire, d'un influx massif et rapide de neutrophiles dans la lumière intestinale et d'une sécrétion massive et rapide de fluide causant ainsi la diarrhée tôt après l'infection (122, 123, 278). L'invasion des cellules épithéliales par les SNT provoque la sécrétion basolatérale de chémokines importantes soit l'IL-8 et le « pathogen-elicited epithelial chemoattractant » pour le recrutement des neutrophiles et la transmigration de ceux-ci à travers la barrière intestinale respectivement (76, 201, 202, 204). Toutefois, l'invasion des cellules épithéliales n'est pas suffisante pour causer la sécrétion de ces deux chémokines comme en fait foi les infections causées par Typhi qui ne sont pas connues pour créer un influx de neutrophiles dans la lumière intestinale, malgré la capacité de cette dernière à envahir les cellules épithéliales (203, 299). Selon Giannella *et al.* et Eckmann *et al.*, la sécrétion apicale de prostaglandines et de D-*myo*-inositol-1,4,5,6-tetrakisphosphate par les cellules épithéliales et les neutrophiles est responsable de la sécrétion massive de fluide causant subséquentement la diarrhée (77, 78, 124). Ces deux molécules causent une augmentation de la sécrétion apicale d'ions chlorure provoquant une importante sécrétion de fluide vers la lumière intestinale (77, 123, 124, 165). Les détails du cycle d'infection suivant la sécrétion de fluide orchestrée par les SNT chez l'humain sont toujours obscurs, mais l'étude de Schwah *et al.* a montré que les SNT n'ont pas la capacité de survivre à l'intérieur des macrophages humains empêchant leur dissémination systémique (268).

Contrairement à la gastro-entérite causée par les SNT, la fièvre typhoïde résulte d'une invasion systémique par Typhi (figure 3). Telle que mentionnée précédemment, l'absence de modèle animal adéquat pour l'étude de Typhi a mené à l'utilisation du modèle de typhoïde murine pour comprendre les différentes étapes de progression systémique de Typhi. Malgré tout, les détails exacts de cette progression systémique de Typhi chez l'humain demeurent obscurs. Contrairement aux SNT qui induisent une réponse inflammatoire, Typhi n'induit pas cette réponse

durant la phase intestinale expliquant l'absence de neutrophiles et de diarrhées dans les cas de fièvres typhoïdes (122, 123, 173, 203, 247, 299). Suite à l'invasion des cellules épithéliales, Typhi se retrouve dans la *lamina propria* et doit faire face aux cellules immunitaires de l'hôte (figure 3B). Selon l'hypothèse générale, les salmonelles utiliseraient les macrophages pour se multiplier et atteindre les nodules lymphatiques mésentériques lui permettant d'entrer et se disséminer vers les organes systémiques comme la rate, le foie et la vésicule biliaire par le biais de la circulation sanguine (figure 3C) (31, 88, 156, 217). Drecktrah *et al.* ont étudié différents modes d'entrée de Typhimurium dans les macrophages murins (73). L'induction de leur propre invasion dans les macrophages conduit les salmonelles dans une organelle similaire aux phagosomes nommée : « *Salmonella* containing vacuole » (SCV). À l'intérieur de la SCV, Typhimurium induit une acidification permettant une expression optimale des gènes de survie comparativement à un mode d'internalisation induit par l'hôte (phagocytose) (73). Les phagosomes sont normalement utilisés par l'hôte pour détruire les envahisseurs par la voie endosome-lysosome. Toutefois, cette voie est inhibée par les salmonelles se retrouvant dans les SCV (voir section 1.2.4.2) (282). Suite à la colonisation des organes systémiques, les salmonelles peuvent retourner dans le tractus intestinal favorisant leur propagation dans l'environnement, mais également la réinfection des cellules de la barrière intestinale de la partie distale du petit intestin (figure 3D-E). Cette seconde infection de la barrière intestinale provoque une réponse immunitaire secondaire plus immunogénique que la première créant de l'inflammation, des ulcérations et la nécrose de l'épithélium menant généralement à une perforation du tractus intestinal mortelle si elle n'est pas traitée chirurgicalement (31, 33, 44, 88, 221). Malgré les clarifications amenées par le modèle de typhoïde murine, beaucoup d'étapes dans le cycle d'infection de Typhi et de sa progression systémique restent obscures.

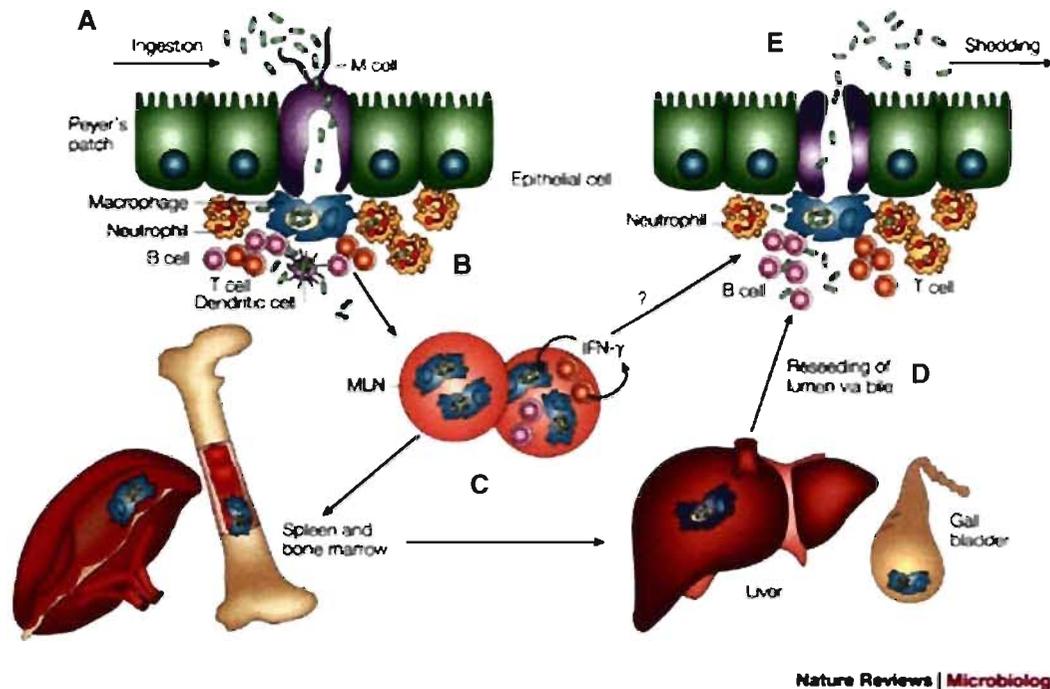


Figure 3 : Pathogénèse de Typhi (217). **A :** Invasion de la barrière intestinale. **B :** Phagocytose de Typhi par les cellules immunitaires de l'hôte. **C :** Dissémination vers les organes systémiques. **D :** Retour dans la lumière intestinale via la bile. **E :** Seconde infection de la barrière épithéliale et excrétion de Typhi.

1.1.7. Luites et traitements

La lutte contre Typhimurium est très diversifiée puisqu'elle peut se faire à différents niveaux. Typhimurium étant une bactérie pathogène pouvant être portée asymptomatiquement par plusieurs animaux dans les élevages, les producteurs peuvent utiliser des antibiotiques pour prévenir la contamination animale (11). L'utilisation d'antibiotiques à ce niveau permet de contenir la dissémination de Typhimurium avant même que celle-ci n'entre en contact avec l'homme. Dans le cas où la nourriture ingérée est contaminée par Typhimurium, aucun traitement antibiotique n'est nécessaire sachant que ce malaise intestinal se résorbe avec le temps (157 , 216). Dans l'éventualité où la gastro-entérite progresse en infection systémique, un traitement aux fluoroquinolones s'avère alors nécessaire sans quoi, les patients peuvent subir un choc septique mortel (257). L'élimination des

symptômes associés aux infections systémiques à *Typhimurium* ne constitue pas la fin de la lutte contre cette bactérie pathogène sachant que certains patients restent porteurs (263). Par conséquent, le prolongement des traitements antibiotiques peut être nécessaire (72, 239, 256).

Typhi étant une bactérie pathogène mortelle, les traitements antibiotiques sont inévitables. En règle générale, les fluoroquinolones sont utilisés pour combattre l'infection (234, 235). Le régime d'antibiotiques aux fluoroquinolones dure minimalement 3 jours dans les régions où ces antibiotiques sont plus difficiles à acquérir sinon ce traitement s'échelonne sur une dizaine de jours (233). Due à l'apparition de souches multirésistantes, la combinaison entre différents antibiotiques de la famille des céphalosporines ou des azalides peut être utilisée (235). Des études au Pakistan ont montré que près de 70 % des isolats cliniques qui étaient résistants aux fluoroquinolones se sont avérés sensibles au chloramphénicol, soit l'un des premiers antibiotiques utilisés pour contrer la fièvre typhoïde. Le chloramphénicol, étant 25 fois moins dispendieux que les fluoroquinolones, peut s'avérer un choix intéressant pour les pays moins bien nantis, mais présente certains désavantages comme la durée excessive du traitement ainsi que son inefficacité pour guérir les porteurs asymptomatiques (31, 233, 308). Les porteurs asymptomatiques sont également sujet à un régime d'antibiotiques qui s'échelonne sur une plus longue période. Des traitements efficaces à l'ampicilline, à la probenicide, à la triméthoprime-sulfaméthoxazole, à la ciprofloxacine, à la norfloxacine et à la carboxyquinolone ont montré qu'environ 4 patients sur 5 n'étaient plus porteurs suite à ces traitements (95, 128, 234).

1.1.8. **Émergence de souches multirésistantes**

La lutte contre Typhi a déjà conduit à la surutilisation de plusieurs antibiotiques menant cette bactérie pathogène à acquérir des éléments de résistances (41, 296). Dans le cas de Typhi, la question de multirésistance ne date pas d'hier. En 1948, le chloramphénicol s'avérait un antibiotique de choix efficace

pour traiter la fièvre typhoïde. Une trentaine d'années plus tard, des souches résistantes ont été isolées au Mexique et en Asie (234). Entre temps, l'amoxicilline et la triméthoprime—sulfaméthoxazole ont été identifiées comme nouveaux agents antibactériens efficaces contre Typhi, mais de nouvelles souches résistantes de Typhi, dont la souche CT18, ont rapidement été isolées en Asie dans les années 1980-90 (234). Ces résistances résultaient de l'acquisition du plasmide de résistance pHCM1 par Typhi (232). Plus récemment, des antibiotiques de la famille des quinolones s'avéraient efficaces, mais certains isolats asiatiques de Typhi présentent déjà des résistances face à cette famille d'antibiotiques. L'ajout d'un groupement fluor sur les quinolones (formant la famille des fluoroquinolones) a augmenté les effets bactéricides des quinolones, mais on note déjà l'émergence d'isolats asiatiques résistants illustrant la gravité du problème auquel nous devons faire face (4).

1.1.9. Vaccins

Beaucoup d'efforts sont déployés par les chercheurs pour créer un vaccin qui réglerait le problème de multirésistance retrouvé chez Typhi et, dans le meilleur des cas, éradiquerait cette bactérie pathogène. Il existe trois vaccins présentement sur le marché où deux sont injectables et le troisième s'administre par voie orale (58). Le premier et plus ancien vaccin injectable est une souche de Typhi tuée. Il présente toutefois des effets secondaires importants chez 25 à 50 % des patients (86, 234). Le second vaccin injectable est composé de la capsule Vi de Typhi et, comme la souche de Typhi tuée, ce vaccin a pour principal objectif de créer une forte réponse humorale circulante (voir section 1.2.4.3) (58). Le vaccin Vi présente un taux d'efficacité d'environ 75 % après de 2 ans au Népal et 55 % en Afrique du Sud soit deux régions endémiques pour la fièvre typhoïde (2, 167). L'optimisation de ce vaccin pour le rendre plus immunogène est au centre de plusieurs recherches (192). L'ajout d'une exotoxine recombinante non toxique de *Pseudomonas aeruginosa* a permis de rendre ce vaccin plus efficace, y compris chez les enfants de moins de 2 ans (192). Le vaccin oral est fait d'une souche

vivante atténuée de Typhi nommé Ty21a. Elle contient une mutation dans le gène *galE* soit un gène du métabolisme du galactose qui affecte la production de l'antigène O ainsi qu'une déficience dans la synthèse de sa capsule (58, 120, 295). Contrairement aux deux vaccins injectables, le vaccin oral crée une forte immunité humorale et à médiation cellulaire (58). L'efficacité ne semble toutefois pas être aussi élevée dans toutes les régions endémiques comme le démontre différentes études où ce vaccin a montré un degré de protection de 96 % en Égypte après 5 ans, de 67 % au Chili après 3 ans et d'environ 45 % en Indonésie après 2 ans et demi (190, 272, 295).

1.2. Facteurs de virulence

Le cycle d'infection de Typhi chez l'humain est complexe et comprend de nombreuses étapes critiques pour l'établissement de la fièvre typhoïde. Par conséquent, Typhi a dû évoluer de façon à pouvoir optimiser toutes les étapes nécessaires à une infection pour affronter adéquatement les stress causés par l'hôte.

1.2.1. Système à deux composantes

Les systèmes à deux composantes (SDC) sont d'une grande importance pour les bactéries, puisqu'ils permettent à celles-ci de répondre adéquatement à différents signaux environnementaux retrouvés chez l'hôte. Ces systèmes sont composés d'une protéine membranaire senseur et d'une protéine activatrice de la transcription (PAT). En règle générale, le senseur, suite à sa stimulation, s'autophosphoryle sur un résidu histidine et transfère son groupement phosphate sur un résidu d'acide aspartique de la PAT. L'activation de la PAT par sa phosphorylation augmente son affinité pour l'ADN activant subséquemment la transcription des gènes cibles de chacun des SDC.

macrophages durant l'infection (198, 245). Selon Prost *et al.*, cette induction pH dépendante de PhoP peut être accentuée en présence de PA (245).

L'activation du système PhoP/PhoQ mène à la transcription d'une quarantaine de gènes. Parmi ceux-ci, le régulon *ssrA/ssrB* a pour fonction d'activer, à son tour, les gènes encodés sur le « *Salmonella* pathogenicity island 2 » (SPI-2) permettant aux salmonelles de survivre à l'intérieur des SCV des macrophages (voir section 1.2.4.2) (32). Dans le même ordre d'idée, Alpuche-Aranda *et al.* ont montré l'importance de ce SDC dans la formation de grandes SCV essentielles à la survie des salmonelles durant la phase systémique de l'infection (7). Tel que mentionné précédemment, le système PhoP/PhoQ répond à la présence de PA induisant un mécanisme de résistance aux PA en activant directement ou par le biais d'un second SDC, PmrA/PmrB, la transcription de gènes impliqués dans cette réponse (13, 96, 143). L'activation directe ou indirecte des gènes impliqués dans la résistance aux PA entraîne une modification du lipopolysaccharide (LPS) des salmonelles, entre autres, par l'action des protéines PagP, UgtL, PmrE et PmrF. (133-135, 270). Ces deux dernières protéines réduisent la charge négative du LPS en ajoutant un résidu aminoarabinose sur l'un des phosphate du lipide A diminuant l'affinité des PA pour la membrane des salmonelles (132). Le système PhoP/PhoQ permet également aux salmonelles de répondre adéquatement à une carence en magnésium qui peut s'avérer fatale pour les bactéries (116, 273, 274). Suite à son activation, le SDC PhoP/PhoQ est responsable d'activer la transcription des gènes *mgtA*, *mgtB* et *mgtC* où *mgtA* et *mgtB* code pour des transporteurs de magnésium, alors que *mgtC* code pour une protéine hypothétique favorisant la survie des bactéries dans un environnement faiblement concentré en magnésium (voir section 1.2.4.3) (274). Behlau et Miller et Bajaj *et al.* ont montré l'implication de PhoP dans la répression des gènes associés à l'invasion cellulaire durant la phase intestinale de l'infection (voir section 1.2.4.1) (17, 26). Selon ces deux études, le SDC PhoP/PhoQ semble agir comme un interrupteur entre la phase intestinale et la phase systémique de l'infection suggérant que les concentrations de cations divalents, que l'acidité des SCV et la présence de PA (intestinale et systémique) sont trois signaux intégrés par le SDC PhoP/PhoQ permettant aux salmonelles

d'induire efficacement une maladie systémique dans leur hôte respectif. Tel que proposé par Bader *et al.*, la forte osmolarité durant la phase intestinale pourrait inhiber l'activation du SDC PhoP/PhoQ et ainsi favoriser l'activation des gènes d'invasion (14). Durant la phase systémique, l'acidification des SCV et la présence de PA dans celles-ci pourraient activer PhoP/PhoQ réprimant les gènes d'invasion, mais activant ceux responsables de la survie dans les macrophages (14).

1.2.1.2. PmrA/PmrB

Un second SDC important pour les salmonelles est le système PmrA/PmrB (figure 4). Celui-ci est constitué du senseur membranaire PmrB qui répond principalement à la présence d'ions ferriques permettant aux salmonelles de se protéger dans un environnement trop fortement concentré en fer (306). L'autophosphorylation de PmrB en présence d'ions ferriques mène à la phosphorylation de PmrA activant la transcription des opérons *pmr*, *pbg* et du gène *ugd* (132, 274, 305). Ces gènes sont également responsables de modifier la charge négative des LPS des salmonelles et ainsi diminuer l'affinité des ions ferriques pour la membrane externe des salmonelles (305). Cette modification du LPS permet également de favoriser la résistance des salmonelles face aux PA (132, 172).

1.2.1.3. EnvZ/OmpR

Le niveau d'osmolarité environnant les salmonelles est un autre signal perçu par celles-ci, ce signal étant intégré par le SDC EnvZ/OmpR (figure 4). Le senseur EnvZ répond à différents niveaux d'osmolarité pour permettre l'activation subséquente de OmpR par phosphorylation. L'activation de OmpR favorise la transcription des gènes codants pour les porines OmpC et OmpF (5). Une mutation dans le gène *ompR* cause une augmentation de la susceptibilité de Typhimurium à un choc acide suggérant l'implication directe de OmpR dans cette réponse (voir section 1.2.5) (19). Lucas et Lee ont démontré l'importance de ce SDC lors de

l'invasion des cellules de la barrière intestinale, puisqu'une altération des gènes *ompR* ou *envZ* crée une diminution de l'expression de *hilA*, un gène essentiel pour l'invasion de cellules non phagocytaires (voir section 1.2.4.1) (196). Il a été démontré qu'une mutation du SDC EnvZ/OmpR causait également une diminution importante de l'activation de *ssrA* et *ssrB*, soit les régulateurs des gènes essentiels à la survie des salmonelles dans les macrophages (voir section 1.2.4.2) (94, 184). De plus, une altération du gène *ompR* est connue pour diminuer l'expression du gène *viaB* résultant en une décapsulation de Typhi (voir section 1.2.4.3) (187, 240). Finalement, OmpR activé permet de réguler négativement l'expression des gènes flagellaires en réprimant les régulateurs flagellaires *flhC* et *flhD* (261).

1.2.2. Adhérence

Suite à leur pénétration dans l'organisme, les salmonelles doivent envahir les cellules de la barrière intestinale. Cette étape nécessite le rapprochement des salmonelles vers les cellules épithéliales de la barrière favorisant l'invasion subséquente de ces cellules. Ce rapprochement entre les salmonelles et les cellules épithéliales est possible grâce à la présence de structures d'adhésion telles que des filaments extracellulaires nommés fimbriae (figure 5) (23, 101, 312). Malgré la présence de plusieurs fimbriae communs aux salmonelles, Typhi et Typhimurium possèdent chacun certains fimbriae qui leur sont spécifiques constituant ainsi l'une des hypothèses concernant la spécificité d'hôte différente de ces deux sérovars pathogènes. À ce jour, treize opérons fimbriaires ont été identifiés chez Typhimurium soit *lpf*, *pef*, *stf*, *agf*, *bcf*, *fim*, *stb*, *stc*, *std*, *sth*, *sti*, *saf* et *stj* (151). Certains de ces fimbriae ont montré un tropisme cellulaire bien précis (22, 24). En effet, Baumler *et al.* ont démontré que le fimbriae *lpf* favorise le rapprochement de Typhimurium avec les cellules épithéliales des plaques de peyers alors que le fimbriae *pef* permet le rapprochement de Typhimurium vers les cellules épithéliales du petit intestin (22, 24). Jusqu'à présent, plusieurs fimbriae ont toujours un tropisme cellulaire inconnu puisque leur mutation n'inhibe pas le rapprochement des salmonelles avec les

cellules épithéliales suggérant de la redondance entre les fimbriae ou un effet synergique entre les différents fimbriae pour un type cellulaire en particulier. Van der Velden *et al.* ont testé plusieurs combinaisons de mutations pour observer un effet synergique entre les fimbriae *fim*, *agf*, *lpf* et *pef* lors d'une infection intragastrique murine par Typhimurium signifiant que chacun d'eux à un effet au niveau de l'étape d'adhésion intestinale (288). Tel que mentionné précédemment, Typhi possède aussi une panoplie de fimbriae (14, incluant le pili de type IV) dont six qui lui sont uniques comparativement à Typhimurium : *sef*, *tcf*, *sta*, *stg*, *ste* et le pili de type IV (281). Toutefois, peu d'études ont été effectuées sur ces fimbriae.

Zhang *et al.* ont montré qu'une altération de l'opéron *pil* codant pour le pili de type IV cause une diminution du taux d'adhérence de Typhi aux cellules intestinales INT-407 (312). De la même façon, Forest *et al.* ont testé l'implication d'un des fimbriae uniques de Typhi au niveau de l'adhérence aux cellules épithéliales (101). Ceux-ci ont montré de façon élégante que la mutation de l'opéron fimbriaire *stg* réduit de façon significative la capacité de Typhi d'adhérer aux cellules INT-407 (101).



Figure 5 : Fimbriae *fim* de Typhimurium exprimé dans une souche de *Escherichia coli* afimbriée (151).

1.2.3. Système de sécrétion de type 3 (SST3)

Plusieurs bactéries pathogènes ont acquis, au cours de leur évolution, un système important favorisant leur interaction avec leur hôte. Ce système, nommé système de sécrétion de type 3 (SST3), permet aux bactéries d'injecter des protéines directement du cytoplasme bactérien au cytoplasme cellulaire de l'hôte modifiant ainsi l'hôte à leur guise. Les salmonelles en possèdent deux (sauf *Salmonella bongori*) soit celui encodé sur le « *Salmonella* pathogenicity island 1 » (SPI-1) ou celui encodé sur SPI-2 (80). Des SST3 sont également présents chez d'autres bactéries pathogènes telles que *E. coli* O157:H7, *Yersinia spp.*, *Shigella*

spp. et même chez certaines bactéries pathogènes de plantes (219). Les SST3 sont composés de trois parties majeures soit la base, le translocon et les effecteurs. La base est composée de lipoprotéines membranaires permettant le passage des protéines du translocon et subséquentement des effecteurs à travers les membranes bactériennes. De son côté, le translocon est constitué de petites protéines formant un tunnel pour le passage des effecteurs vers le cytoplasme cellulaire. Les effecteurs, pouvant être dispersés sur le génome, sont généralement ciblés au SST3 par la présence d'une séquence signale composée de 20 à 30 acides aminés en amont de leur séquence effectrice (1). Ceux-ci sont transloqués directement dans la cellule de l'hôte pour altérer les fonctions normales de la cellule.

1.2.4. Îlots de pathogénicité des salmonelles

Les « *Salmonella pathogenicity island* » (SPIs) sont des fragments d'ADN variant entre 10 et 140 kb ayant été acquis par transfert horizontal. Ces SPIs sont identifiables par leur % GC différent de celui du génome des salmonelles qui se situe entre 52 et 54 % (Typhi) (301). Jusqu'à présent, 14 SPIs ont été identifiés chez les salmonelles, mais ceux-ci ne se retrouvent toutefois pas dans tous les sérovars. Cette différence importante pourrait également être responsable de la spécificité d'hôte unique de Typhi pour l'homme comparativement au large spectre d'hôte de Typhimurium.

1.2.4.1. SPI-1 – Invasion

L'acquisition des gènes de SPI-1 par les salmonelles a permis de les différencier des autres genres des *Enterobacteriaceae*. En effet, *Salmonella bongori* et tous les sérovars de *Salmonella enterica* possèdent cet îlot de pathogénicité (figure 6) (213, 225). Tels que mentionnés précédemment, les gènes de SPI-1 codent pour un SST3 (SST3-1). L'importance du SST3-1 a été confirmée il y a déjà plusieurs années par l'identification de gènes, nommés *inv*, essentiels

pour l'invasion de cellules non phagocytaires (110). En effet, l'inoculation orale de mutants *inv* de Typhimurium à des souris n'a pas créé de maladies systémiques faisant augmenter la dose létale d'un facteur de 100 par rapport à une souche sauvage de Typhimurium (110).

Inversement, l'inoculation intrapéritonéale (outrepassant la phase intestinale) de ces mêmes

souches mutantes n'a pas engendré d'augmentation de la dose létale suggérant que les gènes *inv* étaient principalement impliqués durant la phase intestinale (110). Confirmant les résultats de Galan et Curtiss, Elsinghorst *et al.* ont cloné les gènes de SPI-1 de Typhimurium dans une souche de *E. coli* non invasive, la rendant du même coup invasive (85).

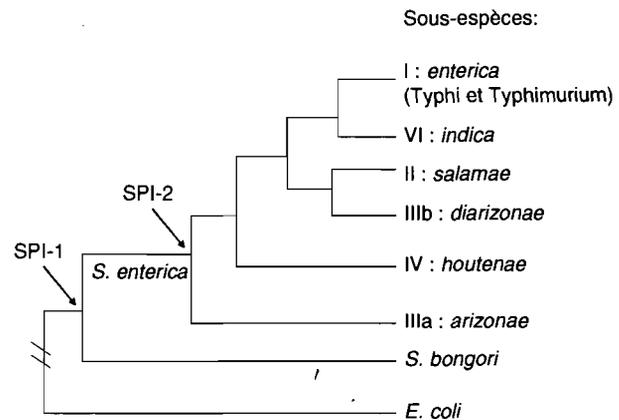


Figure 6 : Phylogénie des salmonelles illustrant le moment de l'acquisition de SPI-1 et de SPI-2.

Les gènes de SPI-1 peuvent être divisés en 3 opérons majeurs : l'opéron *prg*, l'opéron *inv/spa* et l'opéron *sip* (figure 7).

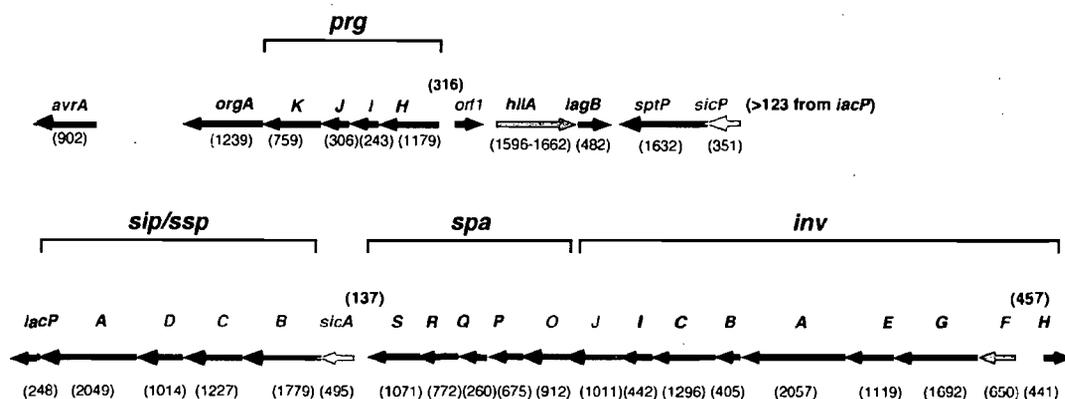


Figure 7 : Îlot de pathogénicité 1 des salmonelles (SPI-1) (66).

La base du SST3-1 est composée de protéines encodées sur l'opéron *prgHIJK* (figure 7) (166, 175). La protéine PrgH se tétramérise et se lie avec la

protéine PrgK pour former un anneau dans la membrane interne (figure 8) (166, 175, 237). À ce complexe s'ajoute la lipoprotéine InvG qui aidé de InvH forme un second anneau situé dans la membrane externe (60, 63, 161, 175). Une fois la base complète et fonctionnelle, la protéine PrgI s'oligomérisse pour former le translocon (figure 8) (166, 176). Selon l'étude de Kubori *et al.*, le translocon du SST3-1 peut atteindre 80 nm de long contre 13 nm de diamètre (175). Cette même équipe a montré dans une autre étude que la longueur du translocon peut varier selon l'expression du gène *spaN* (*invJ*) (176). En son absence, le translocon devient de longueur aberrante en plus de bloquer la sécrétion des effecteurs de SST3-1 (57, 176). Les mécanismes de régulation de la taille du translocon par *spaN/invJ* sont pour l'instant inconnus, mais l'hypothèse générale veut que la protéine SpaN/InvJ agisse comme interrupteur entre la protéine PrgI et les effecteurs du SST3-1 (176). Les protéines SpaO, SpaP, SpaQ et SpaR sont également associées à la structure du SST3-1, mais plus particulièrement au niveau de la membrane interne des salmonelles (figure 8). Lorsque mutées, ces protéines rendent Typhimurium non invasif en inhibant la sécrétion des effecteurs SipB, SipC et InvJ (57).

La fonction des protéines encodées par les gènes *inv* sont toujours hypothétiques, mais selon des homologies de séquences les protéines Inv semblent associées à la membrane interne des salmonelles. En effet, la protéine InvA, essentielle à l'invasion, est similaire aux protéines MxiD de *Shigella sp.* et LcrD de *Yersinia pseudotuberculosis* qui se retrouvent ancrées dans leur membrane interne respective (112, 126). De son côté, la protéine InvC

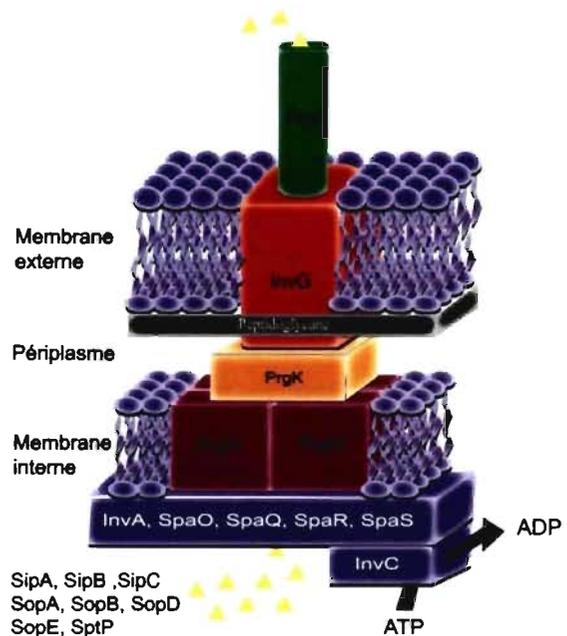


Figure 8 : SST3-1 des salmonelles.

montre une homologie de séquence avec des protéines de la famille des ATPase F_0F_1 (82). Le caractère essentiel de la protéine InvC dans l'invasion vient probablement de sa capacité à hydrolyser l'ATP et fournir de l'énergie nécessaire au SST3-1 pour la translocation des effecteurs (191). Finalement, la protéine InvE présente une homologie avec la protéine membranaire YopN de *Yersinia sp.* (125). Cette dernière s'avère essentielle pour l'invasion en permettant la sécrétion polarisée des effecteurs du SST3 de *Yersinia sp.* en agissant comme gardienne du translocon durant la sécrétion des effecteurs nécessaires à l'invasion suite au contact entre la bactérie et la cellule cible (36, 125).

Suite à la synthèse fonctionnelle de la base du SST3-1, les effecteurs peuvent être transloqués vers la cellule hôte. Plusieurs fonctions ont été associées aux effecteurs du SST3-1. Les effecteurs SipA, SipC, SopB (encodés sur SPI-5), SopE (encodé sur le SPI-7), SopE2 (Typhimurium seulement) et SptP agissent tous au niveau du cytosquelette permettant d'induire l'ondulation cellulaire essentielle à l'invasion des cellules non phagocytaires (figure 2) (108, 174, 205, 249, 313). Les effecteurs SopE et SptP montrent deux activités totalement opposées (108). En stimulant le réarrangement de l'actine par son interaction avec les GTPases Cdc42 et Rac, SopE induit l'invasion cellulaire par l'ondulation cellulaire (figure 2) (108). Inversement, la protéine effectrice SptP agit telle une « GTPase activating protein » sur les mêmes GTPase (Cdc42 et Rac) inhibant ainsi le réarrangement de l'actine orchestré par SopE. Cette action opposée de SptP ramène à l'état normal les membranes cellulaires et diminue ainsi le stress causé par l'invasion cellulaire des salmonelles (108). Kubori et Galan ont montré que ces deux effecteurs du SST3-1 sont temporellement régulés. Cette régulation temporelle s'explique par le faible niveau de stabilité de SopE par rapport à SptP (174). La protéine effectrice SopE est rapidement (20 min post-invasion) ubiquitinée et dégradée par les protéasomes cellulaires (174). Inversement, des études d'immunobuvardage protéique ont permis de détecter la protéine effectrice SptP jusqu'à 3 heures post-invasion (174). Contrairement aux protéines SopB, SopE, SopE2 et SptP qui interagissent avec les GTPases cellulaires Rho, Cdc42 et Rac, la protéine SipA se lie directement à l'actine favorisant sa polymérisation et

l'ondulation cellulaire nécessaire aux salmonelles pour l'invasion (314). En plus de leur fonction dans le réarrangement de l'actine, les protéines SipA, SopB, SopE et SopE2 agissent en synergie pour dérégler les jonctions serrées entre les cellules épithéliales causant une déstabilisation de celles-ci (39). D'autres études ont montré que ces mêmes effecteurs (SopB, SopE, SopE2 et SipB) sont également impliqués au niveau du recrutement de cellules immunitaires au site d'infection par l'induction de la sécrétion de chémokines et d'interleukines suite à une infection par *Typhimurium* (48, 70, 114, 148, 149, 236). Lors de l'invasion, SopB, SopE et SopE2 activent les GTPase Rho ce qui active la voie de signalisation des MAP kinases qui mène ultimement à la sécrétion de IL-8, soit une interleukine inflammatoire (48, 149, 236). Le recrutement des cellules immunitaires orchestré par les effecteurs Sop résulte donc d'une action indirecte de ceux-ci. Inversement, l'effecteur SipB induit directement la sécrétion cellulaire d'interleukines 1 β et 18 (IL-1 β) (voir section 1.2.6) (74, 91, 148).

Les effecteurs du SST3-1 ont aussi des effets cytotoxiques sur les cellules. Chen *et al.* ont été les premiers à mettre en évidence le phénomène de mort cellulaire SPI-1-dépendant (49). Cette cytotoxicité SPI-1-dépendante est caractérisée par une induction rapide de mort cellulaire principalement due à l'injection des effecteurs de l'opéron *sip* de SPI-1 (voir section 1.2.6) (49, 56, 163, 248, 249). Outre leur implication directe dans la mort cellulaire et l'invasion des cellules non phagocytaires, les protéines SipB et SipC ont pour fonction d'optimiser la translocation des autres effecteurs tel que SopE (303). De son côté, la fonction de SipD reste mal définie. Kaniga *et al.* ont montré qu'une mutation du gène *sipD* entraîne une augmentation de la sécrétion des autres protéines Sip résultant en une diminution de l'invasion des cellules (163). Par conséquent, la protéine SipD pourrait avoir un rôle spécifique de gardien dans le contrôle de la translocation des effecteurs Sip similaire à InvE et SpaS (163).

Tel que mentionné précédemment, le SST3-1 a principalement été impliqué durant la phase intestinale de l'infection suggérant des conditions d'expression particulières. Différentes études ont permis de faire la lumière sur les conditions

expérimentales optimales pour induire les gènes de SPI-1. Lee et Falkow ont montré que des salmonelles en fin de phase logarithmique de croissance ainsi qu'un environnement faiblement oxygéné favorisent le taux d'invasion de cellules non phagocytaires par les salmonelles (185). De leur côté, Galan et Curtiss ont montré que des conditions de forte osmolarité favorisent également l'invasion des cellules non phagocytaires (111). Cette même étude montre que la relaxation de l'ADN (surenroulement positif) est aussi un facteur favorable aux salmonelles pour envahir les cellules non phagocytaires (111).

La régulation des gènes codant pour les effecteurs ou les protéines de la base du SST3-1 s'avère très complexe. Cette régulation montre une hiérarchie importante (figure 9). Tel qu'illustré à la figure 9, HilA agit comme intégrateur de différents signaux environnementaux puisqu'il répond différemment à

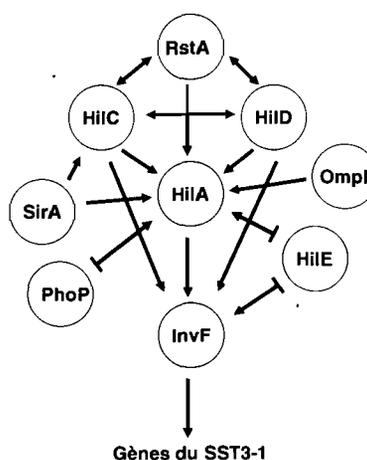


Figure 9 : Régulation des gènes de SPI-1 où les flèches vertes et rouges montrent respectivement une activation et une répression des gènes (Adapté de (71)).

plusieurs SDC des salmonelles. Le SDC PhoP/PhoQ réprime l'expression de *hilA*, alors que les SDC SirA/BarA et OmpR/EnvZ activent son expression (17, 25, 196, 237). Les protéines HilC et HilD agissent également en tant qu'activateurs de HilA (195, 250). Ellermeier et Slauch ont identifié le gène *rstA* comme étant un autre régulateur de *hilA* (84). Sous des conditions d'induction de SPI-1, l'expression de *rstA* cause une augmentation d'expression de *hilA*, *hilC* et *hilD* (84). Cette régulation serrée du gène *hilA* est possible par la présence d'une région contenant des séquences de reconnaissance pour le répresseur constitutif (toujours inconnu) et pour les protéines HilC et HilD (196). Parmi les répresseurs connus de HilA, la protéine HilE possède deux activités répressives sur l'activation de *hilA* soit en se liant à HilD et ainsi bloquer l'activation de HilA ou en inhibant l'activation de InvF en condition HilA indépendante (voir plus bas et figure 9) (25). Suite à son activation, HilA reconnaît des séquences en amont des opérons *prg*, *sip* et *inv* permettant ainsi

l'activation directe de la transcription des opérons encodant le SST3-1 (figure 7) (195). La transcription du premier gène de l'opéron *inv* : le gène *invF*, est ensuite requise pour activer la transcription de l'opéron *sip* menant à l'expression optimale des gènes de SPI-1. Par conséquent, une mutation de *hilA* confère un phénotype hypoinvasif aux salmonelles (16). La transcription des effecteurs du SST3-1 situé à l'extérieur de l'îlot requiert les régulateurs InvF et HilA indirectement (81).

Tableau I: Résumé des fonctions associées aux effecteurs de SPI-1

Effecteurs	Gène	Fonctions	Références
SopA	STY2275	essentiel pour l'invasion des cellules non phagocytaires, efflux de fluides	(249, 302)
SopB	STY1121 (SPI-5)	essentiel pour l'invasion des cellules non phagocytaires, attraction des neutrophiles, polymérisation de l'actine, efflux de fluides, formation de larges SCV, dérèglement des jonctions serrées, inhibition de la mort cellulaire	(39, 114, 147, 169, 249, 276, 311, 313)
SopD	STY3073	essentiel pour l'invasion des cellules non phagocytaires, efflux de fluides	(160, 249)
SopE	STY1988	essentiel pour l'invasion des cellules non phagocytaires, efflux de fluides, polymérisation de l'actine, dérèglement des jonctions serrées,	(39, 236, 311, 313)
SptP	STY3001 (SPI-1)	dépolymérisation de l'actine	(174)
SipA	STY3005 (SPI-1)	essentiel pour l'invasion des cellules non phagocytaires, efflux de fluides, dérèglement des jonctions serrées, interaction directe avec le cytosquelette	(205, 311, 314)
SipB	STY3008 (SPI-1)	essentiel pour l'invasion des cellules non phagocytaires, favorise la translocation des autres effecteurs, effet cytotoxique, induction de la sécrétion IL-1 β et IL-18	(49, 56, 148, 163, 303)
SipC	STY3007 (SPI-1)	essentiel pour l'invasion des cellules non phagocytaires, accélère la polymérisation de l'actine, favorise la translocation des autres effecteurs	(164, 205, 303)

1.2.4.2. SPI-2 – Survie intracellulaire

Suite à l'invasion des cellules non phagocytaires, les salmonelles doivent survivre à l'intérieur des macrophages pour causer une infection systémique. Cette étape nécessite l'expression du second SST3 dépendant des gènes encodés sur SPI-2 (SST3-2) (146). L'utilisation d'une sonde spécifique à une région du chromosome de Typhimurium a permis de mettre en évidence la présence de SPI-2 chez l'espèce *Salmonella enterica* comparativement aux autres *Enterobacteriaceae* tels que *E. coli* et *Salmonella bongori* (figure 6) (225). Cet îlot, nommé SPI-2, est situé au centisome 31 du chromosome et représente un fragment d'ADN long d'environ 40 kb acquis par *Salmonella enterica* comme en fait foi son % GC (47.4%) inférieur à celui du génome (225, 269). De la même façon que SPI-1 a été associé à l'invasion des cellules non phagocytaires, des mutations affectant les gènes SPI-2 ont montré une incapacité des salmonelles de survivre à l'intérieur des macrophages. En effet, ces mutations font augmenter significativement la dose létale de Typhimurium suite à une infection intrapéritonéale suggérant que les gènes de SPI-2 sont essentiels durant la phase intracellulaire de l'infection de macrophages (144, 269). Dans cet ordre d'idées, Cirillo *et al.* ont montré que les gènes de SPI-2 sont fortement induits dès 2 h suivant l'invasion de macrophages (53).

Il est possible de séparer grossièrement les gènes codant pour le SST3-2 en quatre catégories soit les gènes codant pour les protéines de la base (gènes *ssa*), pour les protéines du translocon (gènes *sse*), pour des chaperonnes (gènes *ssc*) et les gènes codant pour le régulateur de SPI-2 : *ssrA/ssrB* (figure 10). Tout comme pour les effecteurs de SPI-1, les effecteurs de SPI-2 sont dispersés à travers le génome *Salmonella enterica*.

Contrairement au SST3-1, les protéines de la base du SST3-2 sont peu caractérisées. Hensel *et al.* ont, toutefois, qualifié les gènes de l'opéron *ssa* comme les gènes codant pour les protéines de la base du SST3-2 (145). Beuzon *et al.* ont montré qu'une altération des gènes *ssaC*, *ssaJ* et *ssaV* inhibe la sécrétion de SseB

à la membrane soit une protéine du translocon (28). Rappl *et al.* ont mis en évidence la présence de la protéine SsaC dans la membrane externe de *Typhimurium* formant un anneau similaire à celui produit par InvG du SST3-1 permettant le passage de la protéine du translocon SseB ainsi que le passage des effecteurs de SPI-2 (252). Plusieurs autres protéines associées à la base du SST3-2 : SsaH, SsaR et SsaU, ont aussi été impliquées dans une diminution de survie intracellulaire lorsque mutées, mais leur emplacement reste à être déterminé (159, 238, 286).

Le translocon est principalement composé des protéines SseB, SseC et SseD (223). Toutefois, comme le stipulent Nikolaus *et al.*, la sécrétion de SseC et SseD est possible seulement si SseB est fonctionnel suggérant que SseB est installé dans le SST3-2 avant SseC et SseD (figure 10) (223). Ces protéines sont, par surcroît, essentielles à *Salmonella enterica* pour la survie intracellulaire puisqu'une mutation de celles-ci (surtout SseB) bloque la sécrétion des effecteurs SspH1 et SspH2 de SPI-2 dans le cytoplasme de l'hôte (223).

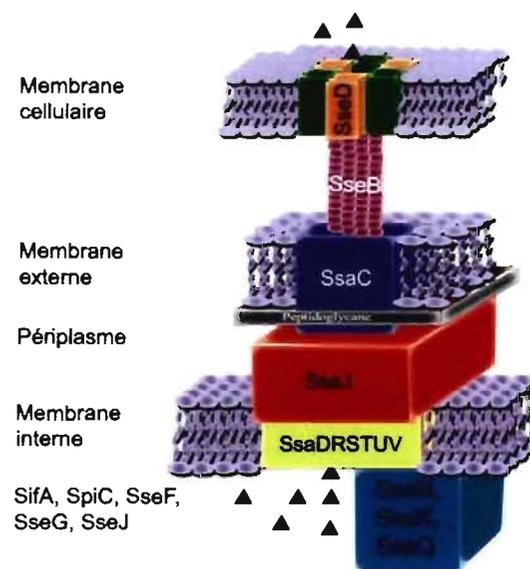


Figure 10 : SST3-2 des salmonelles.

Suite à l'invasion de cellules épithéliales ou de macrophages, les salmonelles se retrouvent dans la SCV (292). Cette vacuole acquiert au cours de sa maturation, différents marqueurs endosomaux tels que EEA-1, le récepteur de la transferrine, LAMP1, LAMP2, CD63 et une ATPase responsable de l'acidification de la SCV (253). La maturation de la SCV s'arrête puisqu'elle ne requiert aucunement les marqueurs endosomaux tardifs tels que les cathepsin D et L permettant à l'hôte de cibler les phagosomes vers la voie lysosomale (127, 177). Le

premier effecteur du SST3-2 à avoir été caractérisé est SpiC (282). Cet effecteur a pour fonction d'inhiber la fusion entre les compartiments de la voie endosomale-lysosomale et la SCV (282). Cette même étude montre aussi l'importance de SpiA dans la translocation de SpiC (282). Une altération de SpiA cause une inhibition de la sécrétion de SpiC dans le cytoplasme de l'hôte résultant en une diminution de la survie de la souche mutante (282). L'inhibition de la fusion entre la SCV et les compartiments de la voie endosomale-lysosomale causée par SpiC est due à son interaction avec la protéine de l'hôte TassC qui est normalement responsable de la fusion entre les compartiments endosomaux tardifs et les phagosomes (183).

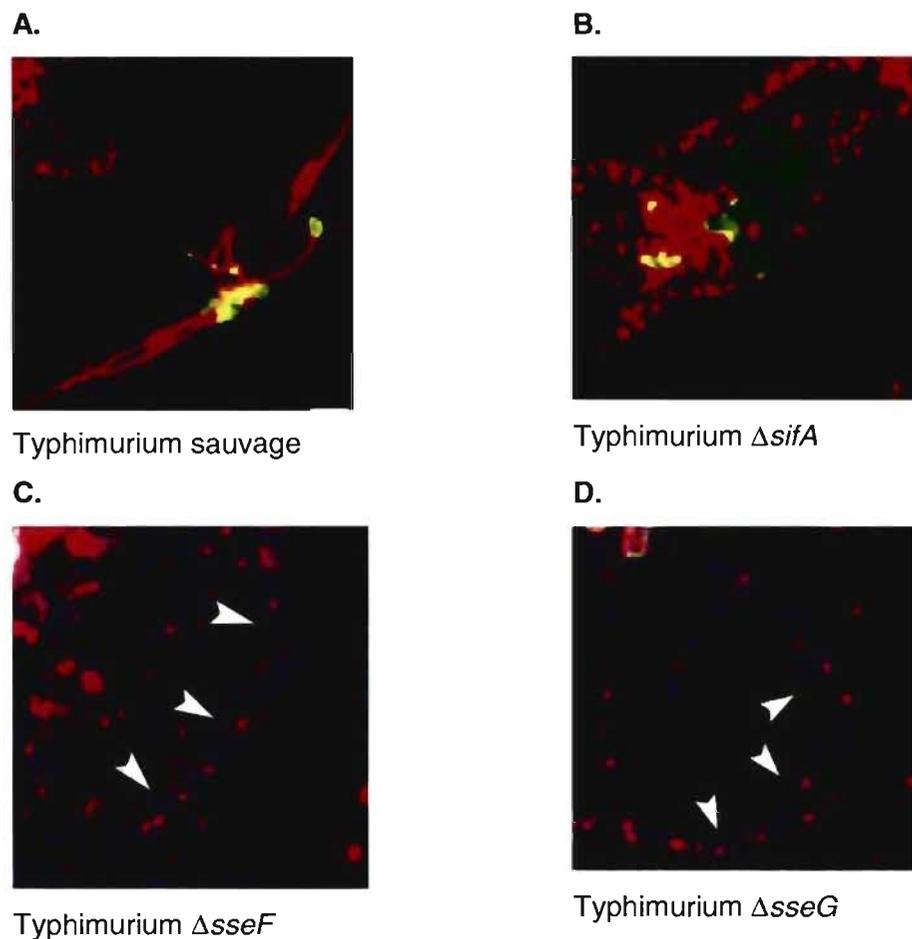


Figure 11 : Implication des protéines SifA, SseF et SseG dans la formation des sifs. **A** : Typhimurium sauvage permet la formation de sifs contrairement au mutant *sifA* (**B**), *sseF* (**C**) et *sseG* (**D**) (29, 178).

Durant la phase intracellulaire, la formation des « *Salmonella*-induced filaments » (sifs) est une autre étape primordiale à la survie intracellulaire des salmonelles. Ces sifs permettent d'interconnecter les différentes SCV présentes dans la cellule de l'hôte et probablement favoriser la multiplication des salmonelles (177). Les sifs sont de longs filaments reliés aux SCV pouvant être visualisés en microscopie à fluorescence lorsque les cellules de l'hôte sont infectées par des salmonelles (figure 11A). La mutation du gène *sifA* codant pour un effecteur de SPI-2, empêche la formation des sifs réduisant du même coup la survie intracellulaire du mutant (figure 11B) (29). Les protéines effectrices SseF et SseG favorisent également la formation des sifs. Leur mutation n'entraîne toutefois pas une absence complète de sifs, mais cause plutôt la formation de pseudo-sifs altérant également la survie des salmonelles dans les SCV (figure 11C-D) (178). Outre sa fonction d'induire la formation des sifs et d'interconnecter les SCV, SifA a aussi la responsabilité de maintenir l'intégrité de la membrane de la SCV au cours de sa maturation (figure 12) (29).

Suite à leur entrée dans les SCV, les salmonelles ne font pas que survivre, mais se multiplient dans celles-ci (262). Pour favoriser leur multiplication, les salmonelles acquièrent des fragments membranaires augmentant le volume de la SCV (262). L'hypothèse générale veut que les protéines effectrices SseJ et SseG soient responsables d'acquérir la membrane nécessaire pour l'augmentation du volume de la SCV (69, 260, 262). Ruiz-Albert *et al.* ont mis en évidence l'implication de SseJ dans la déstabilisation de la membrane de la SCV (260). Selon leur hypothèse, SseJ déstabiliserait la membrane des SCV pour permettre d'interconnecter les différentes SCV dans la cellule de l'hôte et ainsi augmenter le volume total de la SCV finale (260). Cette situation semble donc être paradoxale avec la fonction de la protéine SifA. Toutefois, il est possible de penser que l'action opposée de ces effecteurs soit temporellement régulée. En effet, sous l'action de SifA, la membrane de la SCV est maintenue durant la phase d'accoutumance des salmonelles au milieu intracellulaire. Ensuite, l'effecteur SseJ déstabilise les membranes des SCV favorisant la liaison entre celles-ci et la multiplication des salmonelles. De son côté, SseG a la capacité d'interagir avec l'appareil de Golgi et

de favoriser la multiplication de Typhimurium dans les SCV des cellules épithéliales (262). Salcedo *et al.* ont montré qu'en présence de SseG et d'un appareil de Golgi fonctionnel, la SCV se retrouve entourée par des protéines de l'appareil de Golgi suggérant l'acquisition de membranes provenant du golgi pour faciliter l'étape de multiplication intracellulaire des salmonelles (262).

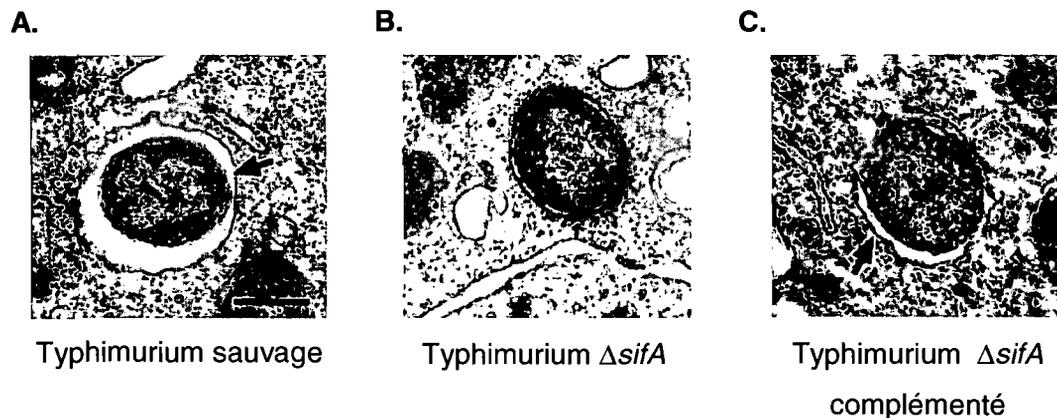


Figure 12 : Implication de *sifA* de Typhimurium dans l'intégrité membranaire de la SCV durant une infection de macrophages murins. **A :** Typhimurium sauvage favorise le maintien de la membrane de la SCV. **B :** Le mutant *sifA* ne maintient pas l'intégrité de la membrane de la SCV. **C :** L'intégrité de la membrane est restaurée lorsque le mutant *sifA* est complémenté par le gène *sifA* sur un vecteur (29).

Moins complexe que la régulation des gènes de SPI-1, la régulation des gènes de SPI-2 montre une hiérarchie à deux niveaux. Tout d'abord, les SDC PhoP/PhoQ et OmpR/EnvZ permettent l'activation du SDC SsrA/SsrB (68, 117, 215). Au deuxième niveau d'activation, le SDC SsrA/SsrB active directement les gènes du SST3-2 (53, 68, 71). Ce second SDC est composé du senseur membranaire SsrA et de la PAT SsrB. Deiwick *et al.* ont étudié les conditions *in vitro* permettant d'activer les gènes du SST3-2 (68). Une limitation en cations divalents et en phosphates inorganiques induit l'expression des gènes de ce système (68). D'autres études montrent qu'un pH acide peut également induire les gènes du SST3-2 en condition SsrA/SsrB dépendante (28, 117, 208, 260).

L'activation du SDC SsrA/SsrB favorise non seulement la transcription de gènes encodés directement sur SPI-2, mais également des effecteurs du SST3-2 dispersés à travers le génome (304).

1.2.4.3. Autres îlots de pathogénicité des salmonelles

Encodé sur le SPI-3 et présent chez Typhi et Typhimurium, l'opéron *mgtCB* est le seul cadre de lecture de cet îlot à avoir été impliqué dans la virulence des salmonelles. Régulé par les SDC PhoP/PhoQ, cet opéron est essentiel à la survie intracellulaire agissant en tant que transporteur de magnésium pour contrer les limitations nutritionnelles in vivo ou in vitro (34).

Le rôle précis de l'îlot de pathogénicité 4 au niveau de l'infection reste toujours obscur. Selon Gerlach *et al.*, SPI-4 n'est pas impliqué dans l'invasion des cellules non phagocytaires ni dans la survie intracellulaire des salmonelles. SPI-4 aurait plutôt une implication dans l'attachement des salmonelles aux cellules épithéliales et dans l'induction de l'inflammation observée dans le cas de gastro-entérites (118, 119). Dans une autre étude, Lawley *et al.* ont sélectionné négativement des gènes de SPI-4 lors de la phase systémique de l'infection suggérant leur implication au niveau de la survie intracellulaire des salmonelles (182). Par conséquent, le rôle de SPI-4 reste à être déterminé.

Les gènes de SPI-5 codent pour des protéines importantes au niveau de l'induction de la réponse inflammatoire lors de la phase intestinale d'une infection (301). Le gène *sopB/sigD* code pour une protéine effectrice exportée via le SST3-1. Étant donné son association avec le SST3-1, plusieurs études ont montré son implication au niveau de l'invasion des cellules non phagocytaires et cela en interagissant avec des GTPases du réseau d'actine des cellules eucaryotes (114, 224, 313). Cette interaction favorise l'ondulation cellulaire essentielle à l'invasion des cellules par les salmonelles. De plus, par son activité phosphatase, le gène *sopB/sigD* contribue fortement à l'efflux de fluides causant la gastro-entérite

observée lors d'infections humaines à Typhimurium (224). Ce gène a aussi pour fonction d'inhiber la mort cellulaire observée lors d'infections de cellules non phagocytaires par l'interaction et l'activation d'une sérine-thréonine kinase eucaryote (169, 276). Finalement, Boyle *et al.* ont montré l'implication de *sopB/sigD* au niveau de la destruction des jonctions serrées entre les cellules épithéliales lors d'une infection par Typhimurium (39). SPI-5 contient également les gènes *pip* codant pour des effecteurs exportés par les deux SST3 (301). L'altération de ces gènes cause une diminution de la réponse inflammatoire induite au niveau de la barrière intestinale similaire à celle observée par une mutation dans le gène *sopB/sigD* (301). Au niveau de la survie, les gènes *pip* ne semblent pas essentiels puisque leur mutation n'entraîne pas de diminution de survie (301). Knodler et Steele-Mortimer ont caractérisé la protéine PipB2 (170). Cette dernière a pour fonction d'altérer la maturation de la SCV vers les compartiments lysosomaux en éloignant ceux-ci à la périphérie de la cellule de l'hôte (170).

Présent seulement chez *Salmonella enterica* sous-espèces *enterica* (incluant Typhi et Typhimurium), le SPI-6 est toutefois génétiquement différent chez ces deux sérovars. En effet, seulement entre Typhi et Typhimurium, on retrouve une différence importante au niveau de la taille de cet îlot. Cette différence de taille peut s'expliquer par la présence de l'opéron fimbriaire *tcf* unique à Typhi comparativement à Typhimurium (281). Cet îlot contient, toutefois, un second opéron fimbriaire présent chez Typhi et Typhimurium : l'opéron *saf* (100, 281). Folkesson *et al.* ont montré qu'une délétion complète de SPI-6 diminue significativement le taux d'adhésion de Typhimurium sur des cellules épithéliales *in vitro* sans, toutefois, altérer sa capacité de causer une infection systémique chez la souris (100).

L'îlot de pathogénicité 7 représente le plus long fragment d'ADN transféré horizontalement chez les salmonelles. Sa longueur de 134 kb n'est pas sa seule caractéristique importante (241). Jusqu'à présent, cet îlot n'a été retrouvé que chez les sérovars Typhi, Paratyphi C et quelques souches capsulées de Dublin (241). Comme proposé par Pickard *et al.*, l'îlot de pathogénicité 7 peut être divisé en 6

régions distinctes selon leur % GC ainsi que par la fonction des séquences codantes (241). Parmi ces 6 régions, trois ont été directement impliquées dans la virulence de Typhi soit la région contenant le pili de type IV, la région contenant la capsule Vi et le prophage *SopE* (absent de Paratyphi C et Dublin) (108, 241, 312).

La capsule Vi est encodée par les régions *tviAE* et *vexAE* de SPI-7 (294). Le gène *tviA* régule la transcription de ces deux régions alors que les gènes *tviBE* sont responsables de la biosynthèse de la capsule. Les gènes *vexAE* ont pour fonction de sécréter les protéines Tvi dans le milieu extracellulaire pour la formation de la capsule (294). Plusieurs des fonctions reliées à la capsule Vi de Typhi ont été caractérisées par l'étude de Looney et Steigbigel en 1986 (194). Ceux-ci ont démontré que la capsule Vi réduit l'effet létal du complément présent dans le sérum cellulaire et réduit également le taux de phagocytose en limitant l'opsonisation par le complément (194). La réduction du taux de phagocytose entraîne moins d'activation de la flambée respiratoire (194). En plus, la capsule diminue la susceptibilité des salmonelles de 3 à 8 fois face à un choc au peroxyde d'hydrogène (194).

L'étude de la spécificité d'hôte des sérovars de *Salmonella enterica* a mené les chercheurs à se pencher sur les différences importantes entre les sérovars. Alors que Typhimurium induit la sécrétion d'IL-8, le chémoattractant responsable d'attirer les neutrophiles vers la lumière intestinale durant la phase intestinale de l'infection humaine, Typhi reste silencieux en n'induisant pas la sécrétion de cette interleukine (247). Cependant, l'utilisation de flagellines purifiées de Typhi permet d'induire la sécrétion de cette interleukine et, par conséquent, des mécanismes d'inhibition doivent être présents chez Typhi l'empêchant d'induire cette réponse inflammatoire (247). Winter *et al.* ont montré que la présence du régulateur de la capsule Vi, *TviA*, est primordiale à Typhi pour inhiber la sécrétion d'IL-8 flagelles-dépendantes tant dans des cellules non phagocytaires (phase intestinale) que dans des cellules phagocytaires (phase systémique) (247, 299, 309). Ceux-ci ont démontré que le régulateur *TviA* contrôle la transcription du régulateur de la biosynthèse des flagelles (299). Ainsi, l'expression de *TviA* cause une diminution

d'expression des flagelles résultant en une diminution d'induction d'IL-8. Suivant cette logique, Winter *et al.* ont transféré le régulateur de TviA chez Typhimurium et ont été capables d'inhiber la sécrétion d'IL-8 dans des cellules non phagocytaires, soit une étape clé dans l'établissement de la gastro-entérite par Typhimurium chez l'homme (299).

Le prophage *sopE* montre des fonctions similaires au gène *sopB/sigD* situé sur le SPI-5. En effet, la protéine SopE est également sécrétée par le SST3-1 lors de l'invasion des cellules non phagocytaires (303). Telle que mentionnée précédemment, cette sécrétion via le SST3-1 permet à SopE d'aller interagir avec la GTPase Rac1 du réseau d'actine et ainsi perpétuer l'ondulation cellulaire essentielle à l'invasion (138, 139, 236, 313). De plus, SopE a pour fonction d'induire la déphosphorylation de l'inositol par l'activation de l'« inositol multiple polyphosphate phosphatase » causant, tout comme SopB/SigD, un efflux massif de fluides dans la lumière intestinale (313). Récemment, Boyle *et al.* ont montré l'implication de SopE dans la destruction des jonctions serrées entre les cellules épithéliales de la barrière intestinale (39).

Bueno *et al.* ont montré que la délétion complète de SPI-7 augmente significativement l'adhésion de Typhi aux cellules épithéliales (42). Physiologiquement, cette augmentation d'adhésion peut être attribuée à l'expression du régulateur central osmolarité dépendant *rscBC* (12). Ce régulateur réprime les gènes situés sur SPI-7 sous une haute osmolarité, soit une condition environnementale retrouvée durant la phase intestinale de l'infection favorisant ainsi l'activation des gènes de SPI-1 essentielle pour l'invasion des cellules épithéliales (12).

L'îlot de pathogénicité 8 des salmonelles est unique à Typhi. Faucher *et al.* ont montré l'expression de la majeure partie des séquences codantes de cet îlot durant la phase systémique de l'infection de macrophages humains par Typhi (92). Toutefois, aucune étude ne fait mention de son implication réelle dans la virulence des salmonelles.

Une étude réalisée chez *Enteritidis* a permis de caractériser le gène *bapA* (biofilm activation protein A) situé sur SPI-9 (181). Cet îlot est également présent chez Typhi et Typhimurium. La mutation de *bapA* a permis de montrer son implication dans la formation de biofilms (181). La protéine BapA est également importante au niveau de l'adhésion cellulaire (181).

L'îlot de pathogénicité 10 des salmonelles pourrait également expliquer la spécificité d'hôte unique de Typhi puisqu'il contient l'opéron fimbriaire *sef* unique à Typhi (281). Cet opéron fimbriaire contient toutefois deux gènes tronqués soit *sefA* et *sefD* rendant possiblement cet opéron non fonctionnel, mais aucune étude n'a été réalisée de façon à déterminer la fonctionnalité de celui-ci.

L'îlot de pathogénicité 11 des salmonelles a été identifié lors du séquençage d'une souche multi-résistante de *Salmonella enterica* sérovar Cholerasuis (51). Il est également retrouvé chez Typhi et Typhimurium. Parmi les gènes encodés sur SPI-11, les gènes *pagC* et *msgA* ont été impliqués dans la virulence des salmonelles. Le gène *pagC* codant pour une protéine membranaire est régulé par le SDC PhoP/PhoQ et s'avère essentiel à la survie intracellulaire (131, 212, 220). De plus, la protéine PagC a été identifiée par la méthode de la « In vivo induced antigen technology » comme étant une protéine ciblée par l'hôte pour créer une réponse humorale (voir section 1.4.4) (140). Même s'il n'est pas régulé par le SDC PhoP/PhoQ comme *pagC*, le gène *msgA* est essentiel à la survie intracellulaire de Typhimurium durant une infection de souris (131).

SPI-12 se retrouve chez la plupart des sérovars de *Salmonella enterica* (51, 209). Cet îlot contient le gène *sspH2* codant pour une protéine effectrices sécrétée par le SST3-2 (209). In vitro, SspH2 inhibe la polymérisation d'actine autour de la SCV suite à la phagocytose suggérant une fonction essentielle de SspH2 au niveau de la survie des salmonelles durant la phase intracellulaire d'une infection de macrophages (207, 209).

Les SPI-13 et 14 ne se retrouvent pas dans la plupart des sérovars de *Salmonella enterica*. Ces îlots, peu caractérisés, sont absents chez Typhi, mais présents chez Typhimurium. Ceux-ci n'ont toutefois pas fait l'objet d'études approfondies dans la virulence de Typhimurium jusqu'à présent.

1.2.5. Résistance aux chocs acides

Le stress acide rencontré par les salmonelles lors de leur cycle d'infection peut se faire à deux niveaux soit au niveau de l'estomac de façon transitoire (mécanisme inné de défense de l'hôte) et lors de l'acidification de la SCV suite à l'invasion des cellules épithéliales ou phagocytaires (7, 102, 104, 105, 210, 258). Les salmonelles sont toutefois équipées d'au moins quatre systèmes d' « Acid Tolerance Response » (ATR) principalement identifiés par les travaux du Dr. Foster. Ces travaux ont mené à une meilleure compréhension des mécanismes de tolérance à l'acidité de Typhimurium in vitro (103).

L'un des ATR observé chez les salmonelles se divise en deux phases distinctes lorsque les salmonelles sont en phase exponentielle de croissance. La première phase est médiée par une préexposition des salmonelles à un pH légèrement acide (soit un pH d'environ 5.8) rendant celles-ci apte à résister à une exposition subséquente à un pH normalement létal (pH de 3.3) (104). Foster a identifié des mutants hypersensibles à ce choc acide dont les mutants pour les gènes *unc* (ou *atp*), *fur* et *phoP* (104, 105). Le gène *unc* code pour une pompe à protons essentielle pour l'extrusion des protons et le maintien du pH intracellulaire légèrement basique. Les données in vitro d'hypersusceptibilité des mutants *unc* et *fur* ont été confirmées in vivo par une augmentation significative de la dose létale lors d'infections de souris infectées oralement (115). La seconde phase est caractérisée par la synthèse d' « acid shock proteins » (ASPs) suite à un choc acide plus sévère tel que celui auquel les salmonelles doivent faire face dans l'estomac (18). Les fonctions de ces ASPs sont toujours inconnues, mais il est possible que les ASPs préviennent ou réparent les dommages causés à l'ADN ou

aux macromolécules bactériennes par l'acidité (105). Individuellement, chacune des phases permet aux salmonelles de survivre aux chocs acides orchestrés par l'hôte, mais la synergie de ces deux phases confère une protection optimale (102).

En phase stationnaire, deux autres ATR ont été identifiés par le Dr. Foster (102, 104, 105, 188). Le premier système caractérisé en phase stationnaire de croissance est pH-dépendant et nécessite obligatoirement l'expression d'ASPs et l'activation du SDC EnvZ/OmpR (19). Le second système caractérisé en phase stationnaire est pH-indépendant et résulte de l'induction du facteur de transcription sigma S (89, 188). Ce facteur de transcription est normalement exprimé dans des conditions de irritations nutritionnelles ou lors de différents stress tel que le choc acide (89). Les deux systèmes inductibles en phase stationnaire agissent toutefois plus lentement que dans le cas de ATR en phase exponentielle (188).

Un quatrième système d'ATR basé sur la décarboxylation de la lysine a également été identifié chez *Typhimurium* (231). L'entrée de la lysine via le transporteur *lysP* ou *cadB* permet à cette dernière d'interagir avec les protons présents dans le cytoplasme bactérien lors du choc acide (231, 277). L'interaction entre la lysine et les protons est catalysée par la lysine décarboxylase produisant de la cadavérine qui sort de la cellule via le transporteur *cadB* augmentant le pH intracellulaire (231).

Peu d'études ont été réalisées directement sur *Typhi* concernant l'ATR. Tiwari *et al.* ont montré que l'ATR observée en phase exponentielle chez *Typhimurium* est également induite chez *Typhi* (279).

1.2.6. Pyroptose

La mort cellulaire observée lors d'infections de salmonelles semble être un élément important pour l'établissement d'une infection systémique (modèle de typhoïde murine), mais un élément important également pour l'hôte. Schwan *et al.*

ont montré que Typhimurium pouvait induire la mort cellulaire des macrophages alors que Typhi ne le pouvait pas (268). Deux processus de mort cellulaire ont été décrits lors d'infections de macrophages par Typhimurium : un mécanisme rapide qui est caspase-1 et SPI-1-dépendant (1-2 h post-infection) et un mécanisme retardé qui est SPI-2-dépendant (18-24 h post-infection) (148, 289). L'induction de la mort cellulaire rapide (caspase 1 et SPI-1 dépendant) s'avère une étape importante pour l'hôte pour contenir l'infection de Typhimurium puisque l'altération de la caspase-1 et par conséquent du processus de mort cellulaire rapide, augmente significativement la susceptibilité des souris lors d'une infection par Typhimurium (179). Inversement, Typhimurium doit nécessairement tirer profit de cette mort cellulaire puisque c'est lui-même qui l'induit par la translocation de l'effecteur : SipB du SST3-1. La mort cellulaire rapide induite par Typhimurium se situe entre un processus d'apoptose conventionnelle et de nécrose. En effet, l'infection de macrophages par Typhimurium mène à la condensation du nucléole, le rétrécissement cellulaire et surtout le maintien de l'intégrité membranaire, soit des conséquences normales de l'apoptose (98). La même infection mène également à la relâche de deux interleukines proinflammatoires : l'IL-1 β et l'IL-18, par l'activation de la caspase-1. La propriété inflammatoire de la mort cellulaire rapide s'avère une caractéristique importante de la nécrose (98, 148, 254). Ce processus a été nommé pyroptose par Cookson dû au côté inflammatoire de l'apoptose (98). Le second mécanisme implique les gènes de SPI-2 et l'activation des caspases 2-3-6 et 8 menant à la mort des cellules par apoptose conventionnelle (289). Tel que mentionné, ce mécanisme est retardé (18 à 24 h post-infection) et se produit donc probablement au niveau de la réplication de Typhimurium dans les SCV des macrophages pouvant suggérer un mécanisme de sortie pour Typhimurium (289). Selon l'hypothèse de van der Velden *et al.*, ces deux mécanismes de mort cellulaire se succèdent dépendamment des conditions de croissance dans lesquelles se retrouvent Typhimurium (289). Durant la phase intestinale de l'infection, Typhimurium induit l'expression des gènes de SPI-1, soit les gènes responsables de l'induction la mort cellulaire inflammatoire rapide pouvant ainsi attirer de nouvelles cellules phagocytaires telles que des macrophages au site d'infection. Suite à la phagocytose par ces nouvelles cellules

immunitaires, les conditions intracellulaires sont, telles que mentionnées précédemment, favorables à l'expression des gènes de SPI-2 retardant le processus de mort cellulaire. Ces macrophages peuvent donc servir de vecteurs pour Typhimurium pour se rendre vers les sites systémiques lors d'une infection de souris.

1.3. Interaction hôte-pathogène

L'interaction constante entre les pathogènes et leurs hôtes a mené à une coévolution permettant aux deux organismes de survivre. Au niveau cellulaire, les mécanismes de défense des hôtes sont nombreux permettant à ceux-ci de se défendre face aux différentes infections bactériennes, fongiques ou virales.

1.3.1. Peptides antimicrobiens

Les PA représentent un des mécanismes de défense importants de l'hôte pour faire face à des infections microbiennes. Les PA sont généralement constitués d'une centaine d'acides aminés et se divisent en deux grandes familles : les défensines (α , β , θ) et les cathélicidines (230). Les cellules de paneth (situées dans les cryptes de la barrière intestinale), les cellules épithéliales et cellules immunitaires telles que les macrophages et les neutrophiles constituent d'importantes sources de PA (242). Plusieurs signaux extracellulaires permettent d'activer la synthèse et la sécrétion des PA (193, 230). Parmi ceux-ci, IL-1 régule la sécrétion de la β -défensine 2 humaine suggérant que la mort cellulaire rapide induite par Typhimurium conduit à l'induction de la sécrétion de ce PA constituant un avantage pour l'hôte, malgré la lyse cellulaire subséquente (193). La charge positive de la plupart des PA permet à ceux-ci de faciliter leur attachement avec les LPS bactériens chargés négativement (142). Cet attachement favorise la pénétration des PA dans la membrane augmentant la perméabilité membranaire et menant ultimement à la lyse bactérienne (83, 142).

1.3.2. Composés oxydatifs toxiques

La synthèse d'intermédiaires oxydatifs toxiques s'avère un autre mécanisme de défense essentiel pour l'hôte (199, 291). Dans la voie phagosome-lysosome, le complexe NADPH oxydase a pour fonction de réduire l'oxygène en différents composés oxydatifs toxiques, tels que les ions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène, les ions hydroxyles ainsi que du peroxydinitrite, rapidement après la phagocytose (211, 291). Ces composés se retrouvent normalement dans les phagosomes (et SCV), mais tels que mentionnés précédemment, les effecteurs du SST3-2 ont pour fonction d'inhiber la fusion entre les phagosomes (et SCV) et les lysosomes n'exposant pas les salmonelles au complexe NADPH oxydase et ainsi aux composés oxydatifs (292). Les composés oxydatifs affectent de façon toxique toutes les fonctions importantes bactériennes, soit l'intégrité membranaire, l'activité enzymatique et la réplication de l'ADN (211).

1.3.3. Composés nitriques toxiques

Tout comme les composés oxydatifs, les composés nitriques sont essentiels à l'hôte pour optimiser sa défense contre des bactéries pathogènes (199, 291). Les cellules épithéliales produisent des composés d'oxyde nitrique (NO) néfastes pour la croissance des salmonelles (300). Cette production de NO est catalysée par l'enzyme iNOS qui est induite par l'invasion de bactéries pathogènes (300). Les formes intermédiaires du NO ainsi que les composés créés par l'interaction entre le NO et les composés oxydatifs ont des effets bactériostatiques et bactéricides en agissant sur les membranes, l'ADN ou sur les protéines (6, 67, 291). Outre les cellules épithéliales, la salive contient également une grande concentration de nitrates (75). Ces nitrates peuvent être convertis en nitrite par certaines bactéries de flore buccale favorisant ainsi les défenses innées de l'hôte (75). Malgré leur effet moins bactéricide comparativement aux composés oxydatifs, les composés nitrites sont néanmoins essentiels pour contenir une infection aux salmonelles (291). Vazquez-Torres *et al.* ont montré un effet synergique temporel entre les composés

oxydatifs et nitriques où les composés oxydatifs agissent en premier lieu pour réduire la charge bactérienne et où les composés nitriques agissent en deuxième pour inhiber la prolifération des salmonelles survivantes confirmant leur effet bactériostatique (291).

1.3.4. Limitation nutritionnelle macrophages-dépendants

L'hôte a aussi la capacité de limiter la disponibilité d'éléments essentiels à la croissance de bactéries pathogènes intracellulaires. Dans leur criblage de mutants, Fields *et al.* et Leung et Firlay ont isolé un total de 22 mutants de Typhimurium avirulents lors d'infection de souris (97, 189). Ces 22 mutants contenaient tous une mutation leur conférant une auxotrophie pour un élément essentiel à la croissance, que ce soit envers des gènes codant pour la biosynthèse ou le transport de purines, de pyrimidines ou d'acides aminés suggérant fortement que les SCV sont limitées pour ces éléments (97, 189). La concentration de Mg^{2+} à l'intérieur des SCV semble également se retrouver en quantité limitée puisqu'une altération de l'opéron *mgtCB* codant pour un transporteur de Mg^{2+} rend la souche mutante incapable de survivre dans les macrophages (34). Selon le transcriptome de Typhimurium dans des macrophages murins, l'opéron *pstSCAB* est fortement induit dans les SCV des macrophages. Cet opéron code pour un transporteur de phosphate inorganique suggérant que la SCV pourrait limiter la présence de cet élément essentiel à la survie des salmonelles (87, 297). Encore selon le transcriptome de Typhimurium dans des macrophages murins, les gènes associés à l'acquisition du fer sont induits (87). Inversement, dans une autre étude, les données issues du transcriptome de Typhi dans les macrophages humains ne montrent aucune induction des gènes associés à l'acquisition du fer suggérant que les SCV contiennent suffisamment d'ions de fer (93). Ces données, à première vue contradictoires, pourraient s'avérer un autre élément différentiel entre Typhi et Typhimurium lors de l'infection expliquant leur spectre d'hôte différent.

Les travaux du Dr. Philippe Gros ont mis en évidence l'implication d'une protéine eucaryote cellulaire : la « Natural Resistance-Associated Macrophage Protein » (NRAMP) indispensable à la résistance de l'hôte face à des bactéries pathogènes (y compris les salmonelles) (129, 293). Retrouvée principalement associée aux phagosomes (ou SCV) des macrophages, cette protéine a pour fonction de transporter les ions divalents à l'extérieur des phagosomes limitant la concentration de ceux-ci à l'intérieur des phagosomes (ou SCV) (152). De ce fait, l'altération de cette protéine augmente la susceptibilité des souris ou lignée cellulaire de macrophages murins face à Typhimurium (129, 179).

1.4. Étude génétique

La compréhension du cycle d'infection des salmonelles résulte de la mise en commun des résultats issus de plusieurs techniques telles que la « in vivo expression technology », la « signature-tagged mutagenesis », la « differential fluorescence induction », la « in vivo induced antigen technology » ainsi que la « selective capture of transcribed sequences » (130, 137, 144, 197, 285).

1.4.1. « In Vivo Expression Technology »

Le principe de la « In vivo expressed technology » (IVET) est basé sur une sélection positive in vivo suivie d'une sélection négative in vitro permettant l'identification de gènes induits in vivo seulement (figure 13). Mahan *et al.* ont utilisé cette technique pour identifier des gènes de Typhimurium essentiels durant la phase systémique du modèle de typhoïde murine (197). Ceux-ci ont cloné sur un vecteur suicide des fragments d'ADN génomique de Typhimurium en amont des gènes *purA* (pour la sélection in vivo) et *lacZ* (pour la sélection in vitro) sans promoteur (figure 13A) (197). Ces vecteurs ont ensuite été insérés dans une souche de Typhimurium déficiente pour la biosynthèse de purines (figure 13B) (197). L'intégration obligatoire de ce vecteur dans le génome de Typhimurium a

permis d'obtenir une seule copie non mutée du gène où s'est produit la recombinaison homologue en plus de permettre la sélection positive éventuelle par la présence du promoteur en amont du gène *purA* (197). La récupération des clones issus de la rate des souris trois jours après l'infection intrapéritonéale a permis d'identifier des promoteurs inductibles *in vivo* par la complémentarité de *purA* (figure 13C). Suite à la sélection *in vivo*, les clones survivants ont été inoculés sur un milieu différentiel pour cribler les clones *lac*- (criblage colorimétrique négative) (figure 13D) (197). En conclusion, Mahan *et al.* ont identifié 5 gènes de *Typhimurium* exprimés *in vivo* dans le modèle de typhoïde murine. La mutation de ces gènes a causé une augmentation de la dose létale 50% (DL50) de 50% confirmant l'efficacité de la technique IVET (197).

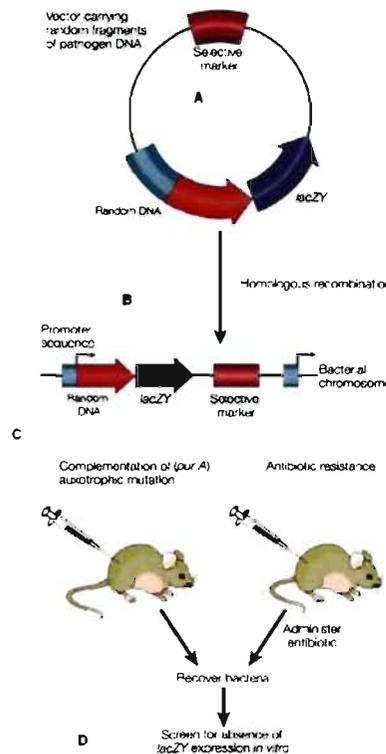


Figure 13 : Schématisation de la technique IVET telle qu'utilisée par Mahan *et al.* en 1993 **A :** Construction de la banque de vecteurs avec des fragments d'ADN génomique de *Typhimurium* **B :** Événement de recombinaison homologue **C :** Sélection positive (in vivo). **D :** Sélection négative colorimétrique (in vitro) (adaptée de (197)).

1.4.2. « Signature-Tagged Mutagenesis »

La technique « Signature-tagged mutagenesis » (STM) a été utilisée pour la première fois en 1995 dans l'étude de Hensel *et al.* qui tentait d'identifier de nouveaux gènes essentiels de *Typhimurium* durant la phase systémique du modèle de typhoïde murine (144). Cette technique nécessite la création de transposons uniques qui doivent être incorporés au génome de *Typhimurium* pour y créer des

mutations par insertion (figure 14A-B) (144). Ces mutants ont ensuite été inoculés intrapéritonéalement à des souris (144). L'ADN des mutants ayant survécu à l'infection a été récupéré et utilisé pour amplifier le transposon de chacun des mutants. Les fragments amplifiés ont ensuite été hybridés par rapport à la banque initiale de mutants (figure 14C) (144). L'absence d'hybridation d'un transposon par rapport à la banque initiale de mutants résulte en une mutation atténuante durant la phase systémique de l'infection (figure 14D) (144). Cette technique a permis à Hensel *et al.* d'identifier non seulement des gènes déjà connus pour être essentiels à la survie de *Typhimurium* chez la souris (opéron *rtb*), mais également de mettre en évidence l'implication des gènes de SPI-2 au niveau de la survie des salmonelles lors d'une infection (144, 269).

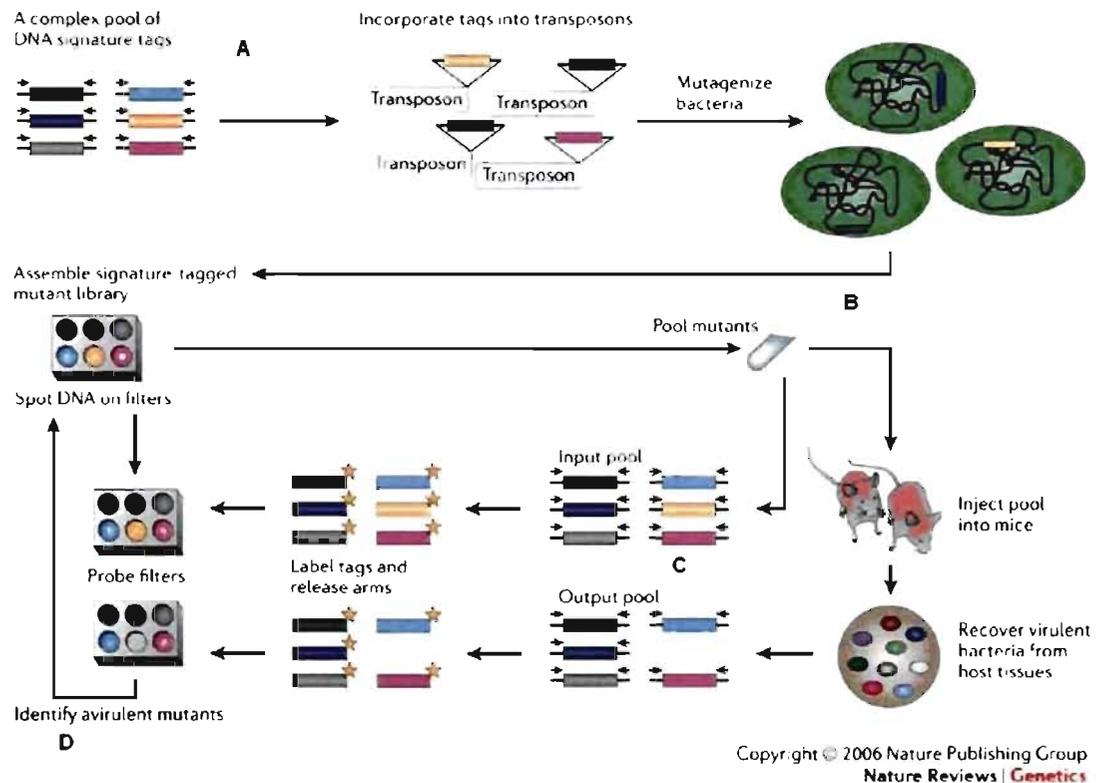


Figure 14 : Schématisation de la technique STM telle qu'utilisée par Hensel *et al.* en 1995 **A :** Création de la banque de transposons. **B :** Infection de la souris (in vivo). **C :** Récupération, marquage, amplification et hybridation des transposons des clones survivants. **D :** Identification des gènes impliqués durant la phase systémique (adaptée de (144)).

1.4.3. « Differential Fluorescence Induction »

Contrairement aux méthodes STM et IVET qui se sont avérées être des méthodes intéressantes, mais limitées et non quantitatives dans l'identification de gènes exprimés à différents stades d'infections de bactéries pathogènes, la méthode de « Differential Fluorescence Induction » (DFI) permet de quantifier individuellement l'induction de différents gènes dans différentes conditions (287). La technique DFI consiste à cloner des promoteurs en amont du gène codant pour la protéine verte fluorescente (GFP) sans promoteur (figure 15A) (285). Les clones obtenus sont exposés à une condition expérimentale pour permettre l'induction des gènes sous cette condition résultant en l'expression de la GFP (Figure 15B). Les

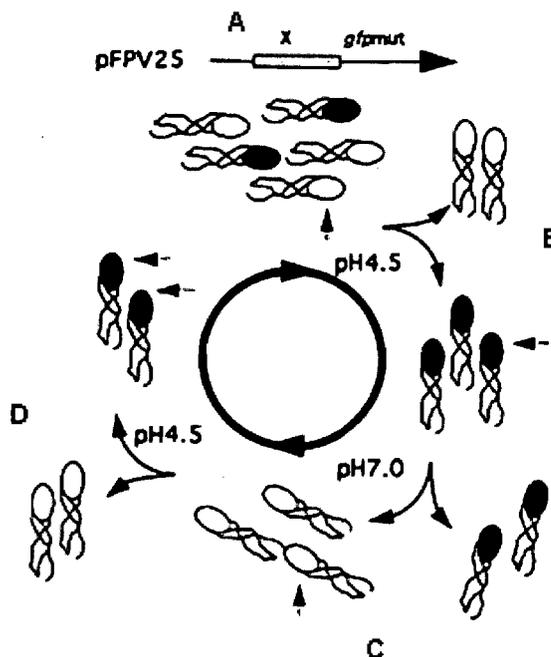


Figure 15 : Schématisation de la technique DFI telle qu'utilisée par Valdivia et Falkow en 1996. **A :** Construction de la banque de promoteurs dans Typhimurium. **B :** Sélection des clones GFP positifs sous des conditions de pH acide. **C :** Sélection des clones GFP négatifs sous des conditions de pH neutre. **D :** 2^e sélection des clones GFP positifs sous des conditions de pH acide (285).

clones fluorescents sont triés par « Fluorescence Activated Cell Sorting » pour être ensuite exposés à la condition contrôle permettant d'éliminer les gènes constitutivement induits (figure 15C). D'autres étapes d'enrichissement sont généralement effectuées pour obtenir une banque de clones présentant un gène inducible seulement sous la condition expérimentale (figure 15D). Par séquençage, il est possible d'associer les promoteurs aux gènes inducibles sous cette condition.

Cette technique a pour avantage de quantifier l'expression des gènes identifiés. La technique DFI a été utilisée in vitro pour l'identification de gènes acides dépendants de Typhimurium, de gènes SOS-dépendants de *E. coli* et de gènes

importants pour la pathogénèse de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus pneumoniae* dans des conditions d'infections (3, 21, 285). Cette technique a été optimisée de façon à être utilisée in vivo permettant d'identifier des gènes de *E. coli*, de Typhimurium, d'Enteritidis, de *Corynebacterium pseudotuberculosis* et de *Mycobacterium avium* induits presque exclusivement lors d'une infection de macrophages ou d'un autre modèle (65, 206, 227, 255, 259, 286). Toutefois, peu d'études ont été poussées jusqu'à la caractérisation de chacun des gènes identifiés pour leur implication réelle lors d'une infection.

1.4.4. « In Vivo-Induced Antigen Technology »

Comparativement aux trois autres techniques préalablement décrites, la « In Vivo-Induced Antigen Technology » (IVIAT) se base non pas sur l'expression des gènes in vivo, mais sur l'aptitude immunogénique des protéines bactériennes produites in vivo (137). En effet, cette technique nécessite l'utilisation de sérum de patients ayant survécu à une infection bactérienne. Ce sérum est soumis à une étape soustractive où les anticorps correspondant aux protéines induites in vitro du pathogène seront retirés du sérum du patient convalescent ne laissant que les anticorps reconnaissant des protéines induites dans le cadre de l'infection (figure 16A) (137). L'hybridation des anticorps restant avec une banque de clones exprimant les protéines de la bactérie pathogène étudiée permet l'identification des protéines induites in vivo (figure 16B-C) (137). La technique IVIAT a été appliquée contre le sérum de patients ayant survécu à la fièvre typhoïde (140). Harris *et al.* ont identifié 35 protéines de Typhi induisant une réponse humorale chez l'hôte, dont PagC et plusieurs protéines associées aux fimbriae (140). La technique IVIAT peut, par rapport à IVET, STM et DFI, étudier l'interaction de Typhi directement avec l'homme sans passer par le modèle de typhoïde murine ou encore par l'utilisation de lignée cellulaire. Par contre, tout comme IVET, IVIAT nécessite un criblage négatif contre une condition in vitro et par conséquent, certaines protéines induites in vivo peuvent être très importantes pour la virulence du micro-organisme pathogène, mais être éliminées à cause de leur expression constitutive.

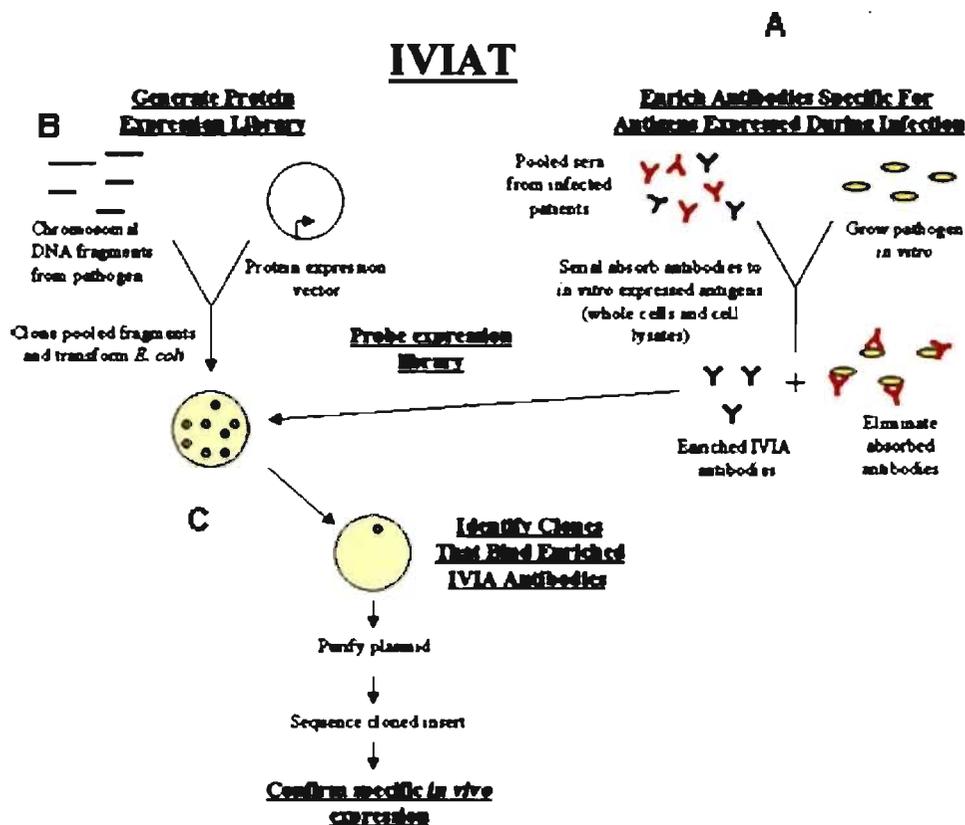


Figure 16 : Schématisation de la technique IVIAT telle qu'utilisée par Handfield *et al.* en 2000 **A** : Sélection soustractive des anticorps contre une condition *in vitro*. **B** : Construction d'une souche bactérienne exprimant les protéines du micro-organisme pathogène testé. **C** : Hybridation des anticorps *in vivo* restant contre la souche bactérienne exprimant les protéines permettant d'identifier les protéines inductibles *in vivo* (137).

1.4.5. « Selective Capture Of Transcribed Sequences » - Biopuces

Les études de IVET, STM et DFI ont eu un impact important quant à l'identification de facteurs de virulence essentiels au niveau du cycle d'infection des salmonelles (i.e les gènes de SPI-2 (voir section 1.2.4.2)). Toutefois, ces études n'ont identifié qu'une vingtaine de gènes essentiels. D'autres techniques ont été mises au point pour étudier l'ensemble des gènes transcrits d'une bactérie pathogène lors de son interaction avec l'hôte telle que la « selective capture of transcribed sequences » (SCOTS) en combinaison avec des biopuces de la

bactérie pathogène étudiée. La technique SCOTS permet d'amplifier spécifiquement des transcrits bactériens *in vivo* (130). Au départ, l'ARN total est extrait pour être transcrit en ADNc avec des amorces de séquences connues en 5' et aléatoires en 3'. L'ADNc est ensuite capturé par de l'ADN génomique de la bactérie étudiée pré-hybridé avec les ARN_R et biotinylé. L'ADNc capturé est élué et amplifié avec les amorces correspondant à l'extrémité 5'. Les étapes de capture et d'amplification sont répétées à deux autres reprises pour finalement donner des transcrits bactériens induits spécifiquement *in vivo*. Cette technique a été utilisée pour identifier des gènes de Typhi induits lors d'infections de macrophages humains (64, 92). La technique SCOTS a été modifiée permettant à Faucher *et al.* d'identifier des gènes uniques à Typhi induits dans les macrophages humains (92). Parmi ces gènes, Faucher *et al.* ont identifié plusieurs gènes de SPI-7 et des gènes fimbriaire *stg* et *sta*, tous uniques à Typhi (92). En 2006, Faucher *et al.* combinaient la technologie SCOTS et les biopuces permettant l'obtention du profil d'infection de Typhi dans les macrophages humains à différents temps post-infection (93). L'étude de Faucher *et al.* a confirmé des faits bien établis tels que les gènes de SPI-2 et les gènes associés à la résistance aux peptides antimicrobiens, étaient bien induits durant la phase systémique de l'infection (93).

1.5. Fluorescence

Les protéines fluorescentes se sont avérées être des outils indispensables pour étudier les interactions hôte-pathogène. En effet, ces protéines ont permis de suivre les étapes d'infection et de localiser l'emplacement de plusieurs protéines associées au cycle d'infection des salmonelles. Les protéines fluorescentes ont comme avantage, comparativement à d'autres systèmes rapporteurs de ne pas nécessiter l'ajout de substrat pour leur observation dans des cellules ou tissus humains (37).

1.5.1. Protéine verte fluorescente – « Green Fluorescent Protein »

Telle que mentionnée précédemment, la technique DFI nécessite l'utilisation d'une protéine fluorescente. La « Green fluorescent protein » (GFP) est habituellement la protéine utilisée puisqu'elle a été largement étudiée et modifiée pour permettre son utilisation dans différentes conditions.

La GFP est une protéine de 26 kDa produite par une méduse nommée *Aequorea victoria* ainsi que d'autres invertébrés marins (37, 54). Cette protéine est constituée de 238 acides aminés organisés en 11 feuillets- β entourant un anneau- α fluorescent (54). L'anneau- α est composé de trois acides aminés essentiels à sa fluorescence soit une sérine, une tyrosine et une glycine en position 65-66-67 respectivement (37). La GFP sauvage possède deux pics d'excitation soit un majeur situé à une longueur d'onde d'environ 395 nm et un mineur situé à une longueur d'onde d'environ 470 nm occasionnant son émission à 508 nm (37, 54). Des modifications ont été apportées à la GFP pour optimiser son utilisation dans des modèles eucaryotes ou procaryotes, pour intensifier son émission de fluorescence et pour augmenter ou diminuer sa stabilité permettant respectivement son expression constitutive ou de façon transitoire (10, 37, 54, 59). Cormack *et al.* ont isolé la variante GFP_{mut3} de la GFP par mutagenèse aléatoire (59). Cette dernière possède non seulement une intensité de fluorescence 21 fois supérieure à la GFP sauvage, mais montre également un haut niveau de stabilité comme en fait foi son temps de demi-vie d'environ 24 h chez *E. coli* (10). Inversement, l'ajout d'une queue C-terminale LVA, LAA, AAV ou ASV sur la GFP_{mut3} a permis de créer une GFP_{mut3} déstabilisée idéale pour étudier l'expression transitoire des gènes (10). Plusieurs conditions ont été identifiées comme étant optimales à son expression. Un pH inférieur à 5.5 et supérieur à 12 réduit de façon importante la fluorescence de la GFP sauvage et de ces formes variantes (54). La température joue également un rôle important dans la maturation de la protéine sauvage où une température de 37 °C réduit de 25 % l'intensité lumineuse de la GFP (54).

1.5.2. Protéine rouge fluorescente - « *Discosoma striata* Red »

L'expression simultanée de deux ou plusieurs protéines fluorescentes peut être une option intéressante pour l'étude de l'interaction hôte-pathogène. Outre la GFP, de nouvelles protéines fluorescentes ont été découvertes et modifiées. La protéine « *Discosoma striata* Red » (DsRed) est une protéine de 28 kDa qui a été isolée d'une anémone marine : *Discosoma striata* (15, 180). Tout comme pour la GFP, un anneau formé de trois acides aminés (une glutamine, une tyrosine et une glycine) en position 66-67-68 permet la fluorescence de la DsRed (180). La DsRed émet à une longue d'onde d'environ 580 nm lorsqu'excitée sur l'un de ces deux pics d'excitation situés à une longueur de 488 nm ou 558 nm (180). Le pic d'excitation situé à 488 nm permet donc d'exciter simultanément la GFP et la DsRed. Malgré cet aspect intéressant, la protéine DsRed sauvage présente trois désavantages majeurs, soit sa tendance à s'oligomériser, sa longue période de maturation ainsi que sa faible fluorescence verte. L'oligomérisation de la DsRed est connue pour causer des agrégats toxiques chez *E. coli* et *Typhimurium* (15, 168). La protéine DsRed sauvage nécessite également une maturation variant entre 12 et 48 h avant d'obtenir une intensité maximale (15). Cette longue période de maturation résulte d'un passage intermédiaire par un fluorophore immature émettant une fluorescence verte pour ensuite poursuivre sa maturation vers son stade final rouge (180). Tout comme la GFP, la DsRed sauvage a été modifiée pour créer des variants optimisés pour différentes conditions d'expression. Le variant DsRed.T4 est muté sur son résidu d'asparagine en position 42 permettant à la DsRed de maturer beaucoup plus rapidement (jusqu'à 15 fois plus rapidement que la protéine sauvage) à des températures optimales de croissance bactérienne (30). Cette optimisation a, toutefois, causé une diminution de l'intensité de fluorescence de 66 % comparativement à la DsRed sauvage (30).

Malgré les avantages reliés à l'utilisation des protéines fluorescentes (GFP ou DsRed), deux études montrent que ces protéines sont toxiques pour le développement des salmonelles (168, 251). En effet, le temps de doublement augmente de façon significative en présence d'une protéine fluorescente (251). De

plus, Knodler *et al.* ont montré que la présence de GFP ou d'une « Red Fluorescent Protein » (RFP) provoque une diminution significative de l'invasion de Typhimurium et une diminution du taux de survie de ce dernier dans des cellules tant phagocytaires que non phagocytaires (168).

2. But - Hypothèses

Les différents sérovars de *Salmonella enterica* présentent des caractéristiques qui leur sont propres tel que leur spectre d'hôte. Malgré leur ressemblance génétique, Typhi et Typhimurium diffèrent au niveau de leur spécificité d'hôte où Typhi infecte seulement l'homme alors que Typhimurium a la capacité d'infecter plusieurs hôtes.

L'hypothèse de ce projet était que Typhi contient des gènes qui sont exprimés différemment dépendamment de l'hôte infecté pouvant expliquer pourquoi Typhi survit et se multiplie chez l'homme, mais pas chez la souris. Dans la seconde partie de cette maîtrise, nous avons remarqué l'expression des gènes d'invasion des salmonelles (SPI-1) durant la phase intracellulaire d'une infection de macrophages humains. Nous avons émis l'hypothèse que ces gènes d'invasion pourraient être importants durant la phase intracellulaire.

Le but de ce projet était dans un premier temps d'identifier des gènes Typhi responsables de sa spécificité d'hôte unique. Dans un second temps, nous voulions caractériser l'implication des gènes d'invasion des salmonelles au niveau de leur survie lors d'infections de macrophages.

Le premier objectif consistait à identifier des gènes induits différemment lors d'infections de macrophages humains et murins. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique DFI qui permettait de sélectionner des gènes induits dans les macrophages humains et qui ne l'étaient pas lors d'infections de macrophages murins. Nous avons tenté de caractériser certains des gènes identifiés par DFI pour leur implication réelle au niveau de la survie intracellulaire de Typhi. Pour le second objectif, des infections de macrophages humains et murins ainsi que des tests de cytotoxicité ont été réalisés dans le but de caractériser l'implication des gènes d'invasion (SPI-1) des salmonelles au niveau de la phase intracellulaire d'une infection de macrophages.

3. Matériels et Méthodes

Souches bactériennes et conditions de croissance: Toutes les souches de salmonelles et de *E. coli* utilisées durant ce projet (tableau II) ont été cultivées à 37 °C sur la nuit en milieu liquide Luria-Bertani (LB) : Chlorure de sodium à 10 g/L, extrait de levure à 5 g/L et tryptone à 10 g/L ou en milieux solides LB-agar additionnés d'antibiotiques ou de suppléments lorsque nécessaire à une concentration de 50 µg/ml pour l'ampicilline, la kanamycine et l'acide diaminopimélique (DAP) et 34 µg/ml pour le chloramphénicol. Pour la seconde tentative de mutation par échange allélique, les transformants de Typhi ont été inoculés sur géloses minimales M9 : sodium phosphate à 64 g/L, potassium phosphate à 15 g/L, chlorure de sodium à 2.5 g/L, chlorure d'ammonium à 5 g/L, sulfate de magnésium à 0.241 g/L, chlorure de calcium à 0.0111 g/L, du glucose à 0.4 % et 15 g/L d'agar.

Tableau II : Souches bactériennes utilisées

Souches	Génotype
ISP1820	Souche sauvage de Typhi
DEF010	Souche de Typhi exprimant la GFP de façon constitutive
ISP1820 Δ <i>sty0159</i>	Mutation du gène <i>sty0159</i>
ISP1820 Δ <i>sty1358-1367</i>	Mutation de la région <i>sty1358</i> à <i>sty1367</i>
ISP1820 Δ SPI-1	Mutation polaire du gène <i>invA</i>
SL1344	Souche sauvage de Typhimurium
SL1344 Δ SPI-1	Mutation polaire du gène <i>invA</i>
DH5 α	Souche de <i>E. coli</i> pour construction
MGN-617	Souche de <i>E. coli</i> mutante pour le gène essentiel <i>asd</i>

Culture cellulaire : Les monocytes humains (THP-1) (ATCC# TIB-202) ont été maintenus à 37 °C avec 5 % de CO₂ et les passages cellulaires ont été effectués à

raison d'une fois par semaine dans du RPMI contenant 10% de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur, 10 mM de D-glucose, 25 mM de N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic à pH 7, 4 mM L-glutamine, 0.1 mM d'acides aminés non essentiels et 1 mM de sodium pyruvate. Les monocytes ont été différenciés en macrophages par l'ajout de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) à une concentration finale de 10^{-7} M au moment de la mise en plaque pour une période de 48 h. Pour la technique DFI, les THP-1 ont été ensemencés dans des plaques de 6 puits à raison de 3×10^6 monocytes par puits. Pour l'analyse en cytométrie de flux et les tests de survie, les monocytes ont été ensemencés à raison de 5×10^5 monocytes par puits (dans des plaques 24 puits) également supplémentés de PMA à 10^{-7} M. Les macrophages murins (RAW 264.7) (ATCC# TIB-71) ont été maintenus à 37 °C avec 5 % de CO₂ et les passages cellulaires ont été faits dans du DMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur, 25 mM de N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic à pH 7 et 4 mM L-glutamine (DMEM complet) à raison de deux fois par semaine. Les mêmes quantités de macrophages RAW 264.7 ont été utilisées pour la technique DFI (3×10^6 macrophages), l'analyse en cytométrie de flux et les tests de survie (5×10^5 macrophages). Vingt-quatre heures après la mise en plaque, les macrophages RAW 264.7 étaient prêts à être infectés. Toutes les infections de macrophages réalisées dans ce projet, tant THP-1 que RAW 264.7, ont été faites avec une dose infectieuse d'environ 10 salmonelles par macrophage. Les cellules épithéliales humaines HeLa (ATCC# CCL-2.2) ont été maintenues à 37 °C avec 5 % de CO₂ et les passages cellulaires ont été effectués dans du DMEM complet à raison de deux fois par semaine. Les cellules HeLa ont été mises en plaque à une concentration de 2×10^5 cellules/puits pour être infectées 24 h plus tard. Les tests d'adhérence et d'invasion de cellules épithéliales ont été réalisés avec une dose infectieuse d'environ 20 salmonelles par cellule.

Tests de survie avec les macrophages THP-1 et RAW 264.7 : Toutes les souches bactériennes utilisées pour les infections de macrophages ont été incubées à 37 °C sur la nuit en absence d'agitation dans un milieu LB. Les macrophages des deux lignées cellulaires ont été infectés avec une dose

infectieuse de 10 :1 pour ensuite être centrifugés à 800 x g pour 5 minutes pour synchroniser les infections. Les macrophages ont ensuite été incubés à 37 °C pour une période de 20 minutes correspondant au temps 0. Au temps 0, chacun des puits a été lavé à trois reprises avec du « phosphate buffered-saline » (PBS) : chlorure de sodium à 8 g/L, potassium phosphate 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. Après les lavages, les macrophages correspondant au temps 0 ont été lysés avec du PBS supplémenté d'acide deoxycholique à 0.1% (PBS-DOC) pour permettre la récupération des bactéries. Les macrophages correspondant aux temps 2 et 24 h post-infection ont été supplémentés avec du RPMI ou du DMEM (selon les macrophages) additionné de gentamicine (100 µg/ml) pour éliminer les salmonelles extracellulaires et réincubés à 37 °C jusqu'au temps 2 h. Au temps 2 h post-infection, les macrophages ont été lavés au PBS. Les macrophages correspondant au temps 2 h post-infection ont été lysés avec du PBS-DOC 0.1% permettant de récupérer les bactéries ayant survécues à la phase intracellulaire. De la même façon qu'au temps 0, les macrophages correspondant au temps 24 h post-infection ont été supplémentés avec du RPMI ou du DMEM (selon les macrophages) additionné de gentamicine à 12 µg/ml et replacés à 37 °C jusqu'au temps 24 h. Au temps 24 h post-infection, les macrophages ont, encore une fois, été lavés avec du PBS pour ensuite être lysés par le PBS-DOC 0.1% pour récupérer les bactéries. Toutes les bactéries récupérées durant l'infection ainsi que les suspensions initiales de chacune des souches bactériennes testées ont été diluées dans du PBS pour être inoculées sur LB-agar. Les unités formatrices de colonies (UFC) dans chacune des conditions ont été déterminées. Le taux de phagocytose a été calculé en fonction de la UFC initiale ($UFC\ T0/UFC\ initiale$), alors que les taux de survie à 2 et 24 h ont été calculés en fonction du nombre de bactéries ayant été phagocytées (taux de survie 2 h = $UFC\ T2/UFC\ T0$ et taux de survie 24 h = $UFC\ T24/ UFC\ T0$).

Test d'adhérence et d'invasion : Pour les tests d'adhérence et d'invasion, les souches bactériennes ont été incubées sur la nuit à 37 °C sans agitation. Les cellules épithéliales humaines HeLa ont été infectées avec ces souches bactériennes avec une dose infectieuse de 20 :1. Suite à une centrifugation de 5

minutes à 800 x g, les cellules HeLa ont été incubées à 37 °C pour une période de 90 minutes suite à laquelle toutes les cellules ont été lavées avec du PBS. Les cellules HeLa correspondant au temps 90 minutes post-infection (temps d'adhérence) ont été lysées avec du PBS-DOC 0.1% pour récupérer les bactéries. Les cellules HeLa pour le temps 180 minutes post-infection (temps d'invasion) ont été supplémentées avec du DMEM additionné de gentamicine à 100 µg/ml et incubées 90 minutes supplémentaires. Au temps 180 minutes post-infection, les cellules ont été lavées avec du PBS et lysées avec du PBS-DOC 0.1 %. Toutes les suspensions bactériennes récoltées ont été diluées et ensemencées sur LB-agar pour effectuer le décompte des UFC. Le taux d'adhérence et le taux d'invasion ont été calculés en fonction de la UFC initiale (Taux d'adhérence = UFC T90/UFC initiale et taux d'invasion = UFC T180/UFC initiale).

Extraction d'ADN : Pour DFI, l'ADN génomique de la souche ISP1820 a été extrait. Brièvement, une culture de la souche ISP1820 issue d'une croissance sur la nuit en agitation a été concentrée par centrifugation à 3300 x g et reprise dans du Tris-EDTA à pH 7.4. La lyse bactérienne a été faite en ajoutant le tampon de lyse : Tris 50 mM à pH 7.3, du chlorure de sodium à 0.3 M, sodium dodecyl sulfate à 1 % et l'acide ethylenediaminetetraacetic à 10 mM, à la culture bactérienne pour une période de 5 minutes à 37 °C. Les protéines ont été dégradées de cette suspension par un traitement de 30 minutes à 65 °C avec une protéinase K à une concentration finale de 80 µg/ml. Une succession d'extractions organiques au phénol saturé en tampon de lyse, au phénol-chloroforme-isoamylalcool et au chloroforme ont permis de déprotéiniser davantage la suspension d'ADN génomique de Typhi. Cet ADN a été précipité sur la nuit à -20 °C en ajoutant de l'éthanol pur pour finalement être resuspendu dans de l'eau distillée. La pureté de l'ADN génomique de Typhi extrait a été observée sur gel d'agarose et sa concentration a été déterminée par spectrophotométrie (Nanodrop ND-1000).

Construction de la banque de promoteurs de Typhi : La technique DFI telle qu'utilisée par Valdivia et Falkow en 1996 nécessite la création d'une banque de promoteurs (285). Brièvement, l'ADN génomique de Typhi a été digéré par

l'enzyme de restriction *Sau3A* (5'-GATC-3') et les fragments de 0.2 à 1 kb ont été purifiés sur gel avec le kit « Qiagen Gel extraction kit » selon les recommandations du fabricant. En parallèle, le vecteur pBBR1-GFP a été extrait en utilisant l'ensemble «Qiagen Mini-prep kit » toujours selon les recommandations du fabricant et a été digéré avec l'enzyme de restriction *Bam*HI créant des extrémités cohésives avec les fragments génomique *Sau3A* (figure 17) (229).

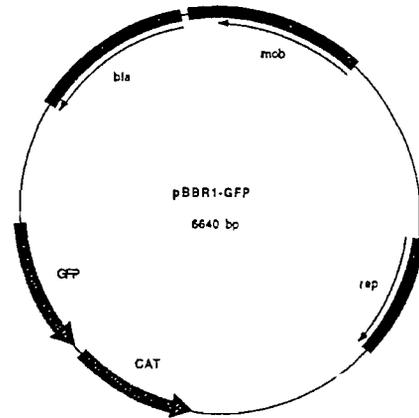


Figure 17 : Représentation du vecteur pBBR1-GFP (229).

Les fragments génomiques de Typhi ont été clonés dans le vecteur pBBR1-GFP et ceux-ci ont été transformés dans une souche de *E. coli* chimiquement compétente (20 min à 4 °C avec la ligation, 1 min ½ à 42 °C, 2 min à 4 °C et 90 min à 37 °C en agitation) (136). L'ensemble des vecteurs issu de ces transformations chimiques a été extrait en utilisant l'ensemble « Qiagen Mini-prep kit » pour ensuite être électroporé dans la souche ISP1820 constituant la banque de clones initiale de Typhi.

Électroporation : La souche ISP1820 a été cultivée sur la nuit à 37 °C en agitation pour ensuite être concentrée et lavée par une succession de centrifugations à 3300 x *g* à 4 °C et de resuspension dans une solution de glycérol à 10 % v/v. L'électroporateur (Biorad) a été programmé pour envoyer un courant de 2.5 mV aux salmonelles. Environ 20 000 clones de Typhi électrotransformés ont été récupérés sur LB-agar additionné d'ampicilline soit une résistance constitutive encodée par le gène *bla* présent sur le vecteur pBBR1-GFP.

Microscopie à fluorescence : Des lamelles circulaires ont été placées au fond des puits avant d'ajouter 5 x 10⁵ macrophages THP-1 ou RAW 264.7 permettant à ceux-ci d'y adhérer avant l'infection. Suivant le protocole de tests de survie, quatre clones de la banque initiale ainsi que les souches ISP1820 et DEF010 servant respectivement de souche contrôle négatif et positif pour la fluorescence, ont été utilisées pour infecter les macrophages THP-1 et RAW 264.7. Suite à l'infection (au

temps 2 ou 24 h), les macrophages ont été fixés avec de la paraformaldéhyde 2 % au lieu d'être lysés par le PBS-DOC. Ces macrophages fixés sur la lamelle ont été placés sur lame avec un agent gélifiant pour 24 h. Les images de microscopie à fluorescence ont été prises avec un microscope (Nikon Eclipse E600) équipé d'une caméra numérique (Nikon digital camera DXM 1200F). Le microscope est muni d'un filtre FITC permettant la visualisation de la GFP.

« **Differential Fluorescence Induction** » : La technique DFI a été faite en suivant le protocole de tests de survie dans les macrophages. Brièvement, à 2 et 24 h post-infection, les macrophages ont été récoltés dans du PBS sous l'action d'un grattoir cellulaire. Les macrophages récoltés étaient prêts pour le tri cellulaire ou l'analyse en cytométrie de flux. Suite à la première infection de macrophages THP-1, les macrophages infectés par des clones de la banque initiale de Typhi présentant une fluorescence supérieure à celle issue de la souche ISP1820 ont été triés. Ces macrophages ont été lysés pour libérer les clones contenant un promoteur inducible en amont du gène codant pour la GFP dans les macrophages THP-1. Les clones bactériens triés ont été recueillis sur milieux LB-agar additionnés d'ampicilline donnant une deuxième génération de clones de Typhi. Ces clones ont été utilisés pour infecter (selon le même modèle d'infection) des macrophages RAW 264.7 où seulement les macrophages ayant été infecté par des clones de Typhi non fluorescents (fluorescence similaire aux macrophages RAW 264.7 infectés par la souche ISP1820) ont été triés. Les clones de Typhi issus de cette infection ont également été récoltés sur milieux LB-agar additionnés d'ampicilline. Cette étape du tri cellulaire permettait d'enlever les clones contenant des promoteurs inducible dans les macrophages murins ou des promoteurs constitutifs en amont du gène *gfp*. Finalement, cette troisième génération de clones a été utilisée pour infecter de nouveau les macrophages THP-1 et seuls les macrophages THP-1 contenant un clone de Typhi présentant une fluorescence supérieure aux macrophages THP-1 infectés par la souche ISP1820 ont été triés. Les clones de Typhi recueillis suite à cette dernière étape ont été isolés en plaque 96 puits.

Tri cellulaire et analyse en cytométrie de flux : Le tri cellulaire a été effectué avec un appareil de Becton Dickenson FACS Vantage SE munie d'un laser argon émettant à 488 nm et de filtres FL-1 (530/30 nm) et FL-2 (585/42 nm) pour évaluer respectivement la fluorescence verte et rouge. Les analyses en cytométrie de flux ont été effectuées avec le cytomètre Becton Dickenson FACSCalibur également muni d'un laser argon émettant à 488 nm et de filtres FL-1 (530/30 nm) et FL-2 (585/42 nm). L'analyse des données de cytométrie de flux a été faite avec le logiciel Cell Quest.

Pourcentage de fluorescence : Suite à l'analyse en cytométrie de flux, un pourcentage de fluorescence standardisé par rapport au pourcentage de fluorescence de la souche contrôle DEF010 a été établi pour chacun des clones dans chacune des deux lignées cellulaires (% de fluorescence standardisé = % de fluorescence d'un clone / % de fluorescence de DEF010). Cette standardisation par rapport à la souche DEF010 permettait d'éliminer les différences au niveau du taux de phagocytose entre les deux lignées de macrophages. Le pourcentage de fluorescence standardisé de chacun des clones suite à une infection de macrophages THP-1 a été comparé au pourcentage de fluorescence standardisé de ces mêmes clones suite à l'infection de macrophages RAW 264.7 donnant un ratio d'expression standardisé THP-1/RAW 264.7 (ratio THP-1/RAW264.7 = % de fluorescence standardisé dans les THP-1 / % de fluorescence standardisé dans les RAW 264.7).

Séquençage : L'ADN plasmidique a été extrait pour chacun des clones de Typhi présentant un pourcentage de fluorescence standardisé dans les macrophages THP-1 élevé en plus d'un ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 supérieur ou égal à 1.7 en utilisant l'ensemble "QIAGEN Mini-prep kit". L'ADN plasmidique a été séquencé au centre d'innovation Génome-Québec de l'Université McGill en utilisant l'amorce GFP-out (5'- ACT TTT CAC TGG AGT TGT CCC- 3'). De cette façon, chacun des clones triés a pu être associé à un gène de Typhi par le programme informatique BLAST sur le site WEB du « National Center for Biotechnology Information » (www.ncbi.nih.gov). Ensuite, les gènes identifiés à

partir du séquençage des clones ont été classés selon l'indice de classification de l'Institut Sanger (www.sanger.ac.uk).

Extraction d'ARN: L'ARN total de chacune des conditions testées (RPMI, THP-1 Surnageant, THP-1 T0, THP-1 T2, THP-1 T8, THP-1 T24, RAW 264.7 T0, RAW 264.7 T2, RAW 264.7 T8, RAW 264.7 T24) a été extrait en utilisant une solution de TRIzol (Invitrogen) telle que recommandée par le fabricant. Brièvement, les macrophages (THP-1 ou RAW 264.7) ont été infectés en duplicata dans une plaque 24 puits selon le protocole des tests de survie avec la souche ISP1820. Un millilitre de TRIzol a été utilisé pour récolter l'ARN total des deux puits infectés pour les temps 0, 2, 8, 24 h post-infection. Le surnageant issu du 20 minutes d'incubation à 37 °C pour tous ces temps a été récolté, centrifugé à 3300 x *g* et traité avec le TRIzol constituant ainsi la condition nommée THP-1 Surnageant. La souche ISP1820 a également été incubée 20 minutes à 37 °C avec 5% de CO₂ dans une plaque 24 puits contenant seulement du RPMI additionné de PMA (sans cellules). Celle-ci a été récoltée, centrifugée et traitée au TRIzol constituant la condition contrôle nommée RPMI. L'ARN total issu d'une infection de macrophages THP-1 avec la souche ISP1820 ΔSPI-1 à 2 et 8 h post-infection a également été extrait avec du TRIzol. L'ARN de toutes les conditions a subséquemment été traité avec du chloroforme, de l'isopropanol pur, du chlorure de lithium (Ambion) à 2.5 M et avec 8 U de Turbo DNA-free (Ambion) selon les recommandations des fabricants pour éliminer l'ADN et les protéines présentes dans la suspension d'ARN. L'ARN final a été conservé dans de l'eau traitée au diéthyle pyrocarbonate (DEPC). La pureté et la concentration de l'ARN ont été établies en spectrophotométrie (Nanodrop ND-1000). L'ARN de chaque condition a été testé pour sa contamination en ADN par une réaction PCR classique pour le gène unique à Typhi : *tviA*.

Transcription inverse : L'ARN de chacune des conditions a été rétrotranscrit en triplicata en plus d'une réaction sans la Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) agissant comme contrôle négatif. Pour chacune des réactions, un minimum de 50 ng d'ARN pur a été mélangé à des hexamères aléatoires (Sigma) à une concentration de 25 µg/ml pour 10 minutes à 70 °C et 2 minutes à 4 °C

linéarisant et figeant respectivement l'ARN. À cela a été ajouté des dNTPs-DEPC à 10 mM, le tampon de la transcriptase inverse, du dithiothréitol à 0.1 M et 5 U d'inhibiteurs d'ARNase (Invitrogen) pour 10 minutes à 25 °C. Deux cents unités de la Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) ont été ajoutés à 3 des 4 réactions de transcription inverse pour chacune des conditions donnant 3 échantillons positifs contre 1 échantillon contrôle non rétrotranscrit. Toutes les réactions de chacune des conditions ont été placées dans un thermocycleur (Biometra) pour 10 minutes à 25 °C, 50 minutes à 45 °C et 15 minutes à 70 °C.

PCR en temps réel : Les réactions de PCR en temps réel ont été faites avec les réactifs du FastStart SYBR Green Master (Roche) selon leur recommandation où les amorces ont été utilisées à une concentration finale de 25 pmol/μl (tableau III). Ces réactions ont été effectuées à l'aide d'un Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) suivant le protocole : 10 minutes à 95 °C pour activer la polymérase, 10 secondes à 95 °C pour dénaturer l'ADN, 15 secondes à 64 °C pour l'hybridation des amorces, 30 secondes à 72 °C pour l'étape de polymérisation et une période de dénaturation progressive pour déterminer la spécificité d'amplification. Les étapes de dénaturation, d'hybridation et de polymérisation ont été reprises en boucle pour 40 cycles. L'expression de chacun des gènes (« Crossing Threshold » (C_t)) dans chacune des conditions testées a été évaluée. Toutes les analyses de PCR en temps réel ont été faites avec le logiciel Rotor-Gene 6000 series software. Pour confirmer les résultats obtenus par DFI, l'expression normalisée par rapport à *rpoD* des gènes *sty0154*, *sty0159*, *sty1361* et *sty3460* dans les macrophages THP-1 a été comparée à l'expression normalisée de ces mêmes gènes dans les macrophages RAW 264.7 selon le calcul du logarithme ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (267). Dans un deuxième temps, l'expression normalisée par rapport à l'ARN 16s de certains gènes de SPI-1 a été évaluée pour confirmer les résultats du transcriptome de Typhi dans les macrophages THP-1. Brièvement, l'expression normalisée des gènes *hilA*, *iagB*, *sptA/sipA*, *invA* et *pipD* a été évaluée dans les conditions suivantes : THP-1 Surnageant, THP-1 T0, THP-1 T2, THP-1 T8 et THP-1 T24, pour être comparée à l'expression normalisée de ces mêmes gènes dans la condition contrôle RPMI selon le calcul du logarithme ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (267). Finalement, l'expression

normalisée par rapport à l'ARN16s des gènes de SPI-2 *ssrB*, *ssaR*, *sseB*, *spiC* de la souche mutante pour les gènes de SPI-1 a été comparée à l'expression normalisée de ces mêmes gènes de la souche ISP1820 à 2 et 8 h post-infection selon le calcul du logarithme ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (267).

Mutations par échange allélique conventionnel : Le vecteur suicide pMEG-375 a été utilisé pour effectuer les mutations par échange allélique des gènes *sty0159* et *invA* et pour la délétion de la région *sty1358-1367* (162). Un fragment génétique de 292 pb correspondant à l'extrémité 5' du gène *sty0159* et un fragment de 256 pb correspondant à son extrémité 3' ont été amplifiés avec les amorces 0159F_1_BamHI et 0159F_2 et les amorces 0159R_3 et 0159R_4_Xba respectivement (tableau IV). Les amorces ont été faites de façon à ce que l'extrémité 3' de 0159F_2 corresponde à l'extrémité 5' de 0159R_3 et vice versa rendant ces amorces complémentaires. Les deux fragments amplifiés ont ensuite été utilisés ensemble comme matrice pour faire une réaction de PCR : 80 °C pour 120 s, une étape de dénaturation de 30 s à 94 °C, une étape d'hybridation de 60 s à 57 °C, une étape de polymérisation de 60 s à 72 °C et une étape supplémentaire de polymérisation de 420 s à 72 °C. Les étapes de dénaturation, d'hybridation et de polymérisation ont été répétées à 25 reprises. Le fragment amplifié de 548 pb correspondant au gène *sty0159* muté a été purifié avec le « Qiagen PCR purification kit » et cloné dans le vecteur suicide pMEG-375 avec les enzymes de restriction *Bam*HI et *Xba*I. Ce vecteur a été transformé dans la souche de *E. coli* MGN-617 déficiente pour le gène *asd*. La souche de *E. coli* transformée a servi de souche donneuse pour l'étape de conjugaison avec la souche ISP1820 en ensemencant ces deux souches sur géloses additionnées de DAP. Les transconjugants de Typhi ont été sélectionnés sur des géloses contenant du chloramphénicol sans DAP. La sélection des événements d'échange allélique a été possible par la présence du gène *sacB* sur le vecteur suicide rendant le sucrose létal pour les transconjugants possédant encore le vecteur suicide pMEG-375::*sty0159* muté. Ainsi, les transconjugants ayant la capacité de croître sur LB-agar sans NaCl supplémenté avec 5% de sucrose ont été testés par PCR pour s'assurer de la mutation du gène *sty0159* dans la souche ISP1820. En plus des

Tableau III : Séquence des amorces pour chacun des gènes testés en PCR en temps réel

Gènes	Amorces 5'	Amorces 3'
<i>rpoD</i>	TCGTGAAGCGAAAGTCCTGCGTAT	TTCGCGGGTAACGTCGAACTGTTT
<i>ARN16s</i>	CGGGGAGGAAGGTGTTGTG	CAGCCCGGGGATTTACATC
<i>sty0154</i>	TCGATTGTGCCATCGTTGTTGACG	TGACCACACATGAACAAGTCACCG
<i>sty0159</i>	ATGATAAAGCGTTGCGTCTCTCCG	AACACAACCGCCCATCCTGTAAG
<i>sty1361</i>	TAAACACCAGGCGGATAAAGCCG	TTGCGGAACATCTTCCTGCTGAG
<i>sty3460</i>	ACCGATGATTGCCCTGATTCTGG	ACACCGGCAAATTAAGCTCG
<i>hilA</i>	AGTTGGAGGAGGCCTTACAAAGGA	GTAATCCACAGCTTAGTGATCCCTGC
<i>iagB</i>	ATTTCTGTCATTGTGGGCGCATCC	TCCTTATATCCGATCGTTTCGGCGAC
<i>sptA/sipA</i>	AAAGAATGTTCGTGCCTGGTGGTG	TGTAGCTCCCTCTGAAATAGGCTG
<i>invA</i>	ATTATGGAAGCGCTCGCATTGTGG	AATATAACGCGCCATTGCTCCACG
<i>pipD</i>	ACAATACGTTTGCGCCAGATGTGC	AAGCGTTGTGCTTCTTTTCGGATGC
<i>ssrB</i>	AGTCCTGTTAGCGGCATTGCAAAC	AGTTGATGATTGGTCGTGTCAGCG
<i>ssaR</i>	TTCCGGCATTACGGTGAGTCAG	AAGCAGGTCAATAGCCAGAAAGGG
<i>sseB</i>	ATATGGCGATCATGGGAAGCTGGA	TCGGTATTCCGGTTGGCGTCATTA
<i>spiC</i>	AGCTTACCTAAGCCTTGTCTTGCC	TCCGCTGTGAGCTGTATAGCATAGTC

tests PCR, les transconjugants ont été testés pour leur sensibilité au chloramphénicol et à l'ampicilline, soit des résistances acquises avec le vecteur pMEG-375. La mutation de la région *sty1358-1367* a été effectuée de la même façon, mais en amplifiant un fragment de 392 pb en 5' du gène *sty1358* avec les amorces 1358F_BamHI et 1358R et un fragment de 486 pb en 3' du gène *sty1367* avec les amorces 1367F et 1367R_XbaI. Ces fragments ont servi de matrice pour l'amplification du fragment *sty1358-1367* muté où l'étape d'hybridation a été faite à 57 °C. Ce fragment de 878 pb a été purifié et cloné dans pMEG-375. Suite à cette construction, les étapes d'échange allélique conventionnel ont été suivies. Finalement, la mutation du SST3-1 a été faite dans les souches ISP1820 et SL1344 en mutant le gène *invA* ainsi que les autres gènes situés en aval puisque la mutation par échange allélique s'est avérée polaire. Dans ce cas, des fragments génétiques cohésifs de 372 pb et 346 pb ont été amplifiés avec les amorces invA-

BF et *invA*-BR et les amorces *invA*-EF et *invA*-ER correspondant respectivement à la partie 5' et 3' du gène *invA*. Ceux-ci ont servi de matrice pour l'amplification du fragment génétique *invA* muté (718 pb). Le fragment *invA* muté, amplifié et purifié a été cloné dans pMEG-375. Suite à cette construction, les étapes d'échange allélique conventionnel ont été suivies.

Test de cytotoxicité : Les tests de cytotoxicité ont été faits avec la trousse de détection « Cyto Tox 96 » (Promega) selon leur recommandation permettant d'évaluer la relâche de l'enzyme cytoplasmique : la lactate déshydrogénase. Brièvement, le surnageant issu de macrophages THP-1 ou RAW 264.7 infectés ont été récupéré 24 h après l'infection. Les surnageants de macrophages non infectés (lyse minimale) et de macrophages lysés avec une solution de triton à 9% (lyse maximale) ont également été récupérés. Tous les surnageants ont été dilués 1/5 pour le surnageant des macrophages THP-1 et 1/10 pour le surnageant des macrophages RAW 264.7, distribués en triplicata dans une plaque 96 puits et traités avec la solution colorimétrique de l'ensemble « Cyto Tox 96 ». Une fois la réaction arrêtée après 30 minutes, la $D.O_{420nm}$ de chacun des triplicata de surnageant a été évaluée par spectrophotométrie (Bio-Tek ELX800) permettant de calculer le pourcentage de mort cellulaire associé à chacune des souches bactériennes testées dans les deux lignées cellulaires. 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 = $(D.O_{420nm} \text{ du surnageant} - \text{lyse minimale}) / (\text{lyse maximale} - \text{lyse minimale}) * 100$.

Tableau IV : Séquences des amorces utilisées pour effectuer les mutations par échange allélique des gènes *sty0159*, *sty1358-1367* et *invA*

Amorces	Séquence	Tm (°C)
0159F_1_BamHI	CGGGATCCGCATGGTTTATGAAGGCTGGC	64
0159F_2	CCCATCACGCATCGCCTCATCAATATGGTTC	58
0159R_3	GAGGCGATGCGTGATGGGGCAGAGCTAAC	64
0159R_4_Xba	GCTCTAGACGACTGGAGCGAAGAGCGCTAAC	74
1358F_BamHI	CGGGATCCGCGCGTCTGCTATAAAATTTAC	60
1358R	GATTGCCGGATGTTATACTGCCGGATGTAG	60
1367F	GTATAACATCCGGCAATCATCATCGAAGC	62
1367R_XbaI	GCTCTAGATCAGAACTACGTAAAGCGGC	62
invA-BF	CGGGATCCCCTACAAGCATGAAATGGCAGAAC	70
invA-BR	AGGACAAGACTTCAATCAAGATAAGACGGCTGG	70
invA-EF	TGATTGAAGTCTTGTCTCCTTACGTCTGTCTCG	68
invA-ER	GCTCTAGACGCCAGATCCATACATCATCG	70

4. Chapitre I: Caractérisation des clones obtenus par « Differential Fluorescence Induction »

4.1. Introduction

Les études de IVET, STM et IVIAT ont permis d'identifier de nouveaux facteurs de virulence des salmonelles impliqués dans l'établissement d'une maladie systémique (137, 144, 197). Outre les facteurs de virulence issus de ces études, nous voulions identifier de nouveaux facteurs de virulence de Typhi spécifiquement induits lors d'infections de macrophages humains. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique complémentaire, normée « differential fluorescence induction ».

4.2. Résultats

Construction de la banque de promoteurs de Typhi : Nous avons obtenu une banque de promoteurs de Typhi en digérant son ADN génomique en fragments variants entre 0.2 et 1 kb. Nous avons cloné cette banque de promoteurs en amont des gènes *gfp* et *cat* sans promoteur codant respectivement pour la protéine verte fluorescente et la résistance au chloramphénicol dans le vecteur pBBR1-GFP (figure 17) (229). Ensuite, ces constructions ont été électroporées dans la souche ISP1820, nous donnant approximativement 20 000 clones de Typhi contenant le vecteur pBBR1-GFP avec un insert (banque primaire de Typhi). Sachant que le génome de Typhi contient 4.8 Mb, l'ensemble des inserts de nos 20 000 clones couvrirait théoriquement environ 4 fois le génome entier de Typhi.

Confirmation de la présence de promoteurs inductible in vitro et in vivo dans la banque primaire de Typhi : Pour s'assurer que notre banque primaire contenait des promoteurs inductible in vitro et in vivo en amont des gènes *gfp* et *cat*, nous avons évalué l'induction de ces gènes en deux temps. Premièrement, la banque primaire a été étalée sur LB-agar additionnées de chloramphénicol (résultats non

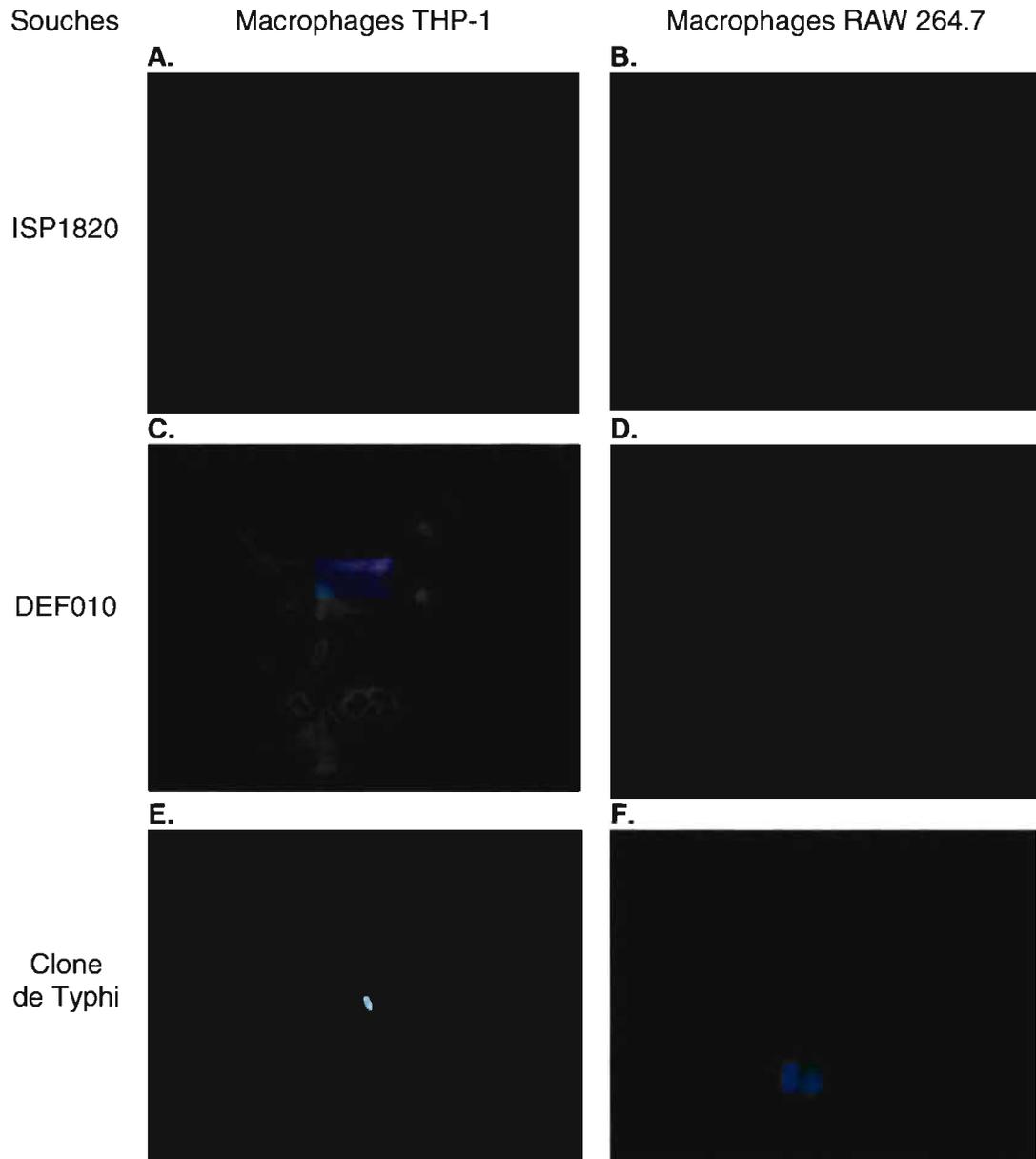


Figure 18 : Induction in vivo de la GFP de la banque initiale de Typhi. Microscopie à fluorescence des clones de Typhi durant une infection de macrophages à 2 h post-infection. Les figures **A**, **C** et **E** correspondent respectivement à l'infection des macrophages THP-1 par la souche contrôle négative ISP1820, la souche contrôle positive DEF010 et un clone de la banque initiale de Typhi. Les figures **B**, **D** et **F** correspondent aux infections de macrophages RAW 264.7 par les mêmes souches bactériennes.

montrés). La croissance des clones sur ces géloses-chloramphénicol a permis de conclure que la banque primaire de Typhi contenait des promoteurs inductibles

in vitro permettant l'expression de la protéine Cat. En second lieu, l'efficacité de cette même banque a été testée in vivo lors d'une infection de macrophages THP-1 et RAW 264.7 (figure 18). À la figure 18, on remarque l'absence de fluorescence intracellulaire pour la souche contrôle négative ISP1820 non transformé par la banque de promoteurs lors de l'infection de macrophages THP-1 (fig. 18A) et RAW 264.7 (fig. 18B). La fluorescence bactérienne a pu être observée par l'infection de ces mêmes lignées de macrophages avec la souche contrôle positive DEF010 exprimant la protéine GFP de façon constitutive (figure 18C et 18D). Quatre clones de la banque primaire sélectionnés au hasard ont tous montré de la fluorescence dans les deux lignées cellulaires nous permettant de conclure que ces clones contenaient tous un promoteur inductible in vivo en amont du gène codant pour la GFP du vecteur pBBR1-GFP (figure 18E et 18F et résultats non montrés).

Enrichissement des promoteurs inductibles exclusivement dans les macrophages humains THP-1: La banque primaire de Typhi a été utilisée pour infecter successivement des macrophages THP-1 et RAW 264.7, ces étapes servant à enrichir la banque primaire de Typhi pour des promoteurs induits spécifiquement durant une infection de macrophages THP-1. Chacune des infections était suivie d'une séance de tri cellulaire permettant de trier les clones de Typhi fluorescents suite à l'infection de macrophages THP-1, les clones de Typhi non fluorescents suite à l'infection de macrophages RAW 264.7 et finalement les clones de Typhi fluorescents suite à une seconde infection de macrophages THP-1 et cela, à 2 et 24 h post-infection (figure 19). La souche ISP1820 et la souche DEF010 ont été utilisées respectivement comme contrôle négatif et positif de fluorescence (figure 19). Suite à la première infection de macrophages THP-1, 0.24 % et 0.20 % des macrophages THP-1 ont été triés respectivement à 2 et 24 h post-infection, puisqu'ils étaient infectés par un clone de Typhi présentant un taux de fluorescence supérieur à la souche contrôle ISP1820 non-transformée (figure 19A). Environ 2000 clones de Typhi à chacun des temps (2 et 24 h post-infection) ont été récupérés sur LB-agar et utilisés pour infecter des macrophages RAW 264.7. Suite à cette infection, 98.12% et 99.08% des macrophages RAW 264.7 ont été triés (2 et 24 h post-infection respectivement) représentant des clones de Typhi ne contenant

pas de promoteurs inductibles en amont du gène *gfp* lors d'infections de macrophages RAW 264.7 (figure 19B). Finalement, cette génération de clones de Typhi a été utilisée pour réinfecter des macrophages THP-1. De cette infection, 0.60 % et 0.05 % des macrophages THP-1 ont été triés (à 2 et 24 h post-infection respectivement) puisqu'ils exprimaient une fluorescence supérieure à la fluorescence des macrophages infectés par la souche ISP1820 (figure 19C). Ces étapes d'enrichissement, nous ont permis de récolter environ 1000 clones à 2 h post-infection et 250 à 24 h post-infection. De tous les clones sélectionnés positivement suite à la dernière infection de macrophages THP-1, 384 ont été isolés en plaque 96 puits soit 192 à 2 h post-infection et 192 à 24 h post-infection.

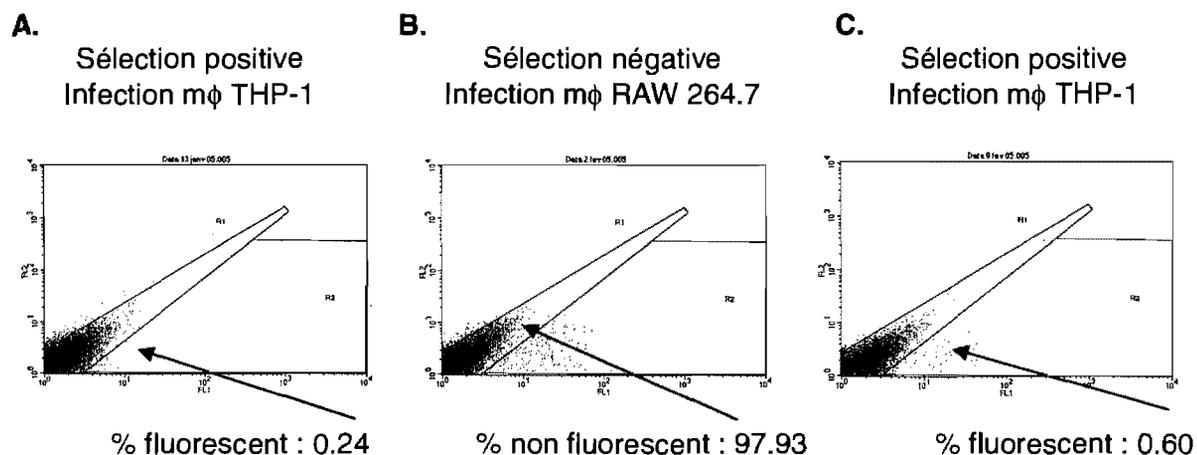


Figure 19 : Enrichissement de la banque de clones de Typhi à 2 h post-infection. **A :** Sélection des macrophages THP-1 contenant un clone de Typhi fluorescent. **B :** Sélection des macrophages RAW 264.7 contenant un clone de Typhi non fluorescent. **C :** Sélection finale des macrophages THP-1 contenant un clone de Typhi fluorescent. Les limites du tri cellulaire ont été placées avec les souches contrôles ISP1820 et DEF010. Ces étapes d'enrichissement ont permis d'enrichir la banque de clones de 2.5 fois. Le même procédé a été effectué pour les étapes d'enrichissement à 24 h post-infection.

Fluorescence des clones dans les macrophages THP-1 et RAW 264.7: Parmi les 192 clones triés à 2 h post-infection, 48 ont été utilisés individuellement pour infecter des macrophages THP-1 et RAW 264.7 en parallèle. Ces infections ont

permis d'établir un pourcentage de fluorescence standardisé par rapport à la souche contrôle DEF010 dans chacune des deux lignées (Annexe 1). Cette standardisation par rapport à la souche DEF010 permettait d'éliminer les différences au niveau du taux de phagocytose entre les deux lignées de macrophages. De la même façon, le pourcentage de fluorescence standardisé de 48 clones triés à 24 h post-infection a été établi (Annexe 2). Le pourcentage de fluorescence standardisé de chacun de ces clones, dans chacune des deux lignées cellulaires, a ensuite été comparé permettant d'établir un ratio d'expression standardisé THP-1/RAW 264.7 pour chacun des clones dans le contexte d'une infection de macrophages THP-1 par rapport aux macrophages RAW 264.7. Parmi les 96 clones testés, 14 (10 triés à 2 h post-infection et 4 à 24 h post-infection) présentaient un pourcentage de fluorescence standardisé élevé dans les macrophages THP-1 en plus d'un ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 supérieur ou égal à 1.7 (tableau V).

Tableau V : Ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 de 14 clones sélectionnés à 2 et 24 h post-infection

Clones	% fluorescence standardisé dans les macrophages THP-1	% fluorescence standardisé dans les macrophages RAW 264.7	Ratio THP-1 / RAW264.7
2AB3	1,89	1,11	1,7
2AD3	1,06	0,39	2,7
2AD5	4,02	2,05	2,0
2AF1	3,69	2,00	1,8
2AF5	3,97	1,91	2,1
2AF6	4,09	1,96	2,1
2DD5	5,37	3,01	1,8
2DF1	4,23	2,41	1,8
2DF3	4,82	1,96	2,5
2DF5	4,14	1,77	2,3
24AB3	4,40	0,29	15,2
24AD3	6,87	1,98	3,5
24DD4	7,30	2,08	3,5
24DE5	4,46	0,66	6,7

Intensité de fluorescence des clones : Le ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 de chacun des clones de Typhi a permis d'identifier des clones présentant des promoteurs plus inductibles dans les macrophages THP-1 que dans les

macrophages RAW 264.7. Toutefois, ce ratio ne montre pas l'intensité de l'induction de chacun des clones durant l'infection de macrophages THP-1. L'intensité de fluorescence de 7 des clones sélectionnés (2AB3, 2AD5, 2DD5, 2DF3, 2DF5 et 24AD3 et 24DD4) ainsi que celle des souches ISP1820 et DEF010 est illustrée à la figure 20. On remarque que les clones 2AB3, 2AD5, 2DD5, 2DF3, 2DF5 semblent posséder des promoteurs fortement inductibles dans les macrophages THP-1 puisque leur pic de fluorescence se situe entre les deux contrôles alors que les clones 24AB3 et 24DE5 sont moins exprimés intracellulairement.

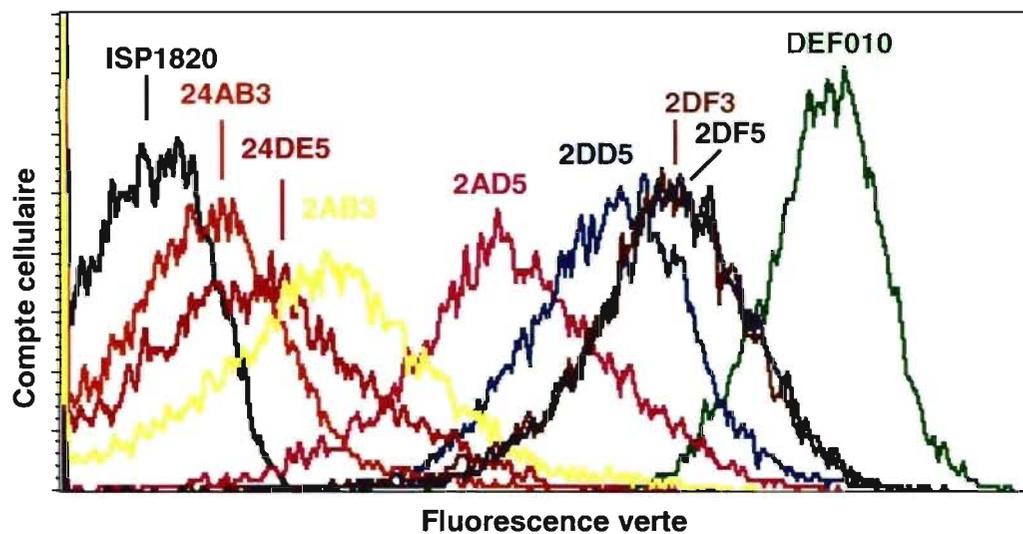


Figure 20 : Intensité de fluorescence de 7 clones de Typhi sélectionnés, soit 2AB3 (jaune), 2AD5 (rose), 2DD5 (turquoise), 2DF3 (brun), 2DF5 (mauve), 24AD3 (orange) et 24DD4 (rouge) par rapport à la souche ISP1820 (noir) et DEF010 (vert) soit les souches contrôles de fluorescence négative et positive respectivement lors d'une infection de macrophages humains.

Identification et classification des gènes de Typhi surexprimés durant l'infection de macrophages THP-1 : Tous les clones sélectionnés du tableau V ont été séquencés ce qui a permis d'identifier 11 gènes surexprimés dans les macrophages THP-1 par rapport à leur expression dans les macrophages RAW 264.7. Les clones 2DF3 et 24DE5 ont été tous les deux associés au même gène et le séquençage du clone 24DD4 n'a pas fonctionné. Selon la classification de l'Institut Sanger, les clones 2DF5, 2DF3 et 24DE5 ont été classés dans la famille

des régulateurs centraux représentant respectivement les gènes *rpoH* et *sty0154* (les clones 2DF3 et 24DE5) (tableau VI). Les gènes associés aux clones 2AD3 (*flhA*), 2AD5 (*pheM*), 2AF5 (*rpsO*) et 2AF6 (*rfaE*) ont été classés dans le métabolisme des macromolécules (tableau VI). De leur côté, les clones 2DD5 et 24AB3 ont été associés à des gènes reliés au métabolisme cellulaire montrant respectivement des homologies de séquences avec les gènes *fruB* et *mtr* de *E. coli* (tableau VI). Finalement, les clones 2AB3 (*sty1361*), 2AF1 (*sty4764*), 2DF1 (*sty2279*) et 24AD3 (*sty3046*) ont été associés à des gènes dont la fonction reste hypothétique puisqu'ils ne présentent pas d'homologie connue jusqu'à présent (tableau VI). Dû à leur ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 élevé (tableau V) ou l'absence de fonction associée aux gènes sélectionnés, les gènes *sty0154*, *sty1361* et *sty3460* ont retenu notre attention pour la poursuite de leur caractérisation durant l'infection de macrophages THP-1. Situé dans la même région que le gène *sty0154*, on retrouve un régulateur transcriptionnel de la famille LysR (*sty0159*) qui a également été ajouté à la liste des gènes à caractériser.

Tableau VI : Gènes et fonctions des gènes associés à chacun des clones triés par DFI

Clone	Gène		Classification du "Sanger Institute"
2DF5	<i>sty4243</i>	<i>rpoH</i>	2. Régulateurs centraux
2DF3	<i>sty0154</i>	<i>lpxC</i>	
24DE5	<i>sty0154</i>	<i>lpxC</i>	
2AD3	<i>sty2122</i>	<i>flhA</i>	
2AD5	<i>sty1774</i>	<i>pheM</i>	
2AF5	<i>sty3464</i>	<i>rpsO</i>	3. Métabolisme des macromolécules
2AF6	<i>sty3379</i>	<i>rfaE</i>	
2DD5	<i>sty2442</i>	<i>fruB</i>	
24AB3	<i>sty3460</i>	<i>mtr</i>	4. Métabolisme cellulaire
2AB3	<i>sty1361</i>	-	
2AF1	<i>sty4764</i>	<i>ytfK</i>	5. Fonctions hypothétiques
2DF1	<i>sty2279</i>	-	
24AD3	<i>sty3046</i>	-	
24DD4	X	X	
X : pas de séquençage			

Confirmation du ratio de surexpression THP-1/RAW 264.7 par PCR en temps réel : De façon à confirmer le ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 établi par DFI (tableau V), nous avons extrait l'ARN de Typhi durant l'infection de macrophages THP-1 et RAW 264.7 à 2 et 24 h post-infection pour évaluer l'expression des gènes *sty0154*, *sty0159*, *sty1361* et *sty3460* en PCR en temps réel dans ces deux lignées cellulaires. L'expression de chacun des gènes dans les macrophages THP-1 a été normalisée par rapport au gène *rpoD* pour ensuite être comparée à l'expression normalisée de ces mêmes gènes dans les macrophages RAW 264.7. Comme l'illustre la figure 21, chacun des 4 gènes sélectionnés présentait un ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 supérieur à 0 montrant ainsi une surexpression de chacun des gènes durant l'infection de macrophages THP-1 par rapport à leur expression dans les macrophages RAW 264.7. Le gène *sty3460* a montré le ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 le plus élevé par la technique DFI et il s'avère également le gène (parmi ceux testés) montrant les ratios d'expressions THP-1/RAW 264.7 à 2 et 24 h post-infection les plus élevés en PCR en temps réel. Le gène *sty1361* a présenté le plus bas ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 établi par DFI ce qui a également été confirmé par les réactions de PCR en temps réel. Les ratios d'expressions THP-1/RAW 264.7 évalués par DFI concordent avec ceux évalués avec la PCR en temps réel montrant que les gènes sélectionnés sont plus inductibles durant une infection de macrophages THP-1 que durant une infection de macrophages RAW 264.7.

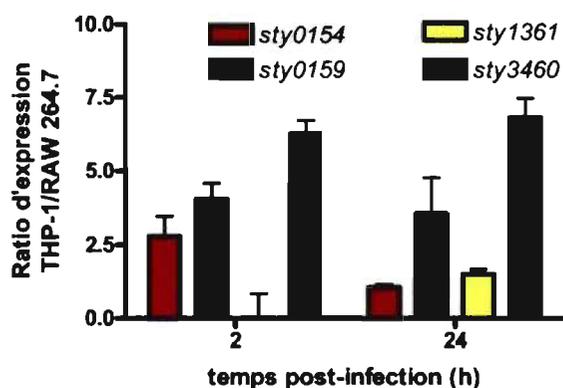
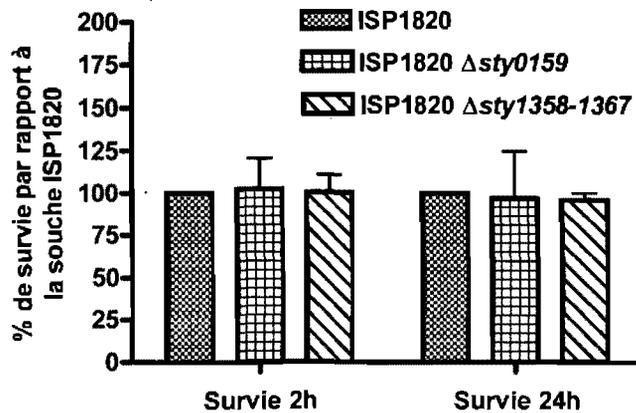


Figure 21 : Ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 évalué en PCR en temps réel des 4 gènes sélectionnés. L'expression normalisée des gènes *sty0154*, *sty0159*, *sty1361* et *sty3460* de Typhi dans les macrophages THP-1 a été comparée à l'expression normalisée de ces mêmes gènes dans les macrophages RAW 264.7. Le ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 a été calculé selon $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (267).

Caractérisation des gènes *sty0154*, *sty0159*, *sty1361* et *sty3460* durant une infection de macrophages : Sachant que les 4 gènes sélectionnés montrent une surexpression dans les macrophages THP-1 par rapport à leur expression dans les macrophages RAW 264.7 à 2 et 24 h, nous avons tenté de muter ceux-ci par échange allélique pour observer leur implication durant une infection de macrophages. Le gène *sty1361* est contenu dans une courte région unique à Typhi (*sty1358-1367*) contenant plusieurs gènes de fonctions inconnues. Nous avons donc décidé de muter toute cette région. Toutes les mutations ont été faites en regard de ne pas affecter le cadre de lecture rendant toutes les mutations non polaires. Suite à la mutation du gène *sty0159*, nous avons effectué des infections en parallèle dans des macrophages THP-1 et RAW 264.7 pour vérifier si sa surexpression dans les macrophages THP-1 était primordiale au niveau de la survie de Typhi dans ces mêmes macrophages. La souche mutante pour le gène *sty0159* a montré un taux de survie à 2 et 24 h post-infection semblable à la souche ISP1820 et cela, peu importe la lignée cellulaire testée (figure 22A-B). De la même façon, la souche mutante pour la région *sty1358-1367* a montré un taux de survie à 2 et 24 h similaire à la souche ISP1820 (figure 22A-B). Aucune souche mutante pour les gènes *sty0154* et *sty3460* n'a été obtenue par les techniques utilisées (voir discussion).

A. Infections de macrophages THP-1



B. Infections de macrophages RAW 264.7

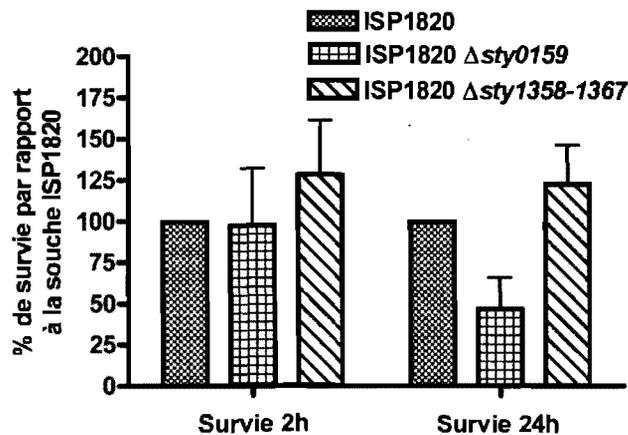


Figure 22 : Implication du gène *sty0159* et de la région *sty1358-1367* au niveau de la survie à 2 et 24 h de Typhi dans les macrophages. **A :** Taux de survie des souches ISP1820, ISP1820 Δ sty0159 et ISP1820 Δ sty1358-1367 par rapport à la souche ISP1820 à 2 et 24 h post-infection de macrophages THP-1. **B :** Taux de survie des mêmes souches par rapport à la souche ISP1820 à 2 et 24 h post-infection de macrophages RAW 264.7. Les taux de survie à 2 et 24 h ont été calculés en fonction de la UFC à temps 0 (UFC T2/UFC T0 et UFC T24/UFC T0) et le taux de survie par rapport à la souche ISP1820 a été calculé : % de survie d'une souche/ % de survie de la souche ISP1820. Les résultats de survie à 2 et 24 h sont les moyennes \pm les écarts types de deux différentes infections de macrophages THP-1 ou RAW 264.7

4.3. Discussion

Par la méthode DFI, nous avons identifié 11 gènes de Typhi surexprimés dans les macrophages THP-1 par rapport aux macrophages RAW 264.7. Nous avons tenté de caractériser trois de ces 11 gènes ainsi qu'un quatrième choisi dû à sa proximité avec le gène *sty0154* pour leur implication au niveau de la survie de Typhi dans les macrophages THP-1.

sty0154: Les LPS bactériens sont des éléments essentiels au maintien de l'intégrité membranaire des bactéries en agissant, entre autres, comme barrière contre des agents antibactériens (222, 228). Les LPS sont composés de trois parties : le lipide A, la partie saccharidique centrale et la partie hypervariable nommée l'antigène O. Le lipide A a pour fonction de lier le feuillet interne de la membrane externe à la partie saccharidique centrale et l'antigène O. Le lipide A est synthétisé par l'intermédiaire d'une série d'enzymes essentielles dont LpxC qui a déjà fait l'objet de cible pour plusieurs molécules antibactériennes (20, 153, 228, 246). Cette enzyme catalyse la réaction zinc-dépendante de déacétylation de la molécule UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine (307). Nous avons trié les clones 2DF3 et 24DE5 respectivement à 2 et 24 h post-infection, tous deux correspondant au gène *sty0154* de Typhi. La protéine encodée par le gène *sty0154* de Typhi montre une homologie quasi parfaite avec la protéine LpxC de *E. coli*. Due à sa fonction essentielle, nous n'avons pas été en mesure de muter ce gène par les techniques utilisées, ne pouvant donc pas vérifier son implication directe au niveau de la survie de Typhi dans les macrophages (246). Toutefois, sachant que LpxC est essentiel *in vitro*, il est fort probable que cette même enzyme le soit également lors de la multiplication de Typhi dans les SCV des macrophages THP-1. Dans cet ordre d'idée, Typhi a la capacité de se multiplier dans les SCVs des macrophages THP-1 comparativement aux SCV des macrophages RAW 264.7, ce qui peut expliquer le ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 d'environ 2 pour le gène *sty0154* (268). En effet, la multiplication de Typhi dans les SCV des macrophages THP-1 nécessite l'induction de *lpxC* permettant la synthèse du lipide A des LPS, une étape essentielle à la multiplication bactérienne (228, 268). Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer le ratio d'expression RAW 264.7/THP-1 de *lpxC* de Typhimurium. Une surexpression de *lpxC* de Typhimurium dans les macrophages RAW 264.7 par rapport aux macrophages THP-1 suggérerait indirectement l'implication de *lpxC* comme facteur relié à la spécificité d'hôte. Tels que mentionnés précédemment, les macrophages limitent l'accès des éléments essentiels aux phagosomes (et SCVs) (voir section 1.3.4). Ainsi, la surexpression de *lpxC* dans les macrophages THP-1 pourrait résulter d'un mécanisme

indirectement relié à la protéine LpxC de Typhi pour inhiber l'extrusion des ions Zn^{2+} des SCVs des macrophages THP-1. En effet, Jackman *et al.* ont observé que l'activité de LpxC était optimale lorsque cette dernière se trouvait en présence d'ions Zn^{2+} (154). Ces résultats pourraient suggérer que Typhi a la capacité de bloquer l'extrusion d'ions Zn^{2+} dans les macrophages THP-1 et non dans les macrophages RAW 264.7 favorisant du même coup la multiplication de Typhi dans les macrophages THP-1. De plus, Sachant que la mutation de *lpxC* entraînerait la modification de la membrane externe de la souche mutante, il aurait été intéressant de déterminer le taux d'adhérence de cette dernière puisqu'une mutation du gène *sty0154* aurait peut-être exposée d'autres protéines à la surface causant une augmentation de l'adhésion de la souche mutante. De cette façon, nous aurions pu identifier et caractériser de nouvelles protéines bactériennes impliquées dans l'adhésion cellulaire.

sty0159: Le gène *sty0159* a été caractérisé dû à sa proximité avec le gène *sty0154* sélectionné par DFI. Ce gène a, néanmoins, montré un ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 d'environ 3 avec la PCR en temps réel signifiant que ce gène est environ 3 fois plus induit durant une infection de macrophages THP-1 par rapport à son expression dans une infection de macrophages RAW 264.7 à 2 et 24 h post-infection. Toutefois, aucune atténuation n'a été observée lorsque le gène *sty0159* a été muté (figure 22A-B). La protéine encodée par le gène *sty0159* montre une homologie de séquence avec les membres de la famille de régulateurs transcriptionnels LysR. Ces régulateurs possèdent tous un domaine N-terminal qui forme une structure secondaire hélice-boucle-hélice permettant la liaison du régulateur à l'ADN (266). Ce domaine est excessivement bien conservé à travers cette famille de régulateurs (266). Ils possèdent également un domaine de reconnaissance pour une molécule inductrice (signal environnemental) (266). Contrairement à son domaine N-terminal, le domaine de reconnaissance est très peu conservé permettant aux différents régulateurs LysR de répondre à différents signaux (266). Finalement, le domaine C-terminal est important tant au niveau de la liaison du régulateur avec l'ADN qu'au niveau de la reconnaissance de la molécule inductrice (266). Ces régulateurs ont une fonction similaire aux SDC, soit de

répondre à un stimulus et orchestrer une réponse bactérienne face à ce stimulus. Les régulateurs OxyR et MetR des salmonelles sont des exemples de régulateurs LysR où OxyR répond à un environnement oxydant pour induire la réponse face aux stress oxydatifs, alors que MetR répond à la présence d'homocystéine et de méthionine pour s'autoréprimer et ainsi réprimer les gènes de biosynthèse de méthionine (52, 283). On retrouve le motif hélice-boucle-hélice bien conservé dans la partie N-terminale du gène *sty0159* confirmant sa place dans cette famille de régulateurs. L'absence de phénotype associé à la mutation du gène *sty0159* pourrait s'expliquer par la présence de protéines à fonction redondante dans le génome de Typhi.

sty1358-1367: Nous avons trié un troisième clone (2AB3) que nous avons décidé de caractériser pour son implication au niveau de la survie de Typhi dans les macrophages puisqu'il présentait un promoteur plus inductible dans les macrophages THP-1 que dans les macrophages RAW 264.7. Le clone 2AB3 a montré un ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 avec la technique DFI de 1.7 et d'environ 1.5 à 24 h post-infection avec la PCR en temps réel. Ce clone correspond au gène *sty1361*, soit un gène situé dans une région unique à Typhi. L'unicité de cette région codante de Typhi nous a poussé à la caractériser au complet. La région *sty1358-1367* contient neuf cadres de lecture différents et parmi ceux-ci, seulement quatre présentent une homologie avec d'autres gènes d'autres micro-organismes. Deux de ces quatre gènes sont similaires à des intégrases et sont situés aux extrémités de la région suggérant que ces deux séquences codantes ont permis l'insertion de cette région à cette position. En effet, on remarque que la région *sty1358-1367* montre un % GC plus élevé que les séquences codantes avoisinantes suggérant que cette région a été acquise horizontalement. La protéine encodée par le gène *sty1365* montre une homologie d'environ 70 % avec un gène de bactériophage. Toutefois, ce gène fait partie des 204 pseudogènes identifiés par Parkhill *et al.* lors du séquençage du génome de Typhi (232). De son côté, la protéine encodée par le gène *sty1362* présente une homologie de séquence avec la sous-unité catalytique de la toxine pertussique, mais ce gène est également caractérisé comme étant pseudogène. Au niveau de la virulence, la délétion de la

région *sty1358-1367* par échange allélique n'a montré aucune différence significative au niveau du taux de survie à 2 et 24 h post-infection malgré sa surexpression durant la phase intracellulaire de l'infection de macrophages THP-1. Cette région pourrait toutefois être impliquée dans d'autres étapes de l'établissement de la fièvre typhoïde telle que la persistance de Typhi.

sty3460 : Le clone 24AB3 trié 24 h post-infection, correspond au gène *sty3460*. Ce clone a présenté un ratio d'expression THP-1/RAW 264.7 supérieur à 15 par DFI (tableau V). La protéine encodée par ce gène présente un haut degré d'homologie avec les transporteurs d'acides aminés aromatiques chez *E. coli*, plus particulièrement avec le transporteur Mtr. Chez Typhimurium, 4 transporteurs d'acides aminés aromatiques ont été identifiés soit TyrP pour la tyrosine, PheP pour la phénylalanine, Mtr pour le tryptophane et AroP, un transporteur général pour ces trois acides aminés aromatiques (8, 9). Aucun mutant *mtr* n'a été obtenu malgré les différentes approches d'échange allélique utilisées. En effet, la méthode conventionnelle d'échange allélique nécessite l'utilisation d'un milieu LB-agar contenant les trois acides aminés aromatiques en concentration importante. Selon Heatwole et Somerville, la présence de tyrosine ou de phénylalanine induit l'expression de *mtr* ce qui pourrait expliquer l'absence de mutants par l'utilisation de la méthode d'échange allélique conventionnelle (141). Inversement, la présence de tryptophane réprime l'expression de *mtr* (141). Ainsi, nous avons modifié la technique d'échange allélique conventionnelle en inoculant les transconjugants de Typhi sur des géloses M9 additionnées de tryptophane à une concentration finale de 1 mM (141), d'arginine (22 µg/ml) et de cystéine (22 µg/ml). De la même façon qu'avec la méthode conventionnelle d'échange allélique, aucun mutant *mtr* n'a été obtenu utilisant cette approche. L'impossibilité de muter le gène *mtr* par les techniques utilisées suggère que *mtr* est un gène essentiel pour Typhi in vitro. Cependant, d'autres techniques de mutation, telle que l'utilisation d'un vecteur thermosensible codant pour le gène *mtr* dans la souche mutante, devront être tentées avant de conclure au caractère essentiel de ce gène in vitro. Malgré tout, il est possible de spéculer que ce gène pourrait être important au niveau de la survie de Typhi à l'intérieur des SCV des macrophages. En effet, Fields *et al.* ont montré

qu'une mutation dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques affectait de façon significative la survie de Typhimurium dans les macrophages murins suggérant l'essentialité des transporteurs de ces acides aminés au niveau de l'infection (97). Dans le même ordre d'idée, les macrophages se défendent des bactéries pathogènes en limitant l'accès d'éléments nutritifs aux SCV suite à la phagocytose (voir section 1.3.4). En montrant que le gène *mtr* de Typhi est nettement plus induit dans les macrophages THP-1 que dans les macrophages RAW 264.7 (tableau V et figure 21), il est possible que les SCV des macrophages soient dépourvues d'acides aminés aromatiques nécessitant ainsi l'induction des transporteurs pour optimiser l'acquisition de ceux-ci. De cette façon, les conditions intracellulaires rencontrées par Typhi dans les macrophages THP-1 sont peut-être différentes de celles retrouvées dans les macrophages RAW 264.7. De la même façon que pour le gène *sty0154*, il serait intéressant de comparer l'induction de *mtr* de Typhimurium dans les deux lignées cellulaires sachant que Typhimurium survit et se multiplie dans les macrophages murins, mais meurt dans les macrophages humains (268). Dans ce cas, nous ferions face à une réponse adaptative bactérienne contre un moyen de défense de l'hôte.

5. Chapitre II : Implication des gènes de SPI-1 durant la phase intracellulaire d'une infection de macrophages

5.1. Introduction

Depuis l'étude de Galan et Curtiss en 1989, les gènes de SPI-1 ont été principalement associés à la phase intestinale de l'infection des salmonelles (110). Plus récemment, plusieurs études tendent à montrer que les gènes de SPI-1 pourraient également être importants durant la phase intracellulaire d'une infection de macrophages (47, 73, 93, 121, 144, 182, 275). De plus, l'étude du transcriptome de Typhi dans les macrophages THP-1 a montré qu'environ 50% des gènes de SPI-1 étaient induits durant la phase intracellulaire (2, 8 et 24 h post-infection) par rapport à la condition RPMI (Annexe 3). Nous avons donc évalué l'implication des gènes de SPI-1 au niveau de la survie des salmonelles dans les macrophages THP-1 et RAW 264.7.

5.2. Résultats

Expression des gènes de SPI-1 par PCR en temps réel : Les données du transcriptome de Typhi par rapport à la condition contrôle RPMI ont été vérifiées par l'utilisation de la PCR en temps réel. Nous avons extrait l'ARN de Typhi à différents temps pré- et post-infection (conditions : surnageant, temps 0, 2, 8 et 24 h post-infection) pour comparer l'expression normalisée de cinq gènes de SPI-1 par rapport à l'expression normalisée de ces mêmes gènes dans la condition contrôle RPMI (voir section 2). Les gènes testés représentent respectivement le régulateur principal des gènes de SPI-1 (*hilA*), un gène de fonction inconnu (*iagB*), un gène codant pour une protéine de la base du SST3-1 (*invA*) et deux gènes codant pour des effecteurs du SST3-1 (*sipA* et *pipD*). Tels qu'on le remarque à la figure 23, tous les gènes de SPI-1 testés sont induits dans la condition surnageant. L'expression du régulateur *hilA*, des gènes *invA* et *sipA* chute légèrement au temps 0 alors que l'expression des gènes *iagB* et *pipD* restent induits confirmant la légère chute de

l'expression des gènes de SPI-1 observée dans l'étude transcriptomique de Typhi par rapport à la condition RPMI (figure 23 et Annexe 3). Durant la phase intracellulaire, tous les gènes testés sont induits à 2 h post-infection, 4 des 5 gènes de SPI-1 testés le sont également à 8 h post-infection. À 24 h post-infection, seuls les gènes *hilA* et *pipD* sont induits (figure 23). Les résultats observés avec la PCR en temps réel confirment les résultats obtenus avec l'étude transcriptomique de Typhi dans les macrophages THP-1 contre la condition RPMI montrant que certains gènes de SPI-1 sont induits durant la phase intracellulaire.

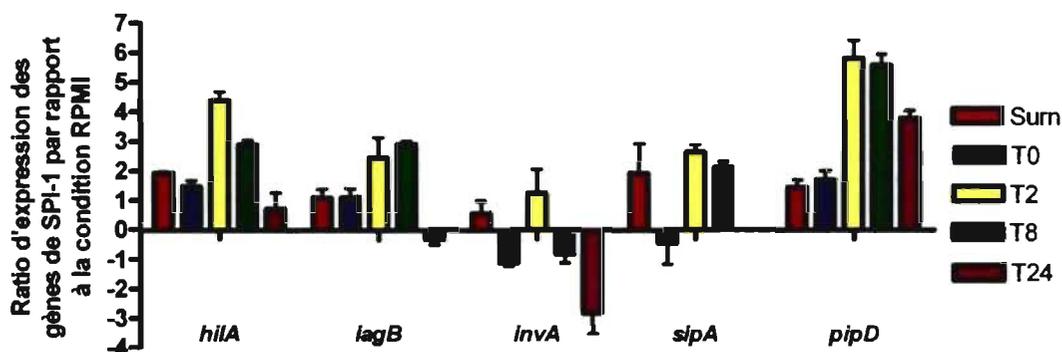


Figure 23 : Expression des gènes de SPI-1. Expression normalisée par rapport à l'*ARN16s* des gènes *hilA*, *iagB*, *invA*, *sipA* et *pipD* dans les conditions surnageant, temps 0, 2, 8 et 24 h post-infection de macrophages THP-1 par rapport à l'expression normalisée de ces mêmes gènes dans la condition RPMI. Le ratio d'expression a été calculé selon $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (267).

Mutation des gènes de SPI-1 chez Typhi et Typhimurium : Sachant que les gènes de SPI-1 sont induits durant la phase intracellulaire d'une infection de macrophages, nous voulions caractériser l'implication de ceux-ci au niveau de la survie des salmonelles dans les macrophages. Tout d'abord, nous avons muté par échange allélique le gène *invA* de SPI-1 chez la souche ISP1820 de Typhi et la SL1344 de Typhimurium. Nous avons muté le gène *invA*, sachant que ce dernier affecte considérablement l'invasion des cellules non phagocytaires (110). De plus, ces mutations ont été faites sans regard sur le cadre de lecture affectant du même coup la transcription des gènes situés en aval du gène *invA* empêchant ainsi la

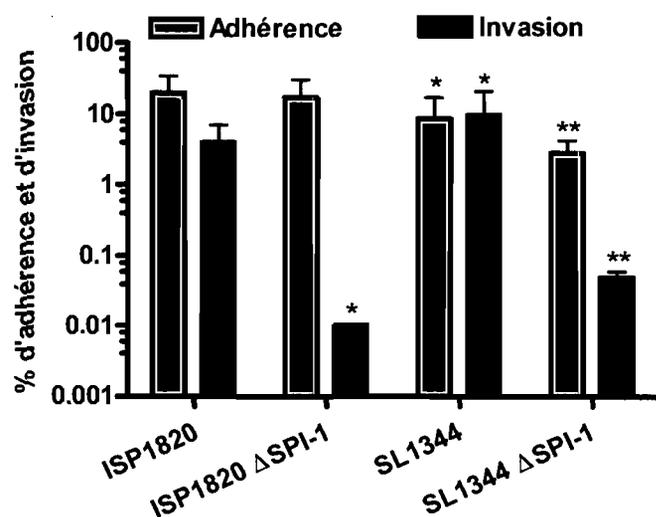


Figure 24 : Mutation des gènes de SPI-1 chez Typhi et Typhimurium. Taux d'adhérence et d'invasion des souches ISP1820, ISP1820 ΔSPI-1, SL1344 et SL1344 ΔSPI-1 suite à une infection de cellules épithéliales HeLa. Les pourcentages d'adhérence (UFC T90) et d'invasion (UFC T180) ont été calculés en fonction de la UFC initiale. Ces pourcentages résultent de la moyenne ± écart type de 10 infections de cellules HeLa. Les simples (*) et doubles astérisques (**) correspondent respectivement aux valeurs significatives par rapport à la souche ISP1820 et SL1344 pour $p < 0.05$.

On remarque également une diminution significative d'environ 75 % du taux d'adhérence pour la souche mutante de Typhimurium comparativement à la souche SL1344, ce qui n'avait jamais été préalablement associé aux gènes de SPI-1 (figure 25). De plus, nous avons observé des différences significatives entre les deux souches sauvages (ISP1820 et SL1344) tant au niveau du taux d'adhérence que du taux d'invasion (figure 25). La souche ISP1820 adhère plus efficacement (170 % plus d'adhérence) que la souche SL1344 aux cellules HeLa, mais cette dernière s'avère plus efficace pour envahir ces cellules (243 % plus d'invasion). Bref, les deux souches mutantes pour les gènes de SPI-1 ont montré le phénotype attendu soit une diminution importante du taux d'invasion.

production à la surface des salmonelles d'un SST3-1 fonctionnel. Pour confirmer la mutation des gènes de SPI-1, nous avons infecté les cellules épithéliales humaines HeLa et déterminé le taux d'invasion des souches ISP1820, SL1344 et leur souche mutante respective pour les gènes de SPI-1. Telles qu'illustrées à la figure 24, les souches mutantes pour les gènes de SPI-1 de Typhi et de Typhimurium montrent respectivement une diminution significative du taux d'invasion d'environ 400 % et d'environ 200 % comparativement à leur

Effet d'une mutation de SPI-1 durant l'infection de macrophages THP-1 : Ayant confirmé le phénotype de la mutation des gènes de SPI-1 chez les souches ISP1820 et SL1344, nous avons infecté des macrophages THP-1 dans le but de caractériser l'implication des gènes de SPI-1 au niveau de la survie intracellulaire des salmonelles. Plusieurs conclusions importantes ont pu être tirées de ces 14 infections indépendantes effectuées dans les macrophages THP-1. Tout d'abord, au niveau du taux de phagocytose, aucune différence n'a pu être observée entre les souches mutantes et leur souche parentale respective (figure 25A). On remarque toutefois que le taux de phagocytose des deux souches de Typhimurium (SL1344 et sa souche mutante pour les gènes de SPI-1) est environ 2 fois plus élevé ($p < 0.05$) que pour les deux souches de Typhi (ISP1820 et sa souche mutante pour les gènes de SPI-1) (figure 25A). Au niveau du taux de survie, les souches mutantes pour les gènes de SPI-1 présentent un taux de survie à 24 h post-infection significativement plus élevé que leur souche parentale (figure 25B). En effet, la souche mutante de Typhi présente une augmentation du taux de survie d'environ 157% comparativement à la souche ISP1820, alors que la souche mutante de Typhimurium montre une augmentation du taux de survie à 24 h d'environ 179% comparativement à sa souche parentale SL1344 (figure 25B). Tels qu'attendus, les résultats de cytotoxicité confirment les résultats déjà établis relatant l'incapacité de Typhi (mutant ou non pour les gènes de SPI-1) d'induire la mort cellulaire des macrophages ainsi que l'implication des gènes de SPI-1 dans la mort cellulaire causée par Typhimurium (figure 25C) (49, 268). Pour confirmer les résultats d'hyper-phagocytose de Typhimurium comparativement à Typhi avec les macrophages THP-1 (figure 25A), nous avons infecté ces mêmes macrophages avec trois souches bactériennes causant théoriquement une fièvre typhoïde chez l'homme : ISP1820, Ty2 et Paratyphi A, trois isolats de Typhimurium: SL1344, LT2 et 14028 et quatre sérovars de *Salmonella enterica* ne causant pas de fièvre typhoïde chez l'homme : Arizonae, Choleraesuis, Dublin et Gallinarum. Les trois souches causant une fièvre typhoïde chez l'homme ont tous montré un taux de phagocytose inférieur aux sept autres souches testées (figure 26A). Au niveau du taux de survie, les trois souches bactériennes causant une fièvre typhoïde sont

nettement plus aptes à survivre une infection de macrophages THP-1 comparativement aux autres souches bactériennes testées (figure 26B).

Les résultats présentés à la figure 25B montrent que les gènes de SPI-1 nuisent à la survie des salmonelles dans les macrophages THP-1. Ces résultats d'infections nous ont également montré un phénotype inattendu, soit que les souches bactériennes causant une fièvre typhoïde chez l'homme (ISP1820, Ty2 et Paratyphi A) sont moins phagocytées et survivent mieux que les autres sérovars de *Salmonella enterica* dans les macrophages THP-1 (figure 26A-B).

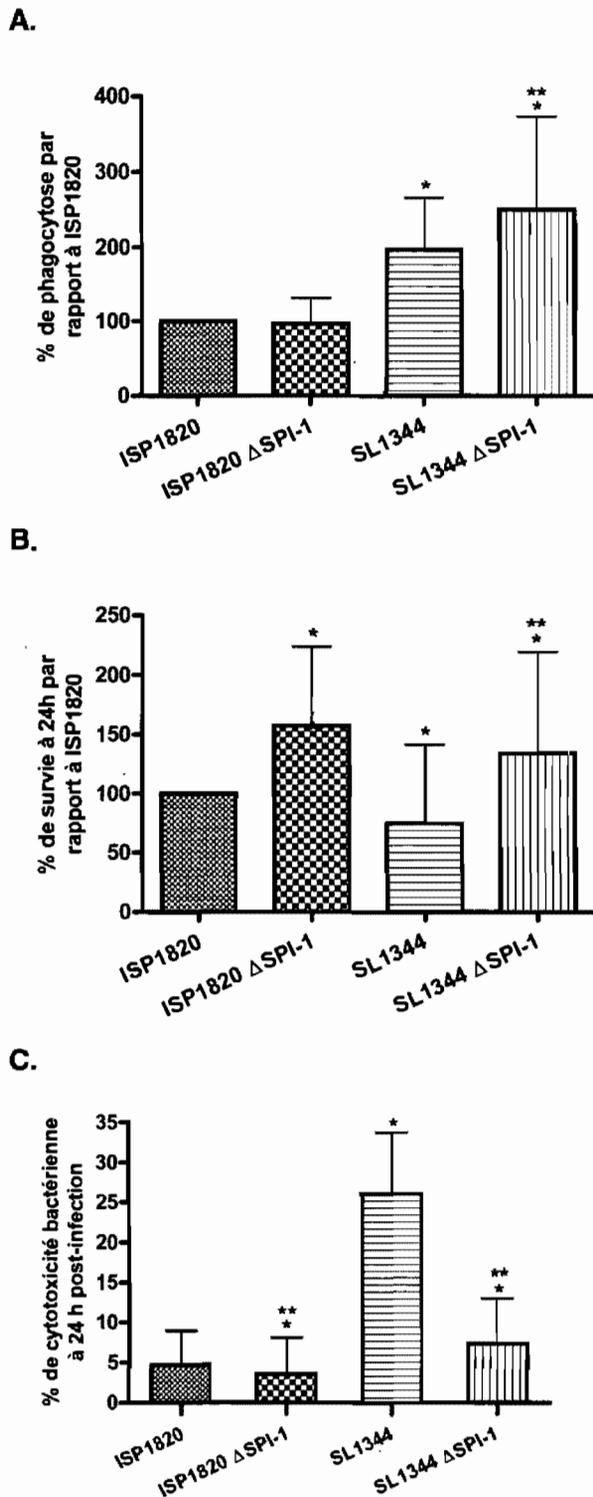


Figure 25 : Effet de la mutation des gènes de SPI-1 lors d'une infection de macrophages THP-1. **A :** Taux de phagocytose par rapport à ISP1820 des souches ISP1820, ISP1820 Δ SPI-1, SL1344 et SL1344 Δ SPI-1 lors d'une infection de macrophages THP-1. Le pourcentage de phagocytose a été calculé en fonction de la UFC initiale (UFC T0/UFC initiale) alors que pourcentage de phagocytose par rapport à la souche ISP1820 a été calculé : % de phagocytose des différentes souches/ % de phagocytose de ISP1820. **B :** Taux de survie à 24 h post-infection par rapport à ISP1820 de ces mêmes souches suite à une infection de macrophages THP-1. Les taux de survie à 24 h ont été calculés en fonction du taux de phagocytose (UFC T24/UFC T0) alors que les taux de survie par rapport à la souche ISP1820 ont été calculés : % de survie à 24 h des différentes souches / % de survie à 24 h de ISP1820. Les taux de phagocytose et de survie à 24 h résultent de la moyenne \pm l'écart type de 14 infections indépendantes de macrophages THP-1. **C :** Taux de cytotoxicité à 24 h post-infection des souches ISP1820, ISP1820 Δ SPI-1, SL1344 et SL1344 Δ SPI-1. Le taux de cytotoxicité associé aux salmonelles est calculé par rapport à la lyse maximale et minimale des macrophages THP-1 lors des infections (voir matériel et méthodes). Le taux de cytotoxicité de chacune des souches résulte de la moyenne \pm l'écart type de cinq infections de macrophages THP-1 indépendantes. Les simples (*) et doubles (**) astérisques correspondent respectivement aux valeurs significatives par rapport à la souche ISP1820 et SL1344 pour $p < 0.05$.

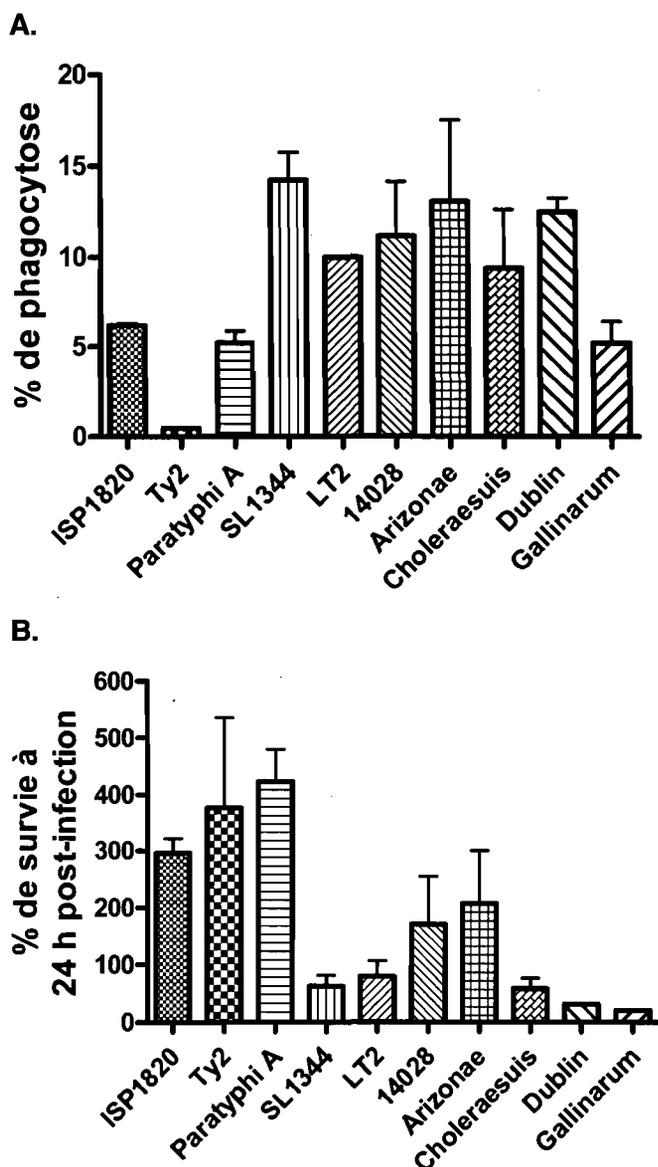


Figure 26 : Infection de macrophages THP-1 avec différents sérovars de *Salmonella enterica*. **A :** Taux de phagocytose des souches de Typhi ISP1820, Ty2, Paratyphi A, de Typhimurium : SL1344, LT2, 14028 et des sérovars Arizonae, Choleraesuis, Dublin et Gallinarum. Le taux de phagocytose a été calculé en fonction de la UFC initiale (UFC T0/UFC initiale). **B :** Taux de survie à 24 h post-infection de ces mêmes souches suite à l'infection de macrophages THP-1. Le taux de survie a été calculé en fonction du taux de phagocytose (UFC T24/UFC T0). Les taux de phagocytose et de survie à 24 h post-infection représentent la moyenne ± l'écart d'un duplicata technique.

Effet d'une mutation de SPI-1 durant l'infection de macrophages RAW 264.7 :

Pour s'assurer que les phénotypes observés dans les macrophages THP-1 n'étaient pas seulement reliés à l'hôte, nous avons infecté des macrophages murins : RAW 264.7. Similaire aux infections avec les macrophages THP-1, aucune différence significative entre les souches mutantes pour les gènes de SPI-1 et leur souche parentale respective n'a été notée au niveau du taux de phagocytose (figure 27A). Toutefois, le phénotype d'hyper-phagocytose de Typhimurium par

rapport à Typhi observé avec lors d'infections de macrophages THP-1 est inversé dans les macrophages RAW 264.7. En effet, les deux souches de Typhi sont significativement plus phagocytées (environ 200%) que les deux souches de Typhimurium (figure 27A). De la même façon qu'avec les macrophages THP-1, nous avons noté une augmentation significative du taux de survie à 24 h représentant 169% pour la souche mutante de Typhi et 148% pour la souche mutante de Typhimurium comparativement à leur souche parentale respective (figure 27B). Encore une fois, les résultats de cytotoxicité montrent que SL1344 possède la capacité d'induire la mort cellulaire des macrophages RAW 264.7, mais que cette aptitude dépend largement de la présence d'un SST3-1 fonctionnel (figure 27C) (49, 268). Tel qu'attendu, Typhi, qu'il soit sauvage ou mutant pour les gènes de SPI-1, n'a pas induit la mort cellulaire chez les macrophages RAW 264.7 (figure 27C) (268).

Bref, les résultats d'infection de macrophages RAW 264.7 montrent que les deux souches mutantes sont également plus aptes à survivre durant une infection de macrophages RAW 264.7 que leur souche parentale. Ces infections de macrophages RAW 264.7 ont également montré le phénotype d'hyper-phagocytose des souches de Typhi par rapport aux souches de Typhimurium.

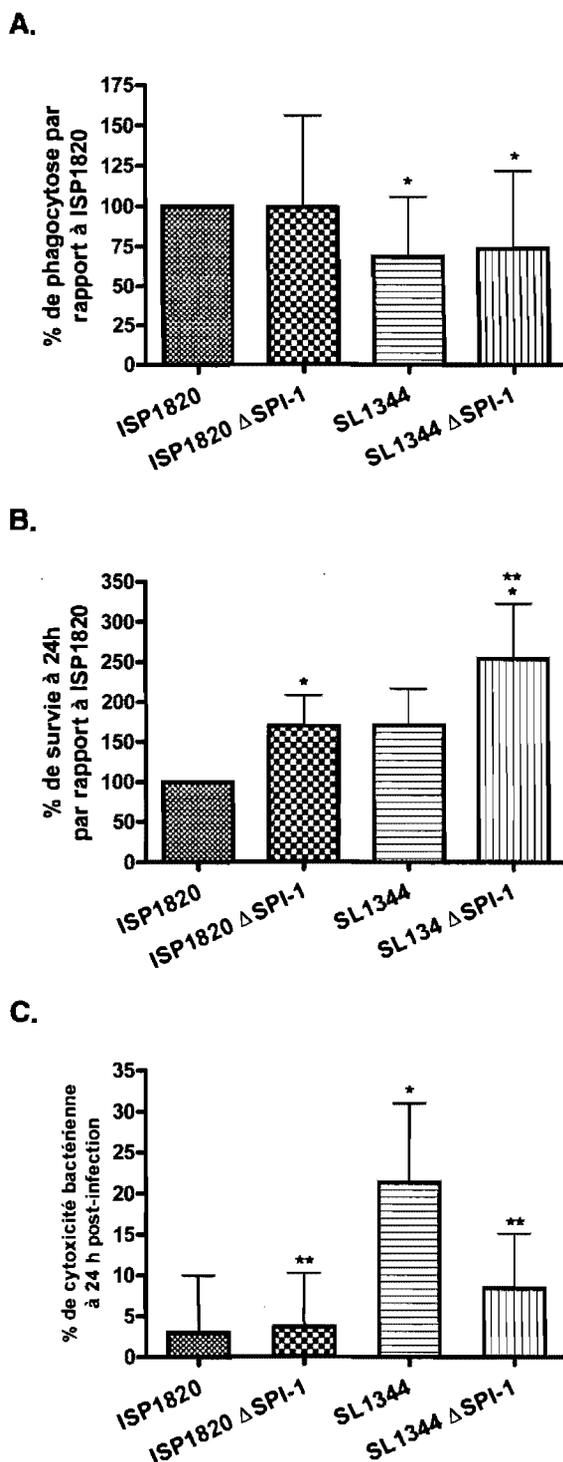


Figure 27 : Effet de la mutation des gènes de SPI-1 lors d'une infection de macrophages RAW 264.7. **A :** Taux de phagocytose par rapport à ISP1820 des souches ISP1820, ISP1820 Δ SPI-1, SL1344 et SL1344 Δ SPI-1 lors d'une infection de macrophages RAW 264.7. Le pourcentage de phagocytose a été calculé en fonction de la UFC initiale (UFC T0/ UFC initiale) alors que le pourcentage de phagocytose par rapport à ISP1820 a été calculé : % de phagocytose des différentes souches/ % de phagocytose de ISP1820. **B :** Taux de survie à 24 h post-infection par rapport à ISP1820 de ces mêmes souches suite à une infection de macrophages RAW 264.7. Les taux de survie à 24 h post-infection ont été calculés en fonction de la UFC initiale (UFC T24/ UFC initiale) alors que le pourcentage de survie à 24 h post-infection par rapport à ISP1820 a été calculé : % de survie à 24 h des différentes souches/ % de survie de ISP1820. Les taux de phagocytose et de survie à 24 h résultent de la moyenne \pm l'écart type de 9 infections indépendantes de macrophages RAW 264.7. **C :** Taux de cytotoxicité associé aux salmonelles ISP1820, ISP1820 Δ SPI-1, SL1344 et SL1344 Δ SPI-1 à 24 h post-infection de macrophages RAW 264.7. Le taux de cytotoxicité associé aux bactéries est calculé par rapport à la lyse maximale et minimale des macrophages THP-1 lors des infections de macrophages (voir matériel et méthodes). Le taux de cytotoxicité bactérien de chacune des souches résulte de la moyenne \pm l'écart type de 6 infections indépendantes de macrophages RAW 264.7. Les simples (*) et les doubles (**) astérisques correspondent respectivement aux valeurs significatives par rapport à la souche ISP1820 et SL1344 pour $p < 0.05$.

Expression des gènes de SPI-2 chez les souches SPI-1 mutantes : Sachant que les souches mutantes pour les gènes de SPI-1 sont plus aptes à survivre durant la phase intracellulaire d'une infection de macrophages que leur souche parentale, nous avons émis l'hypothèse que cette survie accrue des souches mutantes résultait d'une surexpression des gènes de SPI-2 comparativement à leur souche parentale. Nous avons comparé l'expression normalisée (par rapport à l'*ARN16s*) de 4 gènes de SPI-2 : *ssrB*, *ssaR*, *sseB* et *spiC* de la souche mutante de Typhi par rapport à leur expression chez la souche ISP1820 à 2 et 8 h post-infection de macrophages THP-1. De cette façon, nous étions en mesure d'établir un ratio d'expression normalisé entre l'expression des gènes de SPI-2 de la souche mutante et de sa souche parentale ISP1820. Les gènes de SPI-2 ont été choisis puisqu'ils représentent différentes classes de gènes de cet îlot de pathogénicité, *ssrB* représentant le régulateur, *ssaR* et *sseB* représentant respectivement des gènes codant pour des protéines de la base et du translocon et *spiC* codant pour un effecteur du SST3-2. À l'exception du gène *sseB*, les gènes *ssrB*, *ssaR* et *spiC* ont tous montré une surexpression dans la souche ISP1820 par rapport à la souche mutante à 2 h post-infection (figure 28). Toutefois, au temps 8 h post-infection, l'expression des quatre gènes de SPI-2 testée était similaire dans les deux souches (figure 28).

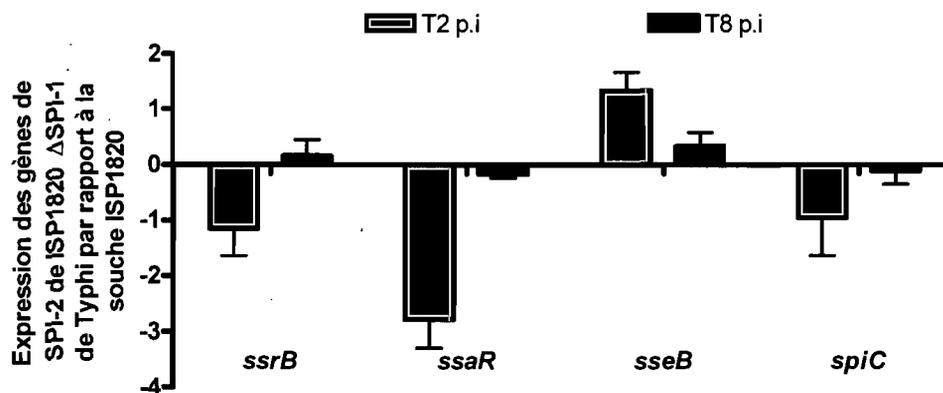


Figure 28 : Expression des gènes de SPI-2. L'expression normalisée des gènes *ssrB*, *ssaR*, *sseB* et *spiC* de la souche ISP1820 Δ SPI-1 a été comparée à l'expression normalisée de ces mêmes gènes chez la souche sauvage ISP1820 à 2 et 8 h post-infection de macrophages THP-1. La normalisation de l'expression des gènes a été faite par rapport à l'*ARN16s*. Le ratio d'expression de chacun des gènes a été calculé selon $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (267).

5.3. Discussion

En 2006, Faucher *et al.* publiaient le transcriptome de Typhi dans les macrophages THP-1 en utilisant l'expression des gènes de Typhi cultivés dans le surnageant comme contrôle. Ceux-ci ont montré qu'environ 30% des gènes de SPI-1 étaient réprimés à tous les temps post-infection (93) (Annexe 3). Toutefois, les mêmes résultats du transcriptome comparés à l'expression des gènes de Typhi cultivés dans du RPMI (milieu de culture des macrophages sans la présence de ceux-ci) comme contrôle ont montré que près de 50 % des gènes de SPI-1 étaient induits durant la phase intracellulaire de l'infection (Annexe 3). Pour vérifier cette affirmation, nous avons testé en PCR en temps réel, l'expression de 5 gènes de SPI-1 contre la condition RPMI. Avec les résultats de la figure 23, nous pouvons conclure que certains gènes de SPI-1 sont bels et bien induits dans le surnageant, ainsi que durant une partie de la phase intracellulaire tel qu'observé dans le transcriptome par rapport au RPMI (Annexe 3). Il était possible de supposer que l'induction des gènes de SPI-1 durant la phase intracellulaire aurait un effet sur la survie des salmonelles lors d'une infection de macrophages.

Nous avons muté les gènes de SPI-1 des souches sauvages ISP1820 de Typhi et SL1344 de Typhimurium. Le phénotype hypo-invasif des souches mutantes pour le SST3-1 a été confirmé par des infections de cellules épithéliales HeLa (figure 24). Outre ce phénotype attendu, nous avons observé des différences significatives entre les souches ISP1820 et SL1344 tant au niveau de l'adhésion qu'au niveau de l'invasion des cellules HeLa (figure 24). L'adhérence accrue observée avec la souche ISP1820 sur les cellules épithéliales HeLa comparativement à la souche SL1344 amène un nouveau facteur important pour comprendre la spécificité d'hôte unique de Typhi pour l'homme. En effet, Typhi a dû, au cours de l'évolution, optimiser son étape d'adhésion sur les cellules de la barrière intestinale humaine sans quoi celle-ci aurait été excrétée sans se multiplier et causer d'infection systémique limitant ainsi sa survie. Typhi possède une série de fimbriae qui lui sont uniques et deux d'entre eux ont été montrés pour favoriser l'adhésion de Typhi aux cellules épithéliales humaines pouvant ainsi expliquer

l'adhésion accrue de Typhi comparativement à Typhimurium (101, 281, 312). Inversement, nous avons noté que SL1344 envahit plus « efficacement » les cellules épithéliales que la souche ISP1820 (figure 24). Nos résultats d'hyperinvasion de Typhimurium sont corroborés par l'étude de Mills et Finlay qui ont également observé que Typhimurium est plus apte à envahir les cellules épithéliales humaines (table 1 (214)). Au niveau d'une infection par des salmonelles, il est possible de croire que Typhi adhère efficacement aux cellules de l'hôte, mais limite son entrée dans les cellules épithéliales diminuant le stress causé et le potentiel inflammatoire de cette infection. De cette façon, l'entrée dans les cellules reste subtile ne causant pas de réaction inflammatoire intense telle qu'observée lors d'infections par Typhimurium. Finalement, les tests d'adhérence nous ont permis d'observer une diminution d'adhérence d'environ 75 % chez la souche mutante de Typhimurium comparativement à sa souche parentale SL1344. Ces résultats s'avèrent assez surprenants, puisque nous n'avons pas observé cette même diminution chez la souche mutante de Typhi. De plus, les gènes de SPI-1 n'avaient jamais été associés à l'adhérence des salmonelles. Ces différences pourraient amener un nouvel élément différentiel au niveau de la régulation des gènes de SPI-1 entre Typhi et Typhimurium. Somme toute, les résultats des tests d'invasion montrent que les deux souches mutantes sont belles et bien mutantes pour le SST3-1.

Ayant les souches mutantes pour les gènes de SPI-1 de Typhi et Typhimurium, nous avons déterminé l'implication de ces gènes au niveau de la survie des salmonelles dans les macrophages. Jusqu'à tout récemment, les gènes codant pour le SST3-1 ont été caractérisés comme des gènes principalement associés à l'invasion des cellules non phagocytaires (110, 125, 186). En effet, aucun phénotype apparent n'a été discerné lors d'infection intrapéritonéale (court-circuite la phase intestinale où les gènes de SPI-1 sont essentiels) de souris avec des mutants des gènes de SPI-1 (110). Galan et Curtiss ont observé la même dose létale 50% (DL50) pour les souches de Typhimurium sauvages et leur souche isogénique mutante pour le SST3-1 suggérant l'absence d'implication des gènes de SPI-1 au niveau de la survie de Typhimurium dans les souris (110). Inversement,

nos résultats montrent une augmentation significative de la survie à 24 h post-infection des salmonelles mutantes pour leur SST3-1 suite à une infection de macrophages THP-1 et RAW 264.7 en culture (figures 25B et 27B). Cette différence pourrait s'expliquer de deux façons. Évidemment, il serait possible de spéculer que les résultats obtenus en culture cellulaire ne représentent pas intégralement le modèle *in vivo* d'une infection de Typhimurium chez la souris. Toutefois, le modèle de macrophages en culture est largement répandu et ce dernier a fait ces preuves confirmant des phénotypes attendus tels que l'implication des gènes de SPI-2 au niveau de la survie des salmonelles dans ces cellules (28, 144, 159, 238, 286). La seconde hypothèse expliquant la différence entre nos résultats et ceux obtenus par Galan et Curtiss en 1989 vient du fait que seulement 20 Typhimurium sauvages ou mutantes pour les gènes de SPI-1 sont nécessaires pour tuer 50 % des souris infectées intrapéritonéalement. De ce fait, une différence de seulement 3 ou 4 Typhimurium aurait confirmé nos résultats soit une différence qu'ils n'ont peut-être pas pris en compte. Récemment, Gerlach *et al.* ont étudié l'implication des gènes de SPI-4 de Typhimurium durant l'infection de macrophages RAW 264.7. Pour observer si SPI-4 était impliqué dans les étapes d'invasion des cellules non phagocytaires ou de survie dans les macrophages RAW 264.7, ceux-ci ont utilisé un mutant SPI-1 de Typhimurium par insertion dans le gène *invC* comme contrôle négatif d'invasion (119). Ils ont également utilisé cette souche durant l'infection de macrophages RAW 264.7 et ont observé une augmentation significative du taux de survie de la souche mutante pour les gènes de SPI-1 à 16 h post-infection du même ordre que nos résultats confirmant, du même coup, ceux-ci (figure S1 (119)).

Sachant que les gènes de SPI-2 ont été caractérisés comme des gènes essentiels à la survie des salmonelles dans les macrophages (144), nous avons regardé l'expression de ces gènes de survie chez la souche ISP1820 et sa souche isogénique mutante pour SPI-1. Selon notre hypothèse, les gènes de SPI-1 pourraient être impliqués dans la régulation négative des gènes de survie des salmonelles (SPI-2). Cette régulation par les gènes de SPI-1 pourrait permettre aux salmonelles d'exprimer leurs gènes de survie seulement durant la phase

intracellulaire. Nos résultats d'expression montrent toutefois que la mutation SPI-1 ne cause pas de surexpression des gènes de SPI-2 tel que nous le pensions chez la souche mutante de Typhi (figure 28). Notre hypothèse est peut-être toujours valable puisqu'il est possible que la régulation des gènes de SPI-2 par les gènes de SPI-1 se produise avant les temps intracellulaires que nous avons testés (2 et 8 h post-infection). Si les gènes de SPI-1 régulent négativement les gènes de SPI-2 telle que notre hypothèse le propose, très tôt suite à la phagocytose, la mutation des gènes de SPI-1 pourrait engendrer une induction précoce (avant la phase intracellulaire) des gènes de SPI-2 chez le mutant comparativement à la souche sauvage préparant l'étape de survie de la souche mutante plus efficacement et plus rapidement. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions comparer l'expression normalisée des gènes de SPI-2 directement dans la condition surnageant et au temps 0 de la souche mutante de Typhi à l'expression normalisée de ces mêmes gènes chez la souche sauvage comme il a été fait à la figure 28. Ainsi, une surexpression des gènes de SPI-2 chez la souche mutante au début de l'infection suggérerait que les salmonelles ont optimisé leur étape d'invasion des macrophages en utilisant leur SST3-1, réprimant du même coup les gènes de survie jusqu'à ce que les salmonelles se retrouvent dans la phase intracellulaire.

Plusieurs phénotypes permettent de différencier Typhi de Typhimurium au niveau de l'infection de macrophages. Tout d'abord, Schwan *et al.* ont montré que Typhi survit et se multiplie dans les macrophages humains, alors que Typhimurium ne survit pas dans ces mêmes macrophages (268). À l'opposé, Typhimurium survit et se multiplie dans les macrophages murins, alors que Typhi n'est pas capable (268). Dans cette même étude, Schwan *et al.* ont mis en évidence l'aptitude de Typhimurium à induire la mort cellulaire des macrophages humains et murins comparativement à Typhi (268). Nos résultats d'infections de macrophages THP-1 concordent avec ceux de Schwan *et al.* au niveau de la survie accrue de Typhi comparativement à Typhimurium (figure 25B et 26). De plus, nous avons observé de la cytotoxicité seulement lors d'infections avec Typhimurium (figure 25C) (268). Dans le même sens, nos infections de macrophages RAW 264.7 montrent les phénotypes attendus entre les souches ISP1820 et SL1344 au niveau de la survie

ainsi qu'au niveau de leur potentiel cytotoxique (figures 27B -C). Outre l'obtention des résultats attendus entre Typhi et Typhimurium, nous avons observé ce qui semble être un nouvel élément important à la spécificité d'hôte des salmonelles. Chez les macrophages THP-1, les deux souches de Typhi testées : ISP1820 et sa souche mutante pour les gènes de SPI-1 ont été moins phagocytées que les deux souches de Typhimurium (SL1344 et sa souche mutante pour les gènes de SPI-1) (figure 25A). Le phénotype inverse a été observé dans les macrophages RAW 264.7 où les souches de Typhi (ISP1820 et sa souche mutante pour les gènes de SPI-1) ont été plus phagocytées que les deux souches de Typhimurium (SL1344 et sa souche mutante pour les gènes de SPI-1) (figure 27A). Ce nouveau point tend à montrer que Typhi est probablement moins reconnu par les macrophages humains que l'est Typhimurium, alors que l'inverse serait également vrai, c'est-à-dire que Typhi est plus reconnu par le système immunitaire inné des souris. Il est fort probable que chacun des sérovars de *Salmonella enterica* ait évolué spécifiquement pour réduire l'expression à la surface de protéines fortement reconnues par les macrophages de leur hôte respectif. De cette façon, Typhi étant moins phagocyté a optimisé sa survie intracellulaire étant capable de survivre efficacement à l'étape intracellulaire des macrophages humains favorisant sa dissémination systémique contrairement à Typhimurium. Dans ce sens, nous avons évalué le taux de phagocytose et de survie de trois souches bactériennes de *Salmonella enterica* causant théoriquement une fièvre typhoïde chez l'homme par rapport à cinq autres sérovars de *Salmonella enterica*. Les résultats supportent l'hypothèse de spécificité d'hôte où le séovar adapté à son hôte sera moins phagocyté. Toutefois, des tests complémentaires doivent être réalisés pour confirmer cette hypothèse. Parmi ceux-ci, des infections de d'autres lignées cellulaires de macrophages humains et murins devront être effectuées. Nous avons également testé quatre autres sérovars : Arizonae, Choleraesuis, Dublin et Gallinarum qui sont tous des sérovars à spectre d'hôte unique ou adapté à un hôte en particulier (voir section 1.1.2). Il serait intéressant d'infecter des macrophages issus de reptiles, de ruminants, de porc et de volailles pour vérifier le concept de spécificité d'hôte tel qu'observé durant notre étude.

6. Discussion

6.1. Caractérisation des clones obtenus par « Differential fluorescence induction »

Selon les données de l'organisation mondiale de la santé de 2004, 21 millions de personnes sont infectées par Typhi à travers le monde annuellement et plus de 200 000 succomberont de cette infection, conférant à Typhi le titre de problème mondial important (61). Malgré l'importance mondiale de cette maladie, l'efficacité des vaccins disponibles s'avère toujours insatisfaisante. Par conséquent, l'étude de Typhi est primordiale pour mieux comprendre son cycle d'infection de façon à cerner de nouvelles cibles thérapeutiques. Telle que mentionné précédemment, l'étude de Typhi est compliquée par l'absence d'un bon modèle animal. Les notions sur les gènes de virulence de Typhi ont principalement été extrapolées d'études réalisées avec le modèle de typhoïde murine utilisant *Typhimurium* comme bactérie pathogène. Les études de IVET et STM ont permis d'identifier une vingtaine de gènes importants durant l'infection de macrophages par des salmonelles, dont les gènes de l'opéron *rfb* qui ont été identifiés par les deux méthodes (144, 197). Ces études ont mené à l'acquisition de nouvelles connaissances au niveau des gènes impliqués dans la virulence des salmonelles durant l'infection. Par contre, d'autres études globales sont nécessaires pour compléter les études déjà réalisées. Nous avons utilisé la technique DFI et la PCR en temps réel par lesquelles nous avons identifié 11 gènes présentant une surexpression dans les macrophages humains THP-1 par rapport à leur expression dans les macrophages murins RAW 264.7. Parmi ces 11 gènes, nous en avons caractérisé deux pour leur implication au niveau de la survie de Typhi dans les macrophages. Les mutants ISP1820 Δ *sty0159* et ISP1820 Δ *sty1358-1367* n'ont montré aucune atténuation au niveau de la survie de Typhi tant dans les macrophages THP-1 que RAW 264.7. Néanmoins, ces gènes pourraient être impliqués dans d'autres étapes du cycle d'infection de Typhi, telle que la persistance de ce dernier avant de retourner dans la lumière intestinale. Sachant

que Typhimurium possède également le gène *sty0159*, nous aurions pu utiliser le modèle de typhoïde murine pour étudier l'implication du gène *sty0159* au niveau de la persistance tel que l'on fait Lawley *et al.* (182). Par contre, la région *sty1358-1367* étant absente du génome de Typhimurium, nous aurions dû infecter directement des primates soit le modèle le plus représentatif connu jusqu'à présent pour étudier l'interaction entre Typhi et l'homme.

La technique DFI telle que nous l'avons utilisée, comporte certains désavantages pouvant expliquer pourquoi plusieurs des clones testés après les étapes de tri cellulaire n'ont pas montré un pourcentage de fluorescence élevé dans les macrophages THP-1 ou un ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 élevé (Annexe 1 et 2). Pour y remédier, quelques optimisations auraient pu être apportées. Telle que nous l'avons utilisée, la technique DFI est basée sur la sélection de clones de Typhi exprimant la protéine GFP à l'intérieur des macrophages THP-1 ou RAW 264.7. Ces deux lignées de macrophages présentent une autofluorescence verte qui a certainement nui au processus de tri cellulaire (43). Pour diminuer cet effet d'autofluorescence verte des macrophages, nous aurions pu exprimer constitutivement une seconde protéine fluorescente, soit la protéine DsRed sur le même vecteur que la GFP. L'expression constitutive de DsRed dans les clones de Typhi aurait permis de trier les macrophages à l'aide de deux fluorescences plutôt qu'une seule, distinguant ainsi les macrophages contenant des clones de Typhi rouges et verts fluorescents (promoteur inductible *in vivo* en amont du gène codant pour la GFP et l'expression constitutive de la DsRed) des macrophages autofluorescents verts.

Dans un deuxième temps, l'absence d'enrichissement observée pour la banque de promoteurs triée 24 h post-infection peut résulter de la perte du vecteur due à sa trop grande toxicité. En effet, Knodler *et al.* ont démontré que la GFP_{mut3} et la RFP nuisent à l'invasion et à la survie de Typhimurium dans les cellules épithéliales et dans les macrophages RAW 264.7 si elles sont exprimées en trop grand nombre de copies (entre 300 et 500 copies) (168). La protéine GFP_{mut3} est, telle que mentionné précédemment, une protéine excessivement stable ayant un

temps de demi-vie d'environ 24 h accentuant ainsi son effet toxique (10). Par conséquent, le clonage d'une protéine GFP déstabilisée sur un vecteur à moyen nombre de copies aurait pu s'avérer le choix idéal pour diminuer l'effet toxique de la GFP_{mut3} et favoriser le maintien du vecteur pBBR1-GFP dans la banque de Typhi (10, 168). Il aurait également été possible de cloner un gène essentiel (par exemple : expression constitutive du gène *asd*) sur le vecteur pBBR1-GFP et placer ce vecteur dans une souche déficiente pour ce gène forçant le maintien du vecteur dans la souche mutante (113). Ainsi, malgré la toxicité de la protéine GFP et DsRed, Typhi aurait été obligé de conserver le vecteur pBBR1-GFP. Toujours pour optimiser le taux d'enrichissement, il aurait été possible suite à la première infection de macrophages THP-1 de réinfecter d'autres macrophages THP-1 pour favoriser les clones de Typhi déjà triés. Cette même étape aurait pu être utilisée suite à l'infection de macrophages RAW 264.7 pour diminuer la quantité de clones inductibles dans ceux-ci.

En troisième temps, nous avons pour but d'identifier des gènes induits tôt (2 h post-infection) et tard (24 h post-infection) durant l'infection de macrophages THP-1. Encore une fois, l'utilisation d'une protéine GFP déstabilisée (temps de demi-vie inférieur à 2 h) plutôt que la GFP_{mut3}, nous aurait permis de trier plus efficacement des gènes induits tôt après l'infection et des gènes induits tardivement (10).

Toutes ces optimisations auraient fortement contribué à l'obtention d'un plus grand nombre de gènes inductibles uniquement dans les macrophages THP-1 comparativement aux macrophages RAW 264.7. En effet, près de 85 % des clones triés étaient soit non fluorescents dans les macrophages THP-1 ou plus fluorescent dans les macrophages RAW 264.7 (Annexe 1 et 2).

6.2. Implication des gènes de SPI-1 durant la phase intracellulaire d'une infection de macrophages

Depuis l'étude de Galan et Curtiss en 1989, plusieurs autres études commencent à montrer l'induction de gènes de SPI-1 ou l'expression d'effecteurs de SPI-1 durant la phase intracellulaire des macrophages. Parmi ces études, Hensel *et al.* ont sélectionné négativement des souches mutantes de Typhimurium pour les gènes *invA* et *invE* de SPI-1 par la technique STM suggérant que ceux-ci sont essentiels à la survie des salmonelles dans les macrophages (144). Toutefois, Hensel *et al.* n'ont pas testé spécifiquement ces souches mutantes pour leur implication au niveau de la survie dans les macrophages. Plus récemment, Steele-Mortimer *et al.* ont montré que la délétion du gène *invA* entraîne une diminution de la survie de Typhimurium dans les cellules épithéliales humaines HeLa (275). Selon leurs résultats, le gène *invA* bloque la maturation de la SCV vers le stade tardif phagosome-lysosome favorisant la survie des salmonelles dans les SCV (275). Chan *et al.* et Lawley *et al.* ont utilisé une technique similaire à STM pour sélectionner négativement des mutants par transposon qui étaient respectivement atténués au niveau de la survie et de la persistance de Typhimurium dans le modèle de typhoïde murine (47, 182). Chan *et al.* ont sélectionné négativement 36 événements de transposition dans la région des gènes de SPI-1 qui causaient une atténuation de la survie de Typhimurium dans les macrophages RAW 264.7 (47). Ceux-ci ont poursuivi leur étude pour caractériser spécifiquement l'implication de certains gènes de SPI-1 qu'ils avaient sélectionnés au niveau de la survie (47). Parmi les mutations testées, les mutants *hilA*, *orgA*, *sipA* et *sipB* n'entraînaient pas d'atténuation de la survie, tel que leurs résultats par sélection négative l'avaient prédit (47). Dans l'autre étude, Lawley *et al.* ont tenté d'identifier des gènes essentiels au niveau de la persistance des salmonelles suite à une infection intrapéritonéale de souris (182). Ceux-ci ont identifié et confirmé que les gènes *sipBCD* et *orgA* de SPI-1 semblaient être importants 49 jours post-infection de souris (182). Toutefois, les étapes de persistance des salmonelles au niveau des infections systémiques sont toujours mal définies. Par conséquent, la sélection négative des gènes de SPI-1 par Lawley *et al.* pourrait être aucunement liée à la

survie dans les macrophages, mais plutôt résulter de la nécessité des gènes de SPI-1 plus tard dans la persistance. Giacomodonato *et al.* ont, de leur côté, retrouvé les effecteurs du SST3-1 : SipA, SopA, SopB, SopD et SopE2 durant la phase intracellulaire de Typhimurium durant une infection de macrophages murins, suggérant leur implication au niveau de la survie (121). Parmi ces effecteurs, Brawn *et al.* ont montré que l'effecteur SipA est essentiel à la survie des salmonelles dans les macrophages (40). Cet effecteur permet de localiser correctement SifA au niveau des SCVs favorisant la formation des sifs (40). Inversement, Boyen *et al.* ont muté le régulateur *hilA* et les gènes codant pour les effecteurs SipA et SipB et ces souches mutantes n'étaient toutefois pas atténuées au niveau de la survie comparativement à leur souche parentale, infirmant l'étude de Brawn *et al.*, mais corroborant celle de Chan *et al.* (38, 40). Dans le même sens, Drecktrah *et al.* ont montré que la délétion complète de SPI-1 chez Typhimurium n'entraînait pas de déficience au niveau de la survie de la souche mutante par rapport à la souche sauvage dans les macrophages RAW 264.7 (73). De notre côté, nos résultats montrent qu'une mutation des gènes de SPI-1 entraîne une augmentation significative de la survie des souches mutantes, tant chez Typhi que chez Typhimurium, suite à une infection de macrophages (figure 25B et 27B). Nos résultats sont corroborés par l'étude de Gerlach *et al.* qui ont également montré une augmentation significative du taux de survie chez une souche mutante pour les gènes de SPI-1 de Typhimurium suite à une infection de macrophages RAW 264.7 (119). De plus, plusieurs de nos résultats sont corroborés par des phénotypes déjà bien acceptés dans la virulence des salmonelles suggérant qu'une altération des gènes de SPI-1 cause effectivement une augmentation de la survie de ces souches mutantes. En effet, Mills et Finlay ont montré que Typhimurium envahit plus efficacement les cellules non phagocytaires comparativement à Typhi, soit un résultat que nous avons également observé lors des tests d'invasion de cellules HeLa (214). De plus, la souche ISP1820 de Typhi survit plus efficacement à une infection de macrophages THP-1 que la souche SL1344 de Typhimurium comme l'a démontré l'étude de Schwan *et al.* (268). Nos résultats montrent aussi que Typhi survit moins bien que Typhimurium lors d'une infection de macrophages RAW 264.7, ce qui a également été démontré dans l'étude de Schwan *et al.* (268). Les

tests de cytotoxicité confirment également des phénotypes bien établis tels que Typhi n'induit pas de mort cellulaire dans les macrophages comparativement à Typhimurium et que cette mort cellulaire est grandement reliée à l'expression et au fonctionnement du SST3-1 (49, 268). Bref, des études supplémentaires devront être effectuées pour caractériser l'implication des gènes de SPI-1 au niveau de la survie.

Dans leur étude initiale, Galan et Curtiss ont comparé la DL50 de leur souche mutante pour les gènes *inv* à la DL50 d'une souche sauvage de Typhimurium lors d'infection intrapéritonéales de souris déficientes au niveau du locus NRAMP, soit un marqueur essentiel de l'hôte pour sa survie (110, 129, 293). Leur résultat de DL50 montre que la souche mutante pour les gènes *inv* est aussi apte que la souche sauvage de Typhimurium à tuer les souris NRAMP^{-/-} (110). Il serait intéressant de refaire ces infections chez des souris possédant le locus NRAMP, puisqu'il serait plus facile de comparer les DL50 dans ce modèle où plus que 20 Typhimurium sauvages ou mutantes seraient nécessaires pour tuer 50 % de la population de souris infectées. Tel que mentionné précédemment, nous pourrions retester notre hypothèse stipulant que les gènes de SPI-1 régulent négativement les gènes de SPI-2, mais contrairement à ce que nous avons testé, cette régulation pourrait survenir plus tôt que durant la phase intracellulaire. De plus, sachant que la technique d'échange allélique que nous avons utilisée a créé une mutation polaire des gènes situés en aval du gène *invA*, nous pourrions vérifier si l'augmentation significative du taux de survie est due à l'absence d'un SST3-1 fonctionnel à la surface des salmonelles ou si ce phénotype résulte de l'absence d'un gène unique. Pour ce faire, nous aurions qu'à refaire les infections de macrophages THP-1 et RAW 264.7 avec des souches contenant des mutations uniques pour les gènes situés en aval du gène *invA*. Dans le cas où l'augmentation de survie soit due spécifiquement à un des gènes de SPI-1 muté, nous pourrions identifier le mécanisme relié à la régulation négative des gènes de SPI-2.

7. Conclusions

Malgré son incidence surtout localisée dans les pays en voie de développement, l'infection systémique causée par *Salmonella enterica* sérovar Typhi est un problème majeur à travers le monde. L'utilisation abusive d'antibiotiques contre cette infection bactérienne a permis à Typhi d'acquérir de multiples résistances accentuant la gravité du problème. Les vaccins présentement sur le marché ne permettent pas aux personnes vivant dans les régions endémiques d'acquérir une protection adéquate face à cette bactérie mortelle. Par conséquent, la compréhension et la clarification des différentes étapes du cycle d'infection de Typhi chez l'homme est essentielle pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour atteindre les organes systémiques, Typhi utiliserait les macrophages de la *lamina propria* comme vecteur. Cette étape importante du cycle d'infection nécessite la capacité de Typhi à survivre dans les macrophages humains. Nous avons identifié, par la technique DFI, 11 gènes qui étaient surexprimés dans les macrophages THP-1 par rapport à leur expression dans les macrophages RAW 264.7. Ces 11 gènes pourraient donc être des gènes particulièrement importants pour la multiplication spécifique de Typhi dans les macrophages THP-1. Parmi les gènes testés, le gène *sty0159* et la région *sty1358-1367* ne se sont pas avérés essentiels pour la survie de Typhi dans les macrophages THP-1. Nous avons également déterminé l'implication des gènes de SPI-1 au niveau de la survie des salmonelles dans les macrophages ayant remarqué que ces gènes étaient induits durant la phase intracellulaire des salmonelles. Même si les gènes de SPI-1 ne régulent pas négativement les gènes de survie intracellulaire, l'altération des gènes de SPI-1 favorise la survie des salmonelles durant la phase intracellulaire d'une infection de macrophages.

Bref, le projet DFI a permis d'identifier de nouveaux gènes de Typhi induit chez l'humain qui pourraient servir de cibles thérapeutiques après leur caractérisation complète. Le second projet caractérisant l'implication des gènes de SPI-1 au niveau de la survie des salmonelles dans les macrophages a permis d'identifier un nouvel élément important dans le cycle d'infection des salmonelles,

soit l'effet négatif des gènes de SPI-1 au niveau de la survie intracellulaire des salmonelles ce qui n'avait jamais été observé. De plus, ce second projet a également permis d'identifier de nouvelles différences entre Typhi et Typhimurium au niveau des étapes différentes du cycle d'infection.

8. Références

1. **Abe, A., T. Matsuzawa, and A. Kuwae.** 2005. Type-III effectors: sophisticated bacterial virulence factors. *C. R. Biol* **328**:413-28.
2. **Acharya, I. L., C. U. Lowe, R. Thapa, V. L. Gurubacharya, M. B. Shrestha, M. Cadoz, D. Schulz, J. Armand, D. A. Bryla, B. Trollfors, and et al.** 1987. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* **317**:1101-4.
3. **Aertsen, A., R. Van Houdt, K. Vanoirbeek, and C. W. Michiels.** 2004. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**:6133-41.
4. **Ahmed, D., L. T. D'Costa, K. Alam, G. B. Nair, and M. A. Hossain.** 2006. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhi isolates with high-level resistance to ciprofloxacin in Dhaka, Bangladesh. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3516-7.
5. **Aiba, H., F. Nakasai, S. Mizushima, and T. Mizuno.** 1989. Phosphorylation of a bacterial activator protein, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, results in stimulation of its DNA-binding ability. *J. Biochem.* **106**:5-7.
6. **Alam, M. S., T. Akaike, S. Okamoto, T. Kubota, J. Yoshitake, T. Sawa, Y. Miyamoto, F. Tamura, and H. Maeda.** 2002. Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. *Infect. Immun.* **70**:3130-42.
7. **Alpuche Aranda, C. M., J. A. Swanson, W. P. Loomis, and S. I. Miller.** 1992. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10079-83.
8. **Ames, G. F.** 1964. Uptake of Amino Acids by *Salmonella Typhimurium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **104**:1-18.
9. **Ames, G. F., and J. R. Roth.** 1968. Histidine and aromatic permeases of *Salmonella typhimurim*. *J. Bacteriol.* **96**:1742-9.
10. **Andersen, J. B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjorn, M. Givskov, and S. Molin.** 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2240-6.
11. **Antunes, P., J. Machado, and L. Peixe.** 2006. Illegal use of nitrofurans in food animals: Contribution to human salmonellosis? *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:1047-9.

12. **Arricau, N., D. Hermant, H. Waxin, C. Ecobichon, P. S. Duffey, and M. Y. Popoff.** 1998. The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol. Microbiol* **29**:835-50.
13. **Bader, M. W., W. W. Navarre, W. Shiau, H. Nikaido, J. G. Frye, M. McClelland, F. C. Fang, and S. I. Miller.** 2003. Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* **50**:219-30.
14. **Bader, M. W., S. Sanowar, M. E. Daley, A. R. Schneider, U. Cho, W. Xu, R. E. Klevit, H. Le Moual, and S. I. Miller.** 2005. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* **122**:461-72.
15. **Baird, G. S., D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien.** 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**:11984-9.
16. **Bajaj, V., C. Hwang, and C. A. Lee.** 1995. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol. Microbiol.* **18**:715-27.
17. **Bajaj, V., R. L. Lucas, C. Hwang, and C. A. Lee.** 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol. Microbiol.* **22**:703-14.
18. **Bang, I. S., J. P. Audia, Y. K. Park, and J. W. Foster.** 2002. Autoinduction of the *ompR* response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. *Mol. Microbiol.* **44**:1235-50.
19. **Bang, I. S., B. H. Kim, J. W. Foster, and Y. K. Park.** 2000. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* **182**:2245-52.
20. **Barb, A. W., A. L. McClerren, K. Snehelatha, C. M. Reynolds, P. Zhou, and C. R. Raetz.** 2007. Inhibition of lipid A biosynthesis as the primary mechanism of CHIR-090 antibiotic activity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **46**:3793-802.
21. **Bartilson, M., A. Marra, J. Christine, J. S. Asundi, W. P. Schneider, and A. E. Hromockyj.** 2001. Differential fluorescence induction reveals *Streptococcus pneumoniae* loci regulated by competence stimulatory peptide. *Mol. Microbiol.* **39**:126-35.

22. **Baumler, A. J., R. M. Tsolis, F. A. Bowe, J. G. Kusters, S. Hoffmann, and F. Heffron.** 1996. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect. Immun.* **64**:61-8.
23. **Baumler, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1996. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**:1862-5.
24. **Baumler, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1996. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**:279-83.
25. **Baxter, M. A., T. F. Fahlen, R. L. Wilson, and B. D. Jones.** 2003. HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect. Immun.* **71**:1295-305.
26. **Behlau, I., and S. I. Miller.** 1993. A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells. *J. Bacteriol.* **175**:4475-84.
27. **Beier, D., and R. Gross.** 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:143-52.
28. **Beuzon, C. R., G. Banks, J. Deiwick, M. Hensel, and D. W. Holden.** 1999. pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **33**:806-16.
29. **Beuzon, C. R., S. Meresse, K. E. Unsworth, J. Ruiz-Albert, S. Garvis, S. R. Waterman, T. A. Ryder, E. Boucrot, and D. W. Holden.** 2000. *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *Embo J.* **19**:3235-49.
30. **Bevis, B. J., and B. S. Glick.** 2002. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.* **20**:83-7.
31. **Bhan, M. K., R. Bahl, and S. Bhatnagar.** 2005. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet* **366**:749-62.
32. **Bijlsma, J. J., and E. A. Groisman.** 2005. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **57**:85-96.
33. **Bitar, R., and J. Tarpley.** 1985. Intestinal perforation in typhoid fever: a historical and state-of-the-art review. *Rev. Infect. Dis.* **7**:257-71.

34. **Blanc-Potard, A. B., and E. A. Groisman.** 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *Embo J.* **16**:5376-85.
35. **Blaser, M. J., and L. S. Newman.** 1982. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev. Infect. Dis.* **4**:1096-106.
36. **Boland, A., M. P. Sory, M. Iriarte, C. Kerbouch, P. Wattiau, and G. R. Cornelis.** 1996. Status of YopM and YopN in the Yersinia Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *Embo J.* **15**:5191-201.
37. **Bongaerts, R. J., I. Hautefort, J. M. Sidebotham, and J. C. Hinton.** 2002. Green fluorescent protein as a marker for conditional gene expression in bacterial cells. *Methods Enzymol.* **358**:43-66.
38. **Boyen, F., F. Pasmans, E. Donne, F. Van Immerseel, C. Adriaensen, J. P. Hernalsteens, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 2006. Role of SPI-1 in the interactions of *Salmonella Typhimurium* with porcine macrophages. *Vet. Microbiol.* **113**:35-44.
39. **Boyle, E. C., N. F. Brown, and B. B. Finlay.** 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. *Cell Microbiol.* **8**:1946-57.
40. **Brawn, L. C., R. D. Hayward, and V. Koronakis.** 2007. *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe* **1**:63-75.
41. **Brown, J. C., C. J. Thomson, and S. G. Amyes.** 1996. Mutations of the *gyrA* gene of clinical isolates of *Salmonella typhimurium* and three other *Salmonella* species leading to decreased susceptibilities to 4-quinolone drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**:351-6.
42. **Bueno, S. M., C. A. Santiviago, A. A. Murillo, J. A. Fuentes, A. N. Trombert, P. I. Rodas, P. Youderian, and G. C. Mora.** 2004. Precise excision of the large pathogenicity island, SPI7, in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J. Bacteriol.* **186**:3202-13.
43. **Bumann, D.** 2002. Examination of *Salmonella* gene expression in an infected mammalian host using the green fluorescent protein and two-colour flow cytometry. *Mol. Microbiol.* **43**:1269-83.
44. **Butler, T., J. Knight, S. K. Nath, P. Speelman, S. K. Roy, and M. A. Azad.** 1985. Typhoid fever complicated by intestinal perforation: a persisting fatal disease requiring surgical management. *Rev. Infect. Dis.* **7**:244-56.

45. **Canada, A. d. S. P. d.** 2001, posting date. FICHE TECHNIQUE SANTÉ-SÉCURITÉ - MATIÈRES INFECTIEUSES. [Online.]
46. **Chaisson, R. E.** 1988. Infections due to encapsulated bacteria, *Salmonella*, *Shigella*, and *Campylobacter*. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **2**:475-84.
47. **Chan, K., C. C. Kim, and S. Falkow.** 2005. Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect. Immun.* **73**:5438-49.
48. **Chen, L. M., S. Hobbie, and J. E. Galan.** 1996. Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* **274**:2115-8.
49. **Chen, L. M., K. Kaniga, and J. E. Galan.** 1996. *Salmonella spp.* are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol. Microbiol.* **21**:1101-15.
50. **Chiu, C. H., L. H. Su, and C. Chu.** 2004. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:311-22.
51. **Chiu, C. H., P. Tang, C. Chu, S. Hu, Q. Bao, J. Yu, Y. Y. Chou, H. S. Wang, and Y. S. Lee.** 2005. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res.* **33**:1690-8.
52. **Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson, and B. N. Ames.** 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**:753-62.
53. **Cirillo, D. M., R. H. Valdivia, D. M. Monack, and S. Falkow.** 1998. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol. Microbiol.* **30**:175-88.
54. **Clontech.** 2001. Living colors: User Manual, p. 47. *In* C. L. Inc. (ed.).
55. **Coburn, B., G. A. Grassl, and B. B. Finlay.** 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.* **85**:112-8.
56. **Collazo, C. M., and J. E. Galan.** 1997. The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol. Microbiol.* **24**:747-56.
57. **Collazo, C. M., and J. E. Galan.** 1996. Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**:3524-31.

58. **Connor, B. A., and E. Schwartz.** 2005. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *Lancet Infect. Dis.* **5**:623-8.
59. **Cormack, B. P., R. H. Valdivia, and S. Falkow.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**:33-8.
60. **Crago, A. M., and V. Koronakis.** 1998. *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol. Microbiol.* **30**:47-56.
61. **Crump, J. A., S. P. Luby, and E. D. Mintz.** 2004. The global burden of typhoid fever. *Bull. World Health Organ.* **82**:346-53.
62. **D'Aoust, J. Y.** 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* **12**:17-40.
63. **Daefler, S., and M. Russel.** 1998. The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Mol. Microbiol.* **28**:1367-80.
64. **Daigle, F., J. E. Graham, and R. Curtiss, 3rd.** 2001. Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol. Microbiol.* **41**:1211-22.
65. **Danelishvili, L., M. J. Poort, and L. E. Bermudez.** 2004. Identification of *Mycobacterium avium* genes up-regulated in cultured macrophages and in mice. *FEMS Microbiol. Lett.* **239**:41-9.
66. **Darwin, K. H., and V. L. Miller.** 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:405-28.
67. **De Groote, M. A., D. Granger, Y. Xu, G. Campbell, R. Prince, and F. C. Fang.** 1995. Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**:6399-403.
68. **Deiwick, J., T. Nikolaus, S. Erdogan, and M. Hensel.** 1999. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol. Microbiol.* **31**:1759-73.
69. **Deiwick, J., S. P. Salcedo, E. Boucrot, S. M. Gilliland, T. Henry, N. Petermann, S. R. Waterman, J. P. Gorvel, D. W. Holden, and S. Meresse.** 2006. The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect. Immun.* **74**:6965-72.
70. **Delaleu, N., and M. Bickel.** 2004. Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontol 2000* **35**:42-52.

71. **Dieye, Y., J. L. Dyszel, R. Kader, and B. M. Ahmer.** 2007. Systematic analysis of the regulation of type three secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol.* **7**:3.
72. **Diridl, G., H. Pichler, and D. Wolf.** 1986. Treatment of chronic *salmonella* carriers with ciprofloxacin. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **5**:260-1.
73. **Drecktrah, D., L. A. Knodler, R. Ireland, and O. Steele-Mortimer.** 2006. The mechanism of *Salmonella* entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic* **7**:39-51.
74. **Dreher, D., M. Kok, C. Obregon, S. G. Kiama, P. Gehr, and L. P. Nicod.** 2002. *Salmonella* virulence factor SipB induces activation and release of IL-18 in human dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **72**:743-51.
75. **Duncan, C., H. Dougall, P. Johnston, S. Green, R. Brogan, C. Leifert, L. Smith, M. Golden, and N. Benjamin.** 1995. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat. Med.* **1**:546-51.
76. **Eckmann, L., M. F. Kagnoff, and J. Fierer.** 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* **61**:4569-74.
77. **Eckmann, L., M. T. Rudolf, A. Ptaszniak, C. Schultz, T. Jiang, N. Wolfson, R. Tsien, J. Fierer, S. B. Shears, M. F. Kagnoff, and A. E. Traynor-Kaplan.** 1997. D-myo-Inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in response to *Salmonella* invasion inhibits phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**:14456-60.
78. **Eckmann, L., W. F. Stenson, T. C. Savidge, D. C. Lowe, K. E. Barrett, J. Fierer, J. R. Smith, and M. F. Kagnoff.** 1997. Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. *J. Clin. Invest.* **100**:296-309.
79. **Edwards, R. A., G. J. Olsen, and S. R. Maloy.** 2002. Comparative genomics of closely related *salmonellae*. *Trends Microbiol.* **10**:94-9.
80. **Ehrbar, K., and W. D. Hardt.** 2005. Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect. Genet. Evol.* **5**:1-9.
81. **Eichelberg, K., and J. E. Galan.** 1999. Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and hilA. *Infect. Immun.* **67**:4099-105.

82. **Eichelberg, K., C. C. Ginocchio, and J. E. Galan.** 1994. Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of InvC to the F0F1 ATPase family of proteins. *J. Bacteriol.* **176**:4501-10.
83. **Eisenhauer, P. B., S. S. Harwig, and R. I. Lehrer.** 1992. Cryptdins: antimicrobial defensins of the murine small intestine. *Infect. Immun.* **60**:3556-65.
84. **Ellermeier, C. D., and J. M. Slauch.** 2003. RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **185**:5096-108.
85. **Elsinghorst, E. A., L. S. Baron, and D. J. Kopecko.** 1989. Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**:5173-7.
86. **Engels, E. A., M. E. Falagas, J. Lau, and M. L. Bennish.** 1998. Typhoid fever vaccines: a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity. *BMJ* **316**:110-6.
87. **Eriksson, S., S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, and J. C. Hinton.** 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **47**:103-18.
88. **Everest, P., J. Wain, M. Roberts, G. Rook, and G. Dougan.** 2001. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends Microbiol* **9**:316-20.
89. **Fang, F. C., S. J. Libby, N. A. Buchmeier, P. C. Loewen, J. Switala, J. Harwood, and D. G. Guiney.** 1992. The alternative sigma factor *katF* (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**:11978-82.
90. **Fang, G., V. Araujo, and R. L. Guerrant.** 1991. Enteric infections associated with exposure to animals or animal products. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **5**:681-701.
91. **Fantuzzi, G., and C. A. Dinarello.** 1999. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J. Clin. Immunol.* **19**:1-11.
92. **Faucher, S. P., R. Curtiss, 3rd, and F. Daigle.** 2005. Selective capture of *Salmonella enterica* serovar typhi genes expressed in macrophages that are absent from the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genome. *Infect. Immun.* **73**:5217-21.

93. **Faucher, S. P., S. Porwollik, C. M. Dozois, M. McClelland, and F. Daigle.** 2006. Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**:1906-11.
94. **Feng, X., R. Oropeza, and L. J. Kenney.** 2003. Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* **48**:1131-43.
95. **Ferreccio, C., J. G. Morris, Jr., C. Valdivieso, I. Prenzel, V. Sotomayor, G. L. Drusano, and M. M. Levine.** 1988. Efficacy of ciprofloxacin in the treatment of chronic typhoid carriers. *J. Infect. Dis.* **157**:1235-9.
96. **Fields, P. I., E. A. Groisman, and F. Heffron.** 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* **243**:1059-62.
97. **Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Heffron.** 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**:5189-93.
98. **Fink, S. L., and B. T. Cookson.** 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **73**:1907-16.
99. **Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1990. *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **162**:1096-106.
100. **Folkesson, A., S. Lofdahl, and S. Normark.** 2002. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res. Microbiol.* **153**:537-45.
101. **Forest, C., S. P. Faucher, K. Poirier, S. Houle, C. M. Dozois, and F. Daigle.** 2007. Contribution of the *stg* fimbrial operon of *Salmonella enterica* serovar Typhi during interaction with human cells. *Infect. Immun.* **75**:5264-71.
102. **Foster, J. W.** 1993. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* **175**:1981-7.
103. **Foster, J. W.** 1995. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**:215-37.

104. **Foster, J. W., and H. K. Hall.** 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**:771-8.
105. **Foster, J. W., and H. K. Hall.** 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**:5129-35.
106. **Francis, C. L., T. A. Ryan, B. D. Jones, S. J. Smith, and S. Falkow.** 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* **364**:639-42.
107. **Francis, C. L., M. N. Starnbach, and S. Falkow.** 1992. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol. Microbiol.* **6**:3077-87.
108. **Fu, Y., and J. E. Galan.** 1999. A *salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* **401**:293-7.
109. **Gahring, L. C., F. Heffron, B. B. Finlay, and S. Falkow.** 1990. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect. Immun.* **58**:443-8.
110. **Galan, J. E., and R. Curtiss, 3rd.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**:6383-7.
111. **Galan, J. E., and R. Curtiss, 3rd.** 1990. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun.* **58**:1879-85.
112. **Galan, J. E., C. Ginocchio, and P. Costeas.** 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* **174**:4338-49.
113. **Galan, J. E., K. Nakayama, and R. Curtiss, 3rd.** 1990. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene* **94**:29-35.
114. **Galyov, E. E., M. W. Wood, R. Rosqvist, P. B. Mullan, P. R. Watson, S. Hedges, and T. S. Wallis.** 1997. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol. Microbiol.* **25**:903-12.
115. **Garcia-del Portillo, F., J. W. Foster, and B. B. Finlay.** 1993. Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect. Immun.* **61**:4489-92.

116. **Garcia Vescovi, E., F. C. Soncini, and E. A. Groisman.** 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* **84**:165-74.
117. **Garmendia, J., C. R. Beuzon, J. Ruiz-Albert, and D. W. Holden.** 2003. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology* **149**:2385-96.
118. **Gerlach, R. G., D. Jackel, N. Geymeier, and M. Hensel.** 2007. Salmonella pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **75**:4697-709.
119. **Gerlach, R. G., D. Jackel, B. Stecher, C. Wagner, A. Lupas, W. D. Hardt, and M. Hensel.** 2007. Salmonella Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol.* **9**:1834-50.
120. **Germanier, R., and E. Fuer.** 1975. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* **131**:553-8.
121. **Giacomodonato, M. N., S. Uzzau, D. Bacciu, R. Caccuri, S. H. Sarnacki, S. Rubino, and M. C. Cerquetti.** 2007. SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 effector proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are synthesized at late stages of infection in mice. *Microbiology* **153**:1221-8.
122. **Giannella, R. A.** 1979. Importance of the intestinal inflammatory reaction in salmonella-mediated intestinal secretion. *Infect. Immun.* **23**:140-5.
123. **Giannella, R. A., S. B. Formal, G. J. Dammin, and H. Collins.** 1973. Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion, and morphologic reaction in the rabbit ileum. *J. Clin. Invest.* **52**:441-53.
124. **Giannella, R. A., W. R. Rout, and S. B. Formal.** 1977. Effect of indomethacin on intestinal water transport in *salmonella*-infected rhesus monkeys. *Infect. Immun.* **17**:136-9.
125. **Ginocchio, C., J. Pace, and J. E. Galan.** 1992. Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**:5976-80.
126. **Ginocchio, C. C., and J. E. Galan.** 1995. Functional conservation among members of the *Salmonella typhimurium* InvA family of proteins. *Infect. Immun.* **63**:729-32.

127. **Gorvel, J. P., and S. Meresse.** 2001. Maturation steps of the Salmonella-containing vacuole. *Microbes Infect.* **3**:1299-303.
128. **Gotuzzo, E., J. G. Guerra, L. Benavente, J. C. Palomino, C. Carrillo, J. Lopera, F. Delgado, D. R. Nalin, and J. Sabbaj.** 1988. Use of norfloxacin to treat chronic typhoid carriers. *J. Infect. Dis.* **157**:1221-5.
129. **Govoni, G., F. Canonne-Hergaux, C. G. Pfeifer, S. L. Marcus, S. D. Mills, D. J. Hackam, S. Grinstein, D. Malo, B. B. Finlay, and P. Gros.** 1999. Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect. Immun.* **67**:2225-32.
130. **Graham, J. E., and J. E. Clark-Curtiss.** 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**:11554-9.
131. **Gunn, J. S., C. M. Alpuche-Aranda, W. P. Loomis, W. J. Belden, and S. I. Miller.** 1995. Characterization of the *Salmonella typhimurium pagC/pagD* chromosomal region. *J. Bacteriol.* **177**:5040-7.
132. **Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**:1171-82.
133. **Gunn, J. S., and S. I. Miller.** 1996. PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J. Bacteriol.* **178**:6857-64.
134. **Guo, L., K. B. Lim, J. S. Gunn, B. Bainbridge, R. P. Darveau, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1997. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science* **276**:250-3.
135. **Guo, L., K. B. Lim, C. M. Poduje, M. Daniel, J. S. Gunn, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1998. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**:189-98.
136. **Hanahan D., J. J. a. F. R. B.** 1991. [4] Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria, p. 63-113. *In* A. Press (ed.), *Methods in enzymology*, vol. 204, New York.
137. **Handfield, M., L. J. Brady, A. Progulske-Fox, and J. D. Hillman.** 2000. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. *Trends Microbiol.* **8**:336-9.

138. **Hardt, W. D., L. M. Chen, K. E. Schuebel, X. R. Bustelo, and J. E. Galan.** 1998. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**:815-26.
139. **Hardt, W. D., H. Urlaub, and J. E. Galan.** 1998. A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**:2574-9.
140. **Harris, J. B., A. Baresch-Bernal, S. M. Rollins, A. Alam, R. C. LaRocque, M. Bikowski, A. F. Peppercorn, M. Handfield, J. D. Hillman, F. Qadri, S. B. Calderwood, E. Hohmann, R. F. Breiman, W. A. Brooks, and E. T. Ryan.** 2006. Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infect. Immun.* **74**:5161-8.
141. **Heatwole, V. M., and R. L. Somerville.** 1991. The tryptophan-specific permease gene, *mtr*, is differentially regulated by the tryptophan and tyrosine repressors in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **173**:3601-4.
142. **Hecht, G.** 1999. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am. J. Physiol.* **277**:C351-8.
143. **Helander, I. M., I. Kilpelainen, and M. Vaara.** 1994. Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium*: a 31P-NMR study. *Mol. Microbiol.* **11**:481-7.
144. **Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**:400-3.
145. **Hensel, M., J. E. Shea, B. Raupach, D. Monack, S. Falkow, C. Gleeson, T. Kubo, and D. W. Holden.** 1997. Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol. Microbiol.* **24**:155-67.
146. **Hensel, M., J. E. Shea, S. R. Waterman, R. Mundy, T. Nikolaus, G. Banks, A. Vazquez-Torres, C. Gleeson, F. C. Fang, and D. W. Holden.** 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* **30**:163-74.
147. **Hernandez, L. D., K. Hueffer, M. R. Wenk, and J. E. Galan.** 2004. *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science* **304**:1805-7.

148. **Hersh, D., D. M. Monack, M. R. Smith, N. Ghori, S. Falkow, and A. Zychlinsky.** 1999. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**:2396-401.
149. **Hobbie, S., L. M. Chen, R. J. Davis, and J. E. Galan.** 1997. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol.* **159**:5550-9.
150. **House, D., A. Bishop, C. Parry, G. Dougan, and J. Wain.** 2001. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **14**:573-8.
151. **Humphries, A. D., M. Raffatellu, S. Winter, E. H. Weening, R. A. Kingsley, R. Droleskey, S. Zhang, J. Figueiredo, S. Khare, J. Nunes, L. G. Adams, R. M. Tsolis, and A. J. Baumler.** 2003. The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Mol. Microbiol.* **48**:1357-76.
152. **Jabado, N., A. Jankowski, S. Dougaparsad, V. Picard, S. Grinstein, and P. Gros.** 2000. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J. Exp. Med.* **192**:1237-48.
153. **Jackman, J. E., C. A. Fierke, L. N. Tumej, M. Pirrung, T. Uchiyama, S. H. Tahir, O. Hindsgaul, and C. R. Raetz.** 2000. Antibacterial agents that target lipid A biosynthesis in gram-negative bacteria. Inhibition of diverse UDP-3-O-(r-3-hydroxymyristoyl)-n-acetylglucosamine deacetylases by substrate analogs containing zinc binding motifs. *J. Biol. Chem.* **275**:11002-9.
154. **Jackman, J. E., C. R. Raetz, and C. A. Fierke.** 1999. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase of *Escherichia coli* is a zinc metalloenzyme. *Biochemistry* **38**:1902-11.
155. **Jacobs, J. L., J. W. Gold, H. W. Murray, R. B. Roberts, and D. Armstrong.** 1985. *Salmonella* infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* **102**:186-8.
156. **Janda, S. L. A. a. J. M.** 2006. *The Enterobacteria*, Washington.
157. **Jewes, L. A.** 1987. Antimicrobial therapy of non-typhi *salmonella* and *Shigella* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **19**:557-60.
158. **Jones, B. D., N. Ghori, and S. Falkow.** 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**:15-23.

159. **Jones, M. A., S. D. Hulme, P. A. Barrow, and P. Wigley.** 2007. The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *Avian Pathol.* **36**:199-203.
160. **Jones, M. A., M. W. Wood, P. B. Mullan, P. R. Watson, T. S. Wallis, and E. E. Galyov.** 1998. Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infect. Immun.* **66**:5799-804.
161. **Kaniga, K., J. C. Bossio, and J. E. Galan.** 1994. The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins. *Mol. Microbiol.* **13**:555-68.
162. **Kaniga, K., M. S. Compton, R. Curtiss, 3rd, and P. Sundaram.** 1998. Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect. Immun.* **66**:5599-606.
163. **Kaniga, K., D. Trollinger, and J. E. Galan.** 1995. Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. *J. Bacteriol.* **177**:7078-85.
164. **Kaniga, K., S. Tucker, D. Trollinger, and J. E. Galan.** 1995. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. *J. Bacteriol.* **177**:3965-71.
165. **Kimberg, D. V., M. Field, J. Johnson, A. Henderson, and E. Gershon.** 1971. Stimulation of intestinal mucosal adenyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. *J. Clin. Invest.* **50**:1218-30.
166. **Kimbrough, T. G., and S. I. Miller.** 2000. Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**:11008-13.
167. **Klugman, K. P., H. J. Koornhof, J. B. Robbins, and N. N. Le Cam.** 1996. Immunogenicity, efficacy and serological correlate of protection of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. *Vaccine* **14**:435-8.
168. **Knodler, L. A., A. Bestor, C. Ma, I. Hansen-Wester, M. Hensel, B. A. Vallance, and O. Steele-Mortimer.** 2005. Cloning vectors and fluorescent proteins can significantly inhibit *Salmonella enterica* virulence in both epithelial cells and macrophages: implications for bacterial pathogenesis studies. *Infect. Immun.* **73**:7027-31.

169. **Knodler, L. A., B. B. Finlay, and O. Steele-Mortimer.** 2005. The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J. Biol. Chem.* **280**:9058-64.
170. **Knodler, L. A., and O. Steele-Mortimer.** 2005. The *Salmonella* effector PipB2 affects late endosome/lysosome distribution to mediate Sif extension. *Mol. Biol. Cell* **16**:4108-23.
171. **Kohbata, S., H. Yokoyama, and E. Yabuuchi.** 1986. Cytopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol. Immunol.***30**:1225-37.
172. **Kox, L. F., M. M. Wosten, and E. A. Groisman.** 2000. A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *Embo J.* **19**:1861-72.
173. **Kraus, M. D., B. Amatya, and Y. Kimula.** 1999. Histopathology of typhoid enteritis: morphologic and immunophenotypic findings. *Mod. Pathol.* **12**:949-55.
174. **Kubori, T., and J. E. Galan.** 2003. Temporal regulation of *salmonella* virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell* **115**:333-42.
175. **Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan, and S. I. Aizawa.** 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**:602-5.
176. **Kubori, T., A. Sukhan, S. I. Aizawa, and J. E. Galan.** 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**:10225-30.
177. **Kuhle, V., and M. Hensel.** 2004. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**:2812-26.
178. **Kuhle, V., and M. Hensel.** 2002. SseF and SseG are translocated effectors of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 that modulate aggregation of endosomal compartments. *Cell. Microbiol.* **4**:813-24.
179. **Lara-Tejero, M., F. S. Sutterwala, Y. Ogura, E. P. Grant, J. Bertin, A. J. Coyle, R. A. Flavell, and J. E. Galan.** 2006. Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *J. Exp. Med.* **203**:1407-12.

180. **Larrainzar, E., F. O'Gara, and J. P. Morrissey.** 2005. Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:257-77.
181. **Latasa, C., A. Roux, A. Toledo-Arana, J. M. Ghigo, C. Gamazo, J. R. Penades, and I. Lasa.** 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol. Microbiol.* **58**:1322-39.
182. **Lawley, T. D., K. Chan, L. J. Thompson, C. C. Kim, G. R. Govoni, and D. M. Monack.** 2006. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog.* **2**:e11.
183. **Lee, A. H., M. P. Zareei, and S. Daefler.** 2002. Identification of a NIPSNAP homologue as host cell target for *Salmonella* virulence protein SpiC. *Cell Microbiol.* **4**:739-50.
184. **Lee, A. K., C. S. Detweiler, and S. Falkow.** 2000. OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* **182**:771-81.
185. **Lee, C. A., and S. Falkow.** 1990. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**:4304-8.
186. **Lee, C. A., B. D. Jones, and S. Falkow.** 1992. Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**:1847-51.
187. **Lee, F. K., C. Morris, and J. Hackett.** 2006. The *Salmonella enterica* serovar Typhi Vi capsule and self-association pili share controls on expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **261**:41-6.
188. **Lee, I. S., J. L. Slonczewski, and J. W. Foster.** 1994. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**:1422-6.
189. **Leung, K. Y., and B. B. Finlay.** 1991. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**:11470-4.
190. **Levine, M. M., C. Ferreccio, R. E. Black, and R. Germanier.** 1987. Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet* **1**:1049-52.

191. **Lill, R., K. Cunningham, L. A. Brundage, K. Ito, D. Oliver, and W. Wickner.** 1989. SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *Embo J.* **8**:961-6.
192. **Lin, F. Y., V. A. Ho, H. B. Khiem, D. D. Trach, P. V. Bay, T. C. Thanh, Z. Kossaczka, D. A. Bryla, J. Shiloach, J. B. Robbins, R. Schneerson, and S. C. Szu.** 2001. The efficacy of a *Salmonella typhi* Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. *N. Engl. J. Med.* **344**:1263-9.
193. **Liu, L., A. A. Roberts, and T. Ganz.** 2003. By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **170**:575-80.
194. **Looney, R. J., and R. T. Steigbigel.** 1986. Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* **108**:506-16.
195. **Lostroh, C. P., and C. A. Lee.** 2001. The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA-dependent activation of P(prgH) from *Salmonella* pathogenicity island 1. *J. Bacteriol.* **183**:4876-85.
196. **Lucas, R. L., and C. A. Lee.** 2001. Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **183**:2733-45.
197. **Mahan, M. J., J. M. Slauch, and J. J. Mekalanos.** 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**:686-8.
198. **Martin-Orozco, N., N. Touret, M. L. Zaharik, E. Park, R. Kopelman, S. Miller, B. B. Finlay, P. Gros, and S. Grinstein.** 2006. Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Mol. Biol. Cell* **17**:498-510.
199. **Mastroeni, P., A. Vazquez-Torres, F. C. Fang, Y. Xu, S. Khan, C. E. Hormaeche, and G. Dougan.** 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J. Exp. Med.* **192**:237-48.
200. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-6.

201. **McCormick, B. A., S. P. Colgan, C. Delp-Archer, S. I. Miller, and J. L. Madara.** 1993. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J. Cell. Biol.* **123**:895-907.
202. **McCormick, B. A., P. M. Hofman, J. Kim, D. K. Carnes, S. I. Miller, and J. L. Madara.** 1995. Surface attachment of *Salmonella typhimurium* to intestinal epithelia in response to the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils. *J. Cell. Biol.* **131**:1599-608.
203. **McCormick, B. A., S. I. Miller, D. Carnes, and J. L. Madara.** 1995. Transepithelial signaling to neutrophils by *salmonellae*: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect. Immun.* **63**:2302-9.
204. **McCormick, B. A., C. A. Parkos, S. P. Colgan, D. K. Carnes, and J. L. Madara.** 1998. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol.* **160**:455-66.
205. **McGhie, E. J., R. D. Hayward, and V. Koronakis.** 2001. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *Embo J.* **20**:2131-9.
206. **McKean, S., J. Davies, and R. Moore.** 2005. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes Infect.* **7**:1352-63.
207. **Miao, E. A., M. Brittnacher, A. Haraga, R. L. Jeng, M. D. Welch, and S. I. Miller.** 2003. *Salmonella* effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton. *Mol. Microbiol.* **48**:401-15.
208. **Miao, E. A., J. A. Freeman, and S. I. Miller.** 2002. Transcription of the SsrAB regulon is repressed by alkaline pH and is independent of PhoPQ and magnesium concentration. *J. Bacteriol.* **184**:1493-7.
209. **Miao, E. A., C. A. Scherer, R. M. Tsolis, R. A. Kingsley, L. G. Adams, A. J. Baumler, and S. I. Miller.** 1999. *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol. Microbiol.* **34**:850-64.
210. **Mikael Rhen, D. M., Pietro Mastroeni and John Threlfal.** 2007. *Salmonella*: Molecular Biology and Pathogenesis. horizon bioscience.
211. **Miller, R. A., and B. E. Britigan.** 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:1-18.

212. **Miller, S. I., A. M. Kukral, and J. J. Mekalanos.** 1989. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **86**:5054-8.
213. **Mills, D. M., V. Bajaj, and C. A. Lee.** 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. Mol. Microbiol. **15**:749-59.
214. **Mills, S. D., and B. B. Finlay.** 1994. Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. Microb. Pathog. **17**:409-23.
215. **Mills, S. D., S. R. Ruschkowski, M. A. Stein, and B. B. Finlay.** 1998. Trafficking of porin-deficient *Salmonella typhimurium* mutants inside HeLa cells: *ompR* and *envZ* mutants are defective for the formation of *Salmonella*-induced filaments. Infect. Immun. **66**:1806-11.
216. **Miriagou, V., P. T. Tassios, N. J. Legakis, and L. S. Tzouveleakis.** 2004. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. Int J. Antimicrob. Agents **23**:547-55.
217. **Monack, D. M., A. Mueller, and S. Falkow.** 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. Nat. Rev. Microbiol. **2**:747-65.
218. **Montagne, M., A. Martel, and H. Le Moual.** 2001. Characterization of the catalytic activities of the PhoQ histidine protein kinase of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol. **183**:1787-91.
219. **Mota, L. J., I. Sorg, and G. R. Cornelis.** 2005. Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. FEMS Microbiol. Lett. **252**:1-10.
220. **Navarre, W. W., T. A. Halsey, D. Walthers, J. Frye, M. McClelland, J. L. Potter, L. J. Kenney, J. S. Gunn, F. C. Fang, and S. J. Libby.** 2005. Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. Mol. Microbiol. **56**:492-508.
221. **Nguyen, Q. C., P. Everest, T. K. Tran, D. House, S. Murch, C. Parry, P. Connerton, V. B. Phan, S. D. To, P. Mastroeni, N. J. White, T. H. Tran, V. H. Vo, G. Dougan, J. J. Farrar, and J. Wain.** 2004. A clinical, microbiological, and pathological study of intestinal perforation associated with typhoid fever. Clin. Infect. Dis. **39**:61-7.
222. **Nikaido, H., and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. **49**:1-32.

223. **Nikolaus, T., J. Deiwick, C. Rappl, J. A. Freeman, W. Schroder, S. I. Miller, and M. Hensel.** 2001. SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 and function as a translocon. *J. Bacteriol.* **183**:6036-45.
224. **Norris, F. A., M. P. Wilson, T. S. Wallis, E. E. Galyov, and P. W. Majerus.** 1998. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**:14057-9.
225. **Ochman, H., and E. A. Groisman.** 1996. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **64**:5410-2.
226. **Ohl, M. E., and S. I. Miller.** 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Med.* **52**:259-74.
227. **Okamura, M., H. S. Lillehoj, R. B. Raybourne, U. S. Babu, R. A. Heckert, H. Tani, K. Sasai, E. Baba, and E. P. Lillehoj.** 2005. Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **107**:327-35.
228. **Onishi, H. R., B. A. Pelak, L. S. Gerckens, L. L. Silver, F. M. Kahan, M. H. Chen, A. A. Patchett, S. M. Galloway, S. A. Hyland, M. S. Anderson, and C. R. Raetz.** 1996. Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. *Science* **274**:980-2.
229. **Ouahrani-Bettache, S., F. Porte, J. Teyssier, J. P. Liutard, and S. Kohler.** 1999. pBBR1-GFP: a broad-host-range vector for prokaryotic promoter studies. *Biotechniques* **26**:620-2.
230. **Ouellette, A. J.** 2004. Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**:405-19.
231. **Park, Y. K., B. Bearson, S. H. Bang, I. S. Bang, and J. W. Foster.** 1996. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **20**:605-11.
232. **Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebahia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**:848-52.

233. **Parry, C. M.** 2004. The treatment of multidrug-resistant and nalidixic acid-resistant typhoid fever in Viet Nam. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **98**:413-22.
234. **Parry, C. M., T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White, and J. J. Farrar.** 2002. Typhoid fever. *N. Engl. J. Med.* **347**:1770-82.
235. **Parry, C. M., V. A. Ho, T. Phuong le, P. V. Bay, M. N. Lanh, T. Tung le, N. T. Tham, J. Wain, T. T. Hien, and J. J. Farrar.** 2007. Randomized controlled comparison of ofloxacin, azithromycin, and an ofloxacin-azithromycin combination for treatment of multidrug-resistant and nalidixic acid-resistant typhoid fever. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:819-25.
236. **Patel, J. C., and J. E. Galan.** 2006. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J. Cell. Biol.* **175**:453-63.
237. **Pegues, D. A., M. J. Hantman, I. Behlau, and S. I. Miller.** 1995. PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Mol. Microbiol.* **17**:169-81.
238. **Pfeifer, C. G., S. L. Marcus, O. Steele-Mortimer, L. A. Knodler, and B. B. Finlay.** 1999. *Salmonella typhimurium* virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* **67**:5690-8.
239. **Pichler, H. E., G. Diridl, K. Stickler, and D. Wolf.** 1987. Clinical efficacy of ciprofloxacin compared with placebo in bacterial diarrhea. *Am. J. Med.* **82**:329-32.
240. **Pickard, D., J. Li, M. Roberts, D. Maskell, D. Hone, M. Levine, G. Dougan, and S. Chatfield.** 1994. Characterization of defined *ompR* mutants of *Salmonella typhi*: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infect. Immun.* **62**:3984-93.
241. **Pickard, D., J. Wain, S. Baker, A. Line, S. Chohan, M. Fookes, A. Barron, P. O. Gaora, J. A. Chabalgoity, N. Thanky, C. Scholes, N. Thomson, M. Quail, J. Parkhill, and G. Dougan.** 2003. Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J. Bacteriol.* **185**:5055-65.
242. **Porter, E. M., C. L. Bevins, D. Ghosh, and T. Ganz.** 2002. The multifaceted Paneth cell. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:156-70.
243. **Prentice, M. B., and L. Rahalison.** 2007. Plague. *Lancet* **369**:1196-207.

244. **Prokaryotes, J. C. o. t. I. C. o. S. o.** 2005. The type species of the genus *Salmonella Lignieres* 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**:519-20.
245. **Prost, L. R., M. E. Daley, V. Le Sage, M. W. Bader, H. Le Moual, R. E. Klevit, and S. I. Miller.** 2007. Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. Mol. Cell. **26**:165-74.
246. **Raetz, C. R., and C. Whitfield.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu. Rev. Biochem. **71**:635-700.
247. **Raffatellu, M., D. Chessa, R. P. Wilson, R. Dusold, S. Rubino, and A. J. Baumler.** 2005. The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. Infect. Immun. **73**:3367-74.
248. **Raffatellu, M., Y. H. Sun, R. P. Wilson, Q. T. Tran, D. Chessa, H. L. Andrews-Polymeris, S. D. Lawhon, J. F. Figueiredo, R. M. Tsolis, L. G. Adams, and A. J. Baumler.** 2005. Host restriction of *Salmonella enterica* serotype Typhi is not caused by functional alteration of SipA, SopB, or SopD. Infect. Immun. **73**:7817-26.
249. **Raffatellu, M., R. P. Wilson, D. Chessa, H. Andrews-Polymeris, Q. T. Tran, S. Lawhon, S. Khare, L. G. Adams, and A. J. Baumler.** 2005. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype typhimurium invasion of epithelial cells. Infect. Immun. **73**:146-54.
250. **Rakeman, J. L., H. R. Bonifield, and S. I. Miller.** 1999. A HilA-independent pathway to *Salmonella typhimurium* invasion gene transcription. J. Bacteriol. **181**:3096-104.
251. **Rang, C., J. E. Galen, J. B. Kaper, and L. Chao.** 2003. Fitness cost of the green fluorescent protein in gastrointestinal bacteria. Can. J. Microbiol. **49**:531-7.
252. **Rappl, C., J. Deiwick, and M. Hensel.** 2003. Acidic pH is required for the functional assembly of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. FEMS Microbiol. Lett. **226**:363-72.
253. **Rathman, M., L. P. Barker, and S. Falkow.** 1997. The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. Infect. Immun. **65**:1475-85.

254. **Raupach, B., S. K. Peuschel, D. M. Monack, and A. Zychlinsky.** 2006. Caspase-1-mediated activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 contributes to innate immune defenses against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* **74**:4922-6.
255. **Redford, P., P. L. Roesch, and R. A. Welch.** 2003. DegS is necessary for virulence and is among extraintestinal *Escherichia coli* genes induced in murine peritonitis. *Infect. Immun.* **71**:3088-96.
256. **Reid, T., and C. Smith.** 1987. Ciprofloxacin treatment of chronic *Salmonella* excretors. *Chemioterapia* **6**:485-6.
257. **Reid, T. M.** 1992. The treatment of non-typhi salmonellosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**:4-8.
258. **Riesenberg-Wilmes, M. R., B. Bearson, J. W. Foster, and R. Curtis, 3rd.** 1996. Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**:1085-92.
259. **Rollenhagen, C., and D. Bumann.** 2006. *Salmonella enterica* highly expressed genes are disease specific. *Infect. Immun.* **74**:1649-60.
260. **Ruiz-Albert, J., X. J. Yu, C. R. Beuzon, A. N. Blakey, E. E. Galyov, and D. W. Holden.** 2002. Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Mol. Microbiol.* **44**:645-61.
261. **Russo, F. D., and T. J. Silhavy.** 1991. EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J. Mol. Biol.* **222**:567-80.
262. **Salcedo, S. P., and D. W. Holden.** 2003. SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *Embo J.* **22**:5003-14.
263. **Salyers Abigail A., W. D. D.** 2002. *Bacterial Pathogenesis; A molecular Approach*, 2nd Ed ed. ASM Press.
264. **Sanowar, S., and H. Le Moual.** 2005. Functional reconstitution of the *Salmonella typhimurium* PhoQ histidine kinase sensor in proteoliposomes. *Biochem. J.* **390**:769-76.
265. **Santé, O. M. d. I.** 2005, posting date. Salmonelles multirésistantes. [Online.]
266. **Schell, M. A.** 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:597-626.

267. **Schmittgen, T. D., B. A. Zakrajsek, A. G. Mills, V. Gorn, M. J. Singer, and M. W. Reed.** 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal. Biochem.* **285**:194-204.
268. **Schwan, W. R., X. Z. Huang, L. Hu, and D. J. Kopecko.** 2000. Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect. Immun.* **68**:1005-13.
269. **Shea, J. E., M. Hensel, C. Gleeson, and D. W. Holden.** 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**:2593-7.
270. **Shi, Y., M. J. Cromie, F. F. Hsu, J. Turk, and E. A. Groisman.** 2004. PhoP-regulated *Salmonella* resistance to the antimicrobial peptides magainin 2 and polymyxin B. *Mol. Microbiol.* **53**:229-41.
271. **Shivaprasad, H. L.** 2000. Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. Sci. Tech.* **19**:405-24.
272. **Simanjuntak, C. H., F. P. Paleologo, N. H. Punjabi, R. Darmowigoto, Soeprawoto, H. Totosudirjo, P. Haryanto, E. Suprijanto, N. D. Witham, and S. L. Hoffman.** 1991. Oral immunisation against typhoid fever in Indonesia with Ty21a vaccine. *Lancet* **338**:1055-9.
273. **Snavely, M. D., C. G. Miller, and M. E. Maguire.** 1991. The *mgtB* Mg²⁺ transport locus of *Salmonella typhimurium* encodes a P-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **266**:815-23.
274. **Soncini, F. C., E. Garcia Vescovi, F. Solomon, and E. A. Groisman.** 1996. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J. Bacteriol.* **178**:5092-9.
275. **Steele-Mortimer, O., J. H. Brumell, L. A. Knodler, S. Meresse, A. Lopez, and B. B. Finlay.** 2002. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol.* **4**:43-54.
276. **Steele-Mortimer, O., L. A. Knodler, S. L. Marcus, M. P. Scheid, B. Goh, C. G. Pfeifer, V. Duronio, and B. B. Finlay.** 2000. Activation of Akt/protein kinase B in epithelial cells by the *Salmonella typhimurium* effector *sigD*. *J. Biol. Chem.* **275**:37718-24.
277. **Steffes, C., J. Ellis, J. Wu, and B. P. Rosen.** 1992. The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. *J. Bacteriol.* **174**:3242-9.

278. **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.
279. **Tiwari, R. P., N. Sachdeva, G. S. Hoondal, and J. S. Grewal.** 2004. Adaptive acid tolerance response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J. Basic Microbiol.* **44**:137-46.
280. **Todd, E.** 1990. Epidemiology of foodborne illness: North America. *Lancet* **336**:788-90.
281. **Townsend, S. M., N. E. Kramer, R. Edwards, S. Baker, N. Hamlin, M. Simmonds, K. Stevens, S. Maloy, J. Parkhill, G. Dougan, and A. J. Baumler.** 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect. Immun.* **69**:2894-901.
282. **Uchiya, K., M. A. Barbieri, K. Funato, A. H. Shah, P. D. Stahl, and E. A. Groisman.** 1999. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *Embo J.* **18**:3924-33.
283. **Urbanowski, M. L., and G. V. Stauffer.** 1987. Regulation of the *metR* gene of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **169**:5841-4.
284. **Uzzau, S., G. S. Leori, V. Petrucci, P. R. Watson, G. Schianchi, D. Bacciu, V. Mazzarello, T. S. Wallis, and S. Rubino.** 2001. *Salmonella enterica* serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. *Infect. Immun.* **69**:3092-9.
285. **Valdivia, R. H., and S. Falkow.** 1996. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol. Microbiol.* **22**:367-78.
286. **Valdivia, R. H., and S. Falkow.** 1997. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* **277**:2007-11.
287. **Valdivia, R. H., A. E. Hromockyj, D. Monack, L. Ramakrishnan, and S. Falkow.** 1996. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene* **173**:47-52.
288. **van der Velden, A. W., A. J. Baumler, R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1998. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* **66**:2803-8.
289. **van der Velden, A. W., S. W. Lindgren, M. J. Worley, and F. Heffron.** 2000. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Infect. Immun.* **68**:5702-9.

290. **Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. J. Baumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W. T. Parks, and F. C. Fang.** 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**:804-8.
291. **Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, P. Mastroeni, H. Ischiropoulos, and F. C. Fang.** 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J. Exp. Med.* **192**:227-36.
292. **Vazquez-Torres, A., Y. Xu, J. Jones-Carson, D. W. Holden, S. M. Lucia, M. C. Dinauer, P. Mastroeni, and F. C. Fang.** 2000. Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **287**:1655-8.
293. **Vidal, S. M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene, and P. Gros.** 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* **73**:469-85.
294. **Virlogeux, I., H. Waxin, C. Ecobichon, and M. Y. Popoff.** 1995. Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology* **141** (Pt 12):3039-47.
295. **Wahdan, M. H., C. Serie, Y. Cerisier, S. Sallam, and R. Germanier.** 1982. A controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty 21a oral vaccine against typhoid: three-year results. *J. Infect. Dis.* **145**:292-5.
296. **Wain, J., N. T. Hoa, N. T. Chinh, H. Vinh, M. J. Everett, T. S. Diep, N. P. Day, T. Solomon, N. J. White, L. J. Piddock, and C. M. Parry.** 1997. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1404-10.
297. **Wanner, B. L.** 1992. Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J. Bacteriol.* **174**:2053-8.
298. **Waterman, S. H., G. Juarez, S. J. Carr, and L. Kilman.** 1990. *Salmonella arizona* infections in Latinos associated with rattlesnake folk medicine. *Am. J. Public Health* **80**:286-9.
299. **Winter, S. E., M. Raffatellu, R. P. Wilson, H. Russmann, and A. J. Baumler.** 2008. The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. *Cell Microbiol.* **10**:247-61.

300. **Witthoft, T., L. Eckmann, J. M. Kim, and M. F. Kagnoff.** 1998. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **275**:G564-71.
301. **Wood, M. W., M. A. Jones, P. R. Watson, S. Hedges, T. S. Wallis, and E. E. Galyov.** 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol. Microbiol.* **29**:883-91.
302. **Wood, M. W., M. A. Jones, P. R. Watson, A. M. Siber, B. A. McCormick, S. Hedges, R. Rosqvist, T. S. Wallis, and E. E. Galyov.** 2000. The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. *Cell Microbiol.* **2**:293-303.
303. **Wood, M. W., R. Rosqvist, P. B. Mullan, M. H. Edwards, and E. E. Galyov.** 1996. SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a sip-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol. Microbiol.* **22**:327-38.
304. **Worley, M. J., K. H. Ching, and F. Heffron.** 2000. *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol. Microbiol.* **36**:749-61.
305. **Wosten, M. M., and E. A. Groisman.** 1999. Molecular characterization of the PmrA regulon. *J. Biol. Chem.* **274**:27185-90.
306. **Wosten, M. M., L. F. Kox, S. Chamnongpol, F. C. Soncini, and E. A. Groisman.** 2000. A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* **103**:113-25.
307. **Young, K., L. L. Silver, D. Bramhill, P. Cameron, S. S. Eveland, C. R. Raetz, S. A. Hyland, and M. S. Anderson.** 1995. The envA permeability/cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase. *J. Biol. Chem.* **270**:30384-91.
308. **Zaidi, A. K., R. Hasan, and Z. A. Bhutta.** 2003. Typhoid fever. *N. Engl. J. Med.* **348**:1182-4; author reply 1182-4.
309. **Zeng, H., A. Q. Carlson, Y. Guo, Y. Yu, L. S. Collier-Hyams, J. L. Madara, A. T. Gewirtz, and A. S. Neish.** 2003. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J. Immunol.* **171**:3668-74.
310. **Zhang, S., R. A. Kingsley, R. L. Santos, H. Andrews-Polymenis, M. Raffatellu, J. Figueiredo, J. Nunes, R. M. Tsolis, L. G. Adams, and A. J. Baumler.** 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* **71**:1-12.

311. **Zhang, S., R. L. Santos, R. M. Tsois, S. Stender, W. D. Hardt, A. J. Baumler, and L. G. Adams.** 2002. The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect. Immun.* **70**:3843-55.
312. **Zhang, X. L., I. S. Tsui, C. M. Yip, A. W. Fung, D. K. Wong, X. Dai, Y. Yang, J. Hackett, and C. Morris.** 2000. *Salmonella enterica* serovar typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**:3067-73.
313. **Zhou, D., L. M. Chen, L. Hernandez, S. B. Shears, and J. E. Galan.** 2001. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol. Microbiol.* **39**:248-59.
314. **Zhou, D., M. S. Mooseker, and J. E. Galan.** 1999. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* **283**:2092-5.

Annexe 1

Tableau VII : Ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 des clones triés à 2 h post-infection

Clone (T-R-T)	% fluorescence dans les macrophages THP-1	% normalisé par rapport à DEF010	% fluorescence dans les macrophages RAW 264.7	% normalisé par rapport à DEF010	Ratio THP-1 / RAW 264.7
DEF010	8,32	1,00	16,25	1,00	1,0
2AB1	0,10	0,01	0,10	0,01	1,5
2AB2	0,34	0,04	0,03	0,00	17,3
2AB3	16,45	1,89	14,81	1,11	1,7
2AB4	28,93	3,32	31,31	2,35	1,4
2AB5	0,15	0,02	0,04	0,00	5,7
2AB6	0,10	0,01	0,04	0,00	3,8
2DB1	0,09	0,01	0,01	0,00	13,7
2DB2	20,20	2,32	22,06	1,66	1,4
2DB3	0,25	0,03	0,07	0,01	5,4
2DB4	26,40	3,03	30,65	2,30	1,3
2DB5	0,19	0,02	0,11	0,01	2,6
2DB6	0,14	0,02	0,01	0,00	21,4
DEF010	10,79	1,00	12,99	1,00	1,0
2AD1	6,19	0,71	30,04	2,26	0,3
2AD2	12,45	1,43	30,13	2,26	0,6
2AD3	9,28	1,06	5,19	0,39	2,7
2AD4	20,43	2,34	21,39	1,61	1,5
2AD5	35,07	4,02	27,30	2,05	2,0
2AD6	0,51	0,06	0,39	0,03	2,0
2DD1	0,23	0,03	0,13	0,01	2,7
2DD2	0,20	0,02	0,21	0,02	1,5
2DD3	0,33	0,04	0,18	0,01	2,8
2DD4	0,13	0,01	0,03	0,00	6,6
2DD5	46,86	5,37	40,07	3,01	1,8
2DD6	31,08	3,56	33,22	2,50	1,4
DEF010	0,49	1,00	2,71	1,00	1,0
2AE1	0,15	0,02	0,08	0,01	2,9
2AE2	0,00	0,00	0,00	0,00	X
2AE3	0,00	0,00	0,00	0,00	X
2AE4	0,00	0,00	0,02	0,00	0,0
2AE5	0,25	0,03	0,20	0,02	1,9
2AE6	0,00	0,00	0,00	0,00	X
2DE1	10,10	1,16	36,06	2,71	0,4
2DE2	0,00	0,00	0,08	0,01	0,0
2DE3	0,00	0,00	0,11	0,01	0,0
2DE4	2,45	0,28	17,10	1,29	0,2

2DE5	9,93	1,14	41,46	3,12	0,4
2DE6	0,16	0,02	0,39	0,03	0,6
DEF010	7,05	1,00	10,67	1,00	1,0
2AF1	32,18	3,69	26,57	2,00	1,8
2AF2	0,05	0,01	0,06	0,00	1,3
2AF3	0,09	0,01	0,03	0,00	4,6
2AF4	0,05	0,01	0,12	0,01	0,6
2AF5	34,58	3,97	25,43	1,91	2,1
2AF6	35,63	4,09	26,03	1,96	2,1
2DF1	36,86	4,23	32,10	2,41	1,8
2DF2	0,38	0,04	0,18	0,01	3,2
2DF3	42,00	4,82	26,11	1,96	2,5
2DF4	0,25	0,03	0,02	0,00	19,1
2DF5	36,14	4,14	23,51	1,77	2,3
2DF6	0,15	0,02	0,06	0,00	3,8
Clones sélectionnés par DFI					

Annexe 2

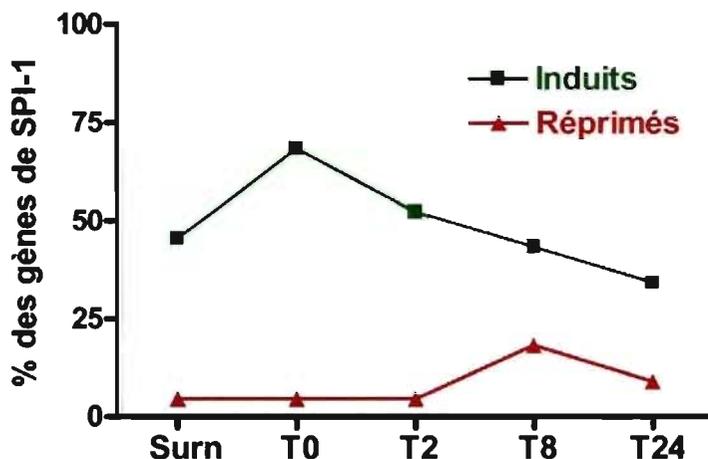
Tableau VIII : Ratio de fluorescence standardisé THP-1/RAW 264.7 des clones triés à 24 h post-infection

Clone (T-R-T)	% fluorescence dans les macrophages THP-1	% normalisé par rapport à DEF010	% fluorescence dans les macrophages THP-1	% normalisé par rapport à DEF010	Ratio THP-1 / RAW 264.7
DEF010	2,74	1,00	14,49	1,00	1,0
24AB1	1,75	0,52	3,61	0,25	2,1
24AB2	0,26	0,08	0,85	0,06	1,3
24AB3	14,83	4,40	4,22	0,29	15,2
24AB4	11,83	3,51	13,10	0,90	3,9
24AB5	0,81	0,24	2,42	0,17	1,5
24AB6	13,30	3,95	18,87	1,30	3,0
24DB1	1,71	0,51	2,99	0,21	2,5
24DB2	3,37	1,00	9,22	0,63	1,6
24DB3	2,37	0,70	5,45	0,37	1,9
24DB4	0,01	0,00	0,05	0,00	0,9
24DB5	1,09	0,32	2,60	0,18	1,8
24DB6	1,28	0,38	2,66	0,18	2,1
DEF010	4,66	1,00	13,55	1,00	1,0
24AD1	1,44	0,43	1,09	0,07	5,7
24AD2	6,22	1,85	4,12	0,28	6,5
24AD3	23,14	6,87	28,84	1,98	3,5

24AD4	6,13	1,82	3,69	0,25	7,2
24AD5	0,92	0,27	0,87	0,06	4,6
24AD6	0,54	0,16	0,64	0,04	3,6
24DD1	2,87	0,85	2,04	0,14	6,1
24DD2	20,68	6,14	24,05	1,65	3,7
24DD3	8,77	2,60	8,37	0,57	4,5
24DD4	24,59	7,30	30,34	2,08	3,5
24DD5	1,69	0,50	1,16	0,08	6,3
24DD6	0,72	0,21	0,66	0,05	4,7
DEF010	0,05	1,00	0,19	1,00	1,0
24AE1	2,90	0,86	2,77	0,19	4,5
24AE2	1,20	0,36	1,98	0,14	2,6
24AE3	7,56	2,24	3,45	0,24	9,5
24AE4	1,05	0,31	0,95	0,07	4,8
24AE5	0,95	0,28	3,54	0,24	1,2
24AE6	0,00	0,00	0,33	0,02	0,0
24DE1	0,00	0,00	0,31	0,02	0,0
24DE2	0,34	0,10	0,83	0,06	1,8
24DE3	0,58	0,17	0,48	0,03	5,2
24DE4	0,00	0,00	0,34	0,02	0,0
24DE5	15,04	4,46	9,65	0,66	6,7
24DE6	1,08	0,32	1,56	0,11	3,0
DEF010	2,71	1,00	15,63	1,00	1,0
24AF1	0,59	0,18	2,10	0,14	1,2
24AF2	0,05	0,01	0,81	0,06	0,3
24AF3	0,00	0,00	0,73	0,05	0,0
24AF4	0,15	0,04	0,76	0,05	0,9
24AF5	1,14	0,34	3,21	0,22	1,5
24AF6	0,14	0,04	1,06	0,07	0,6
24DF1	0,14	0,04	2,00	0,14	0,3
24DF2	10,89	3,23	11,82	0,81	4,0
24DF3	4,17	1,24	5,47	0,38	3,3
24DF4	0,94	0,28	1,83	0,13	2,2
24DF5	0,93	0,28	2,37	0,16	1,7
24DF6	0,10	0,03	0,36	0,02	1,2
Clones sélectionnés par DFI					

Annexe 3

Expression des gènes de SPI-1 par rapport au RPMI



Expression des gènes de SPI-1 par rapport au Surnageant

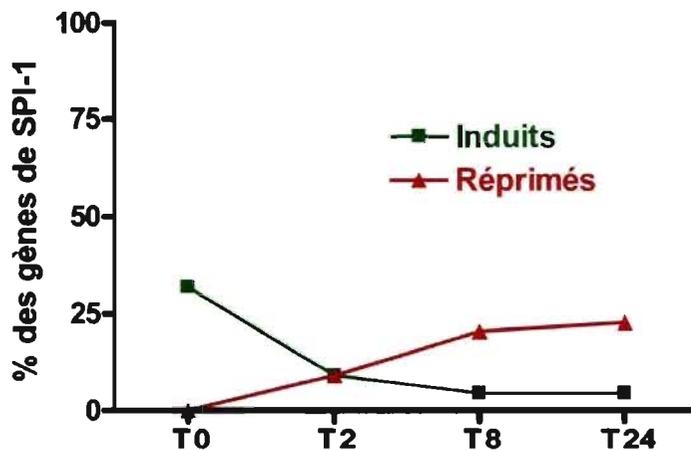


Figure 29 : Expression des gènes de SPI-1. **Haut** : Expression des gènes de SPI-1 lors d'une infection de macrophages humains THP-1 par rapport à leur expression lorsque Typhi a été cultivé dans le milieu de culture RPMI sans macrophages THP-1 (condition RPMI). **Bas** : Expression des gènes de SPI-1 lors d'une infection de macrophages humains THP-1 par rapport à leur expression lorsque Typhi a été cultivé dans le surnageant des macrophages THP-1 en culture (condition surnageant) (voir matériel et méthodes).

The presence of the *tet* gene from cloning vectors impairs *Salmonella* survival in macrophages

Stephanie Abromaitis ^{a,b}, Sébastien Faucher ^c, Maxime Béland ^c,
Roy Curtiss III ^a, France Daigle ^{a,c,*}

^a Washington University, USA

^b University of California-Berkeley, USA

^c Université de Montréal, Département de microbiologie et immunologie, CP 6128, succ. Centre-ville, Montréal, Qué., Canada H3C 3J7

Received 2 November 2004; accepted 9 November 2004

First published online 24 November 2004

Edited by P.H. Williams

Abstract

Cloning, mutagenesis and complementation of virulence factors are key steps to understand the mechanisms of bacterial pathogenesis and cloning vectors are routinely utilized for these processes. We have investigated the effect of the presence of commonly used cloning vectors on the survival of the intracellular bacterial pathogen *Salmonella* during macrophage infection. We demonstrate that the presence of the pSC101 derived tetracycline resistance gene on plasmids causes a lower survival rate of *Salmonella* in macrophages. The decrease in survival caused by the presence of the *tet* gene was not due to a higher susceptibility to gentamicin, a growth defect, or to increased sensitivity to acid. Higher susceptibility to hydrogen peroxide was observed in vitro for strain containing plasmid with the *tet* gene when the strains were grown at high densities but not when they were grown at low densities. Our findings demonstrate that the use of the *tet* gene for mutation or complementation can have deleterious effects and should thus be carefully considered.

© 2004 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Plasmid effect; Tetracycline; *Salmonella*; Survival; Pathogenesis

1. Introduction

Application of newly developed molecular techniques to microbial systems has brought our understanding of bacterial pathogenesis to new heights. The growing number of complete bacterial genome sequences available provides unique insights into bacterial virulence, and can serve as a guide for using mutagenesis and in vivo techniques to identify key virulence

genes. Virulence genes can be further characterized by other methods such as differential expression, either at the level of transcription (transcriptome) or at the level of protein expression (proteome). The information obtained from these approaches enables us to define an organism's virulome, which is the assembly of factors a pathogen requires for virulence. Characterization and understanding of a pathogen's virulome is key to develop new strategies for vaccination and novel antimicrobials.

As genomic information rapidly increases, the challenge remains to accurately understand how individual bacterial genes collaborate to cause infectious disease.

* Corresponding author. Tel.: +1 514 343 7396; fax: +1 514 343 5701.

E-mail address: [REDACTED]

Cloning vectors are widely utilized in the various steps of characterizing a gene (cloning, mutagenesis and complementation). Since plasmids have become frequently used genetic tools for cloning and expressing recombinant DNA, a growing number of reports showing the effects of plasmids on bacteria have been published [1–5]. It is well known that cloning vectors can lead to copy number artifacts by gene dosage effects. Moreover, the metabolic cost associated with the maintenance of plasmid functions can reduce bacterial fitness. A number of studies have shown that even in the absence of selection for plasmid-encoded functions, such as antibiotic resistance, plasmid carriage can reduce host fitness [6–10]. Thus plasmid maintenance, the vector itself without insert, can have pleiotropic effects on bacteria.

Cultured mammalian cells are commonly used to provide a controlled system for investigating mechanisms of bacterial adherence and invasion of host cells. *Salmonella enterica* is a pathogen that has been used extensively as a model organism for studying bacterial-host interactions [11]. *Salmonella* can colonize, invade and survive in its host while retaining plasmids. In this report, we have investigated the effect of commonly used cloning vectors on the survival of *Salmonella* during macrophage infection.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids are listed in Table 1. For macrophage infection, bacterial strains were routinely grown overnight in Luria–Bertani (LB) broth at 37 °C without shaking (standing) to an OD₆₀₀ of 0.6 ($\approx 3 \times 10^8$ ml⁻¹), or when indicated, bacterial strains were grown to log phase with aeration, to an OD₆₀₀ of 0.6. For bacterial growth measurement, overnight cultures were diluted 100-fold into fresh LB, complete cell culture medium RPMI (see below) or minimal M9 medium supplemented with 0.4% of either glucose or glycerol and amino acids (arginine at 22 µg ml⁻¹, cysteine at 22 µg ml⁻¹ and trypto-

phan at 20 µg ml⁻¹). At appropriate times, aliquots from the cultures were monitored for absorbance at 600 nm. Antibiotics when required were used at the following final concentrations: chloramphenicol (Cm) (30 µg ml⁻¹), kanamycin (Kan) (50 µg ml⁻¹), ampicillin (Ap) (50 µg ml⁻¹) and tetracycline (Tet) (10 µg ml⁻¹).

2.2. Cell culture and macrophage infection

The human monocyte cell line THP-1 (ATCC TIB-202) was maintained in RPMI 1640 (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (FCS), 25 mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, pH 7) (Sigma), 2 mM L-glutamine, 1% MEM (modified Eagle's medium) non-essential amino acids (Sigma) and 1 mM of sodium pyruvate (Sigma). A stock culture of these cells was maintained as monocyte-like, non-adherent cells at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. Before infection, THP-1 cells were differentiated by addition of 10⁻⁷ M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 24–48 h. Cells of the murine macrophage-like cell line RAW264.7 [12] were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% FCS, 25 mM HEPES and 2 mM glutamine at 37 °C in a 5% CO₂ environment. For macrophage infection assays, cells were seeded at 5 × 10⁵ cells per well in 24-well tissue culture dishes. Bacteria were added to the cell monolayer at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 10:1, which does not affect cell viability (data not shown) and centrifuged for 5 min at 800g to synchronize phagocytosis. After incubation for 20 min at 37 °C (T₀), the infected cells were washed three times with prewarmed PBS and incubated with supplemented media as above containing 100 µg ml⁻¹ of gentamicin or polymyxin when indicated, to kill extracellular bacteria. The infected monolayers were either lysed from the tissue culture dishes by addition of 1 ml 0.1% sodium deoxycholate (DOC) in PBS per well or further incubated for 24 h with 12 µg ml⁻¹ of gentamicin. After lysis the number of surviving bacteria was determined as colony forming units (CFU) by plating on LB agar and, when necessary, on LB agar containing appropriate

Table 1
Bacterial strains and plasmids

Strain	Description	Origin of replication	Antibiotic resistance	Reference or source
χ3744	<i>S. typhi</i> ISP1820			D.M. Hone
<i>Plasmids</i>				
pACYC177	Cloning vector	p15A	Ap, Kan	[18]
pACYC184	Cloning vector	p15A	Cm, Tet	[18]
pBeloBAC11	Bacterial artificial chromosome vector	oriS	Cm	[42]
pBR322	Cloning vector	pMB1	Ap, Tet	[17]
pWSK29	Cloning vector	pSC101	Ap	[43]
pSC101	Cloning vector	pSC101	Tet	[19]
pSIF009	pACYC184 Δ <i>tet</i>	p15A	Cm	This work
pSIF010	pACYC177::i <i>tet</i>	p15A	Kan, Tet	This work

antibiotics. All assays were conducted in duplicate and repeated independently at least three times. Results are expressed as the mean \pm standard error of the replicate experiments. Percent phagocytosis was calculated by (CFU released by 0.1% DOC at T_0 /CFU in the initial inoculum of bacteria added to each well) \times 100. The survival rate corresponds to (CFU released by 0.1% DOC at T_{24} /CFU released by 0.1% DOC at T_0) \times 100.

2.3. Molecular biology methods

Transformation: Electroporation was performed using a MicroPulser Electroporator (BioRad) following the parameters suggested by the manufacturer. Competent cells were prepared as described previously for *S. enterica* [13].

Deletion of the tet gene: The *tet* gene from plasmid pACYC184 was deleted by enzymatic restriction using the *AvaI* and *ClaI* sites. A fill-in reaction was done and the 2.8 kb vector was designated pSIF009 (pACYC184 Δ *tet*). pSIF009 transformed into *Salmonella* was used in macrophage infection assays.

Cloning of the tet gene: The *tet* gene was amplified by PCR from plasmid pACYC184 with primers tetF 5'-TGTAGCACCTGAAGTCAGCC-3' and tetR 5'-GGAGTGGTGAATCCGTTAGC-3' using Vent polymerase (New England Biolabs). The 1358 pb *tet* amplicon was cloned into the *HincII* site of pACYC177 to generate the plasmid pSIF010 (pACYC177::*tet*).

2.4. Gentamicin sensitivity assay

The susceptibility to the aminoglycoside antibiotic gentamicin was determined by minimal inhibitory concentration (MIC) assay. Strains were grown overnight and cultures were diluted in fresh LB medium to obtain 10^6 CFU ml⁻¹. Microwell plates were loaded with the 10^6 CFU ml⁻¹ cultures and different concentrations of gentamicin ranging from 150 to 50 μ g ml⁻¹ were added to each well. Plates were incubated overnight and wells were evaluated for growth by spectrophotometry (OD₆₃₀). The MIC was considered the lowest drug concentration that reduced growth by more than 50% compared with growth in the control well.

2.5. Acid tolerance response

The acid tolerance response (ATR) response was determined by using a method based on that of Foster and Hall [14]. Briefly, overnight grown cultures were used to inoculate (1/100) fresh LB medium (pH 7.3) in duplicates and grown until OD₆₀₀ was 0.2. The pH in one flask was then quickly adjusted to pH 5.5 with 1 N HCl for adaptation and culture were grown until OD₆₀₀ was 0.4. At this stage the pH was adjusted to 3.3. Aliquots were withdrawn immediately (T_0) and then

at 1 h intervals for 4 h (T_1 – T_4). The number of resistant bacteria was determined as colony forming units (CFU) by plating on LB agar and, when necessary, on LB agar containing appropriate antibiotics.

2.6. Hydrogen peroxide sensitivity assay

The assay was performed as described by Boyer et al. [15]. Briefly, overnight grown cultures were used to inoculate (1/100) fresh LB medium without antibiotics, and the resulting cultures were incubated until the OD₆₀₀ was 0.5. A 100 μ l volume of each culture was mixed with 3 ml of molten top agar and poured onto an LB agar plate. A 7 mm-diameter Whatman filter disk impregnated with 10 μ l of 30.4% hydrogen peroxide (H₂O₂) was placed in the center of the plate before incubation for 17 h at 37 °C. Alternatively, 400 mM H₂O₂ was added to overnight grown bacteria diluted to 10^7 cells ml⁻¹ in PBS. Aliquots of bacteria were removed at timed intervals, diluted, and plated onto LB agar with or without antibiotics for quantisation of viable cells [16]. The assay was also performed using a lower bacterial density (5×10^5 cells ml⁻¹).

3. Results

3.1. Effect of commonly used plasmid vectors

We have investigated the effect of commonly used cloning vectors on the survival of *S. enterica* serovar *typhi* (*S. typhi*) following macrophage infection. Plasmids pACYC184, pACYC177, pWSK29, pBR322, pSC101 or pBeloBAC11 were introduced into *S. typhi* strain χ 3744 by electroporation. These plasmids carried genes encoding resistance to different antibiotics (ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, and tetracycline) and different origins of replication (p15A, pSC101, pMB1, OriS) (Table 1). Survival of *Salmonella* carrying either plasmid pACYC177, pWSK29 or pBeloBAC11 was similar to the bacteria without plasmid 24 h post-infection (Fig. 1). There was however, a significant ($p < 0.05$) decrease in survival of intracellular bacteria containing either plasmid pACYC184, pBR322 or pSC101 (Fig. 1). This decrease in bacterial survival rate was also observed when the murine macrophage cell line RAW267.4 was used (data not shown). A similar effect on bacterial survival rate was seen when *S. enterica* serovar *typhimurium* strain SR11 was used as the bacterial host for carrying these plasmids (data not shown). Decreased survival of bacteria in macrophages occurred when bacteria were grown either overnight standing (conditions that induce the *Salmonella* pathogenicity island I, encoding a locus for invasion), or grown to log phase with aeration (data not shown). All plasmids were stable during infection assays as determined by plating

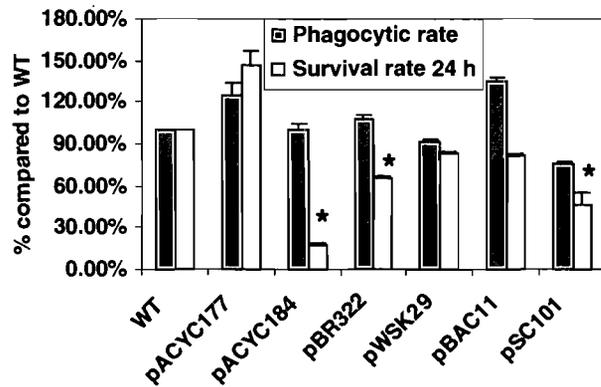


Fig. 1. Survival assays. Comparison of the abilities of the wild-type ISP1820 with or without plasmid to survive within THP-1 macrophage-like cells. For each strain at each time point, the number of bacteria recovered was expressed as a percentage of the number that were present in the inoculum. The values for percent recovery were normalized relative to that of the wild-type control (plasmid-free), which was designated 100% at each time point. The results represent an average of at least three distinct trials done in duplicate. Standard error bars are indicated. Strains carrying plasmid that demonstrated significant ($p < 0.05$) difference to the plasmid-free strain are indicated (*).

the bacteria following macrophage lysis on media with and without antibiotic selection (data not shown).

3.2. Effect of the tetracycline gene during macrophage infection

Plasmids pSC101, pACYC184 and pBR322 differ in copy number and belong to different incompatibility groups (Table 1). These plasmids all contain the tetracycline resistance gene of pSC101 [17–19]. In order to determine if the tetracycline resistance gene was responsible for the lower survival rate observed in bacterial cells carrying pACYC184, we performed macrophage interaction assays with *S. typhi* carrying a plasmid derived from pACYC184 but lacking the *tet* gene (pSIF009). The strain carrying pSIF009 (pACYC184 Δtet) demonstrated a significant increase ($p < 0.05$) in survival rate compared to the strain carrying pACYC184, and the survival rate was similar to the plasmid-free wild-type strain. The intracellular survival rate of the strain carrying pSIF009 was also similar to survival of *S. typhi* containing the cloning vector pACYC177, which has the same origin of replication of pACYC184 (p15A origin) (Fig. 2). Plasmid pACYC177 was used to determine if the *tet* gene was responsible for the reduced survival rate of *S. typhi* cells carrying pACYC184 in macrophages. We cloned the *tet* gene into pACYC177 to obtain pSIF010 (pACYC177::*tet*). The survival rate of the bacteria harboring pSIF010 (pACYC177::*tet*) was significantly diminished ($p < 0.05$) as compared to those carrying pACYC177 or the plasmid-free strain (Fig. 2).

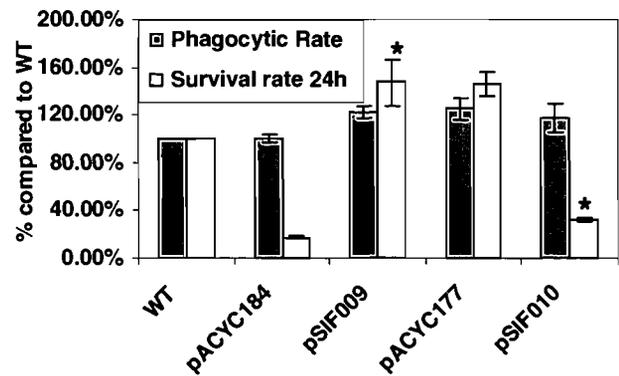


Fig. 2. Role of the *tet* gene during macrophage infection. Comparison of the abilities of bacteria carrying plasmid with or without the *tet* gene to survive within THP-1 macrophage-like cells. The results represent an average of at least three distinct trials done in duplicate. Standard error bars are indicated. Bacteria carrying plasmid that demonstrated a significant difference ($p < 0.05$) to the plasmid-free strain are indicated (*).

3.3. Growth profile

The growth rate of *S. typhi* cells carrying either plasmid pACYC177 or pACYC184, with or without the *tet* gene, was measured. In LB medium, the bacterial cells showed similar growth phenotypes. However, carriage of plasmid pACYC184 (with or without the *tet* gene) caused an initial lag in bacterial growth, by late log phase the defect was overcome and growth was equal to that of plasmid-free bacteria (Fig. 3). This phenotype was observed in presence or absence of selective pressure in the medium, and the same results were obtained when bacteria were grown in tissue culture medium (RPMI) or in minimal M9 medium supplemented with glucose or glycerol as carbon source.

3.4. In vitro stresses

Gentamicin is an aminoglycoside antibiotic that cannot effectively enter eukaryotic cells and it is commonly used during infection of macrophages to kill extracellu-

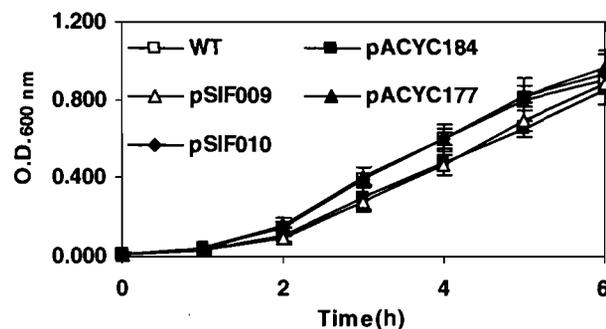


Fig. 3. Growth profile of strains carrying plasmid with or without the *tet* gene cultured in LB broth.

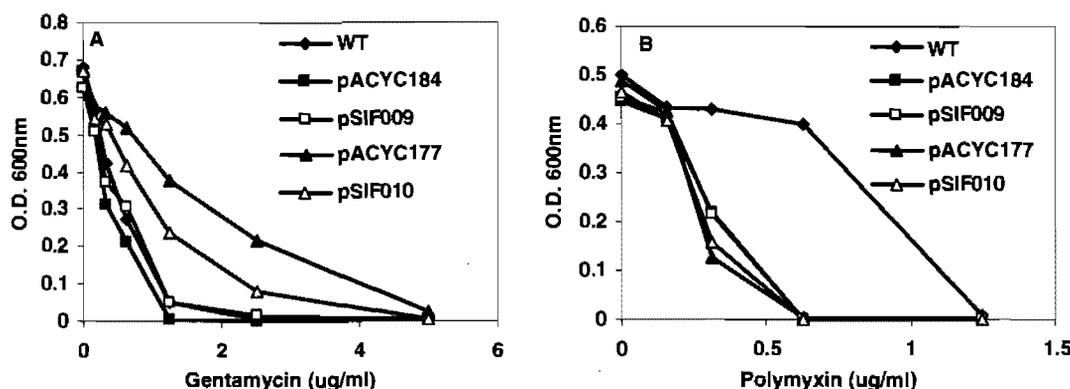


Fig. 4. Antibiotic susceptibility. Minimal inhibitory concentration (MIC) of (A) gentamicin or (B) polymyxin for strain carrying plasmid with or without the *tet* gene. The MIC for gentamicin of the strains carrying plasmid with the *tet* gene is significantly lower than the MIC of the strain carrying plasmid without the *tet* gene ($p < 0.05$).

lar bacteria. The TetA protein confers increased susceptibility to aminoglycoside antibiotics [20] making it necessary to test the susceptibility of the strains used in our study to gentamicin. Strains carrying plasmids containing the *tet* gene were more susceptible to killing by gentamicin than the strains carrying plasmid without *tet*. The MIC of the strains carrying plasmids containing *tet* was 2-fold lower than the strain carrying a plasmid without the *tet* gene ($p < 0.05$) (Fig. 4(A)). The MIC for wild-type strain was $0.625 \mu\text{g ml}^{-1}$. The MIC for strain carrying pACYC184 was $0.312 \mu\text{g ml}^{-1}$ compared to $0.625 \mu\text{g ml}^{-1}$ for the strain carrying pACYC184 without *tet* (pSIF009). The MIC for strain carrying the plasmid pACYC177 with *tet* (pSIF010) was $1.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ compared to $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ for strain carrying pACYC177. The strains carrying plasmid pACYC177, with or without the *tet* gene, were more resistant to gentamicin than the wild-type strain or the other plasmid-bearing strains tested. Interestingly, during infection, the strain carrying the plasmid pACYC177 with the *tet* gene (pSIF010) had a significantly lower survival rate than the wild-type strain or strains carrying plasmid without the *tet* gene (Fig. 2). Thus, the lower level of survival in macrophages seen for strains containing the *tet* gene is not a result of increased susceptibility to gentamicin. Polymyxin B is another antibiotic that can be used to determine internalization and survival of intracellular bacteria. To further investigate the effect of the *tet* gene on survival of *S. typhi* in macrophages, we used polymyxin instead of gentamicin. The MIC to polymyxin of the all strains carrying plasmid, with or without the *tet* gene, was $0.312 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 4(B)). For the wild-type strain the MIC to polymyxin was $1.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 4(B)). When polymyxin was used to kill extracellular bacteria during infection of macrophages, a decrease in survival of intracellular bacteria containing plasmid with the *tet* gene similar to that seen when gentamicin was used was observed (Fig. 5).

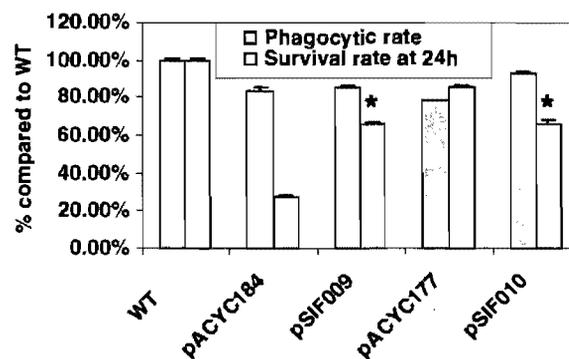


Fig. 5. Survival assays using polymyxin. Comparison of the abilities of wild-type strain ISP1820 with or without plasmid to survive within THP-1 macrophage-like cells. See Fig. 1 legend. Strains carrying plasmid that demonstrated significant ($p < 0.05$) difference to the plasmid-free strain are indicated (*).

ATR and resistance to H_2O_2 of plasmid-bearing strains (with or without *tet*) was tested to determine if such harsh physical conditions, which are produced within phagocytes, were responsible for the observed decrease of *Salmonella* survival. ATR was inducible and the level of acid resistant bacteria was similar in plasmid-free strains or strains bearing plasmids with or without the *tet* gene. All the strains demonstrated survival levels of 40% after 4 h of acid shock. For all strains an inhibition zone to hydrogen peroxide of approximately 38 mm was measured. Sensitivity to H_2O_2 was also assessed by adding 400 mM H_2O_2 directly to overnight grown bacteria diluted to $10^7 \text{ cell ml}^{-1}$. Strains carrying plasmids containing the *tet* gene were significantly ($p < 0.05$) more susceptible to H_2O_2 at 3 and 4 h after exposure than the wild-type strain or strains carrying plasmid without *tet* (Fig. 6). When a lower bacterial density of $5 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$ in stationary phase, which may be more similar to bacterial densities during infection of macrophages, was used no difference was

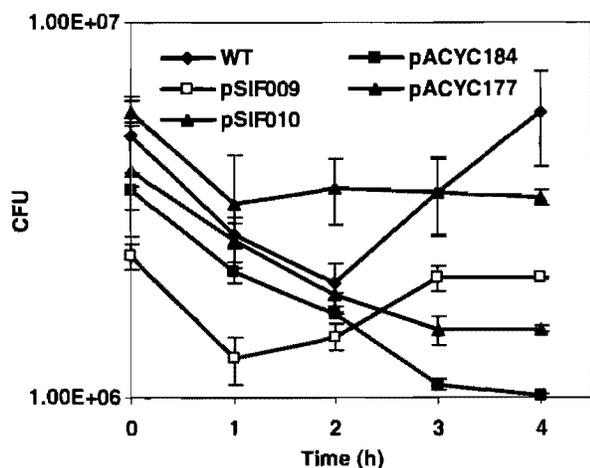


Fig. 6. Hydrogen peroxide sensitivity assay for strains cultured overnight carrying plasmids with or without the *tet* gene in presence of 400 μ M of H_2O_2 .

observed in susceptibility to H_2O_2 between the strains carrying the vector with or without the *tet* gene after 4 h of peroxide exposure (data not shown).

4. Discussion

Even in the post-genomic era, many genes still have unknown functions. Molecular genetics, including cloning mutagenesis and complementation, are necessary approaches to determine the role and function of genes. Cloning vectors such as pBR322 [17], pACYC184 [18] and pACYC177 [18] are useful not only in molecular genetic studies but also in biotechnology. The expression or inactivation of antibiotic resistance genes facilitates selection and counterselection of plasmid-containing bacteria carrying foreign DNA inserts.

In order to assign a function to a gene, the gene must be knocked out and then reintroduced to demonstrate that it is able to restore or complement a wild-type phenotype to the mutant. While complementing a mutant using plasmid pACYC184, we also cloned the empty vector into the wild-type strain as a control and found that the carriage of the vector itself affects the survival of *Salmonella* in macrophages. We then investigated the effect of different commonly used plasmid vectors on survival of *Salmonella* in macrophages. At 24 h post-infection, there was a significant 80% decrease in survival of intracellular bacteria containing plasmids pSC101 and pACYC184 as compared to plasmid-free bacteria. A similar reduction in the survival rate was also observed with bacteria bearing vector pBR322. The tetracycline resistance gene is a genetic element common to these vectors.

Tetracycline resistance is mediated by at least 30 distinct systems in different bacteria, [21] and four classes

of plasmid-encoded *tet* genes (A, B, C, and D) have been described in Gram-negative bacteria [22]. These four classes encode related inner membrane Tet proteins that are distinguished by differences in amino acid sequences and the relative levels of resistance to tetracycline they confer [23]. The most studied of the four classes are the two inducible tetracycline resistance systems (i) *tetAR* (class B) encoded on transposon Tn10 [24,25], and (ii) the *tet* gene from the low copy plasmid pSC101 (class C). Plasmids pACYC184 and pBR322 as well as other higher copy cloning vectors contain the *tet* gene from pSC101 [26]. Both native tetracycline resistance systems from Tn10 and pSC101 only produce the tetracycline resistance proteins following induction by the presence of tetracycline [24–26]. However, the *tet* gene from pSC101 cloned into pBR322 and pACYC184 is constitutively expressed due to the absence of a repressor protein and/or a higher copy number of the *tet* gene [26,27]. *S. typhi* carrying pACYC184, pBR322, or pSC101 had decreased survival as compared to plasmid free *S. typhi* and *S. typhi* harboring plasmid pACYC177, pWSK29, or pBeloBAC11 (Fig. 1). pSC101 is a lower copy number plasmid than pACYC184 and pBR322, thus the fact that all three plasmids had a similar effect on bacterial survival in macrophages means that we can discard the hypothesis of the copy number or increased expression of the *tet* gene being responsible for the phenotype we observed.

In addition to tetracycline efflux, it was demonstrated that expression of the *tet* gene causes several pleiotropic effects. The TetA protein confers increased susceptibility to specific aminoglycoside antibiotics [20], heavy metals [28], and specific organic acids [29,30]. Further, TetA complements certain defects in potassium uptake [31] and increases the supercoiling of plasmid DNA harboring the *tet* gene [32]. In addition, overexpression of the *tet* gene has been shown to reduce cell viability [23–34]. This reduction in cell viability is gene dosage-dependent, and is exacerbated by increased expression of the *tet* gene [33]. The physiological basis of the pleiotropic effects of *tet* is not known. It is reasonable to assume that these effects are a direct consequence of the structural features of the Tet protein, and that the binding of additional Tet proteins to the inner membrane may interfere with some vital bacterial function.

As expected, strains carrying plasmid with the *tet* gene were more susceptible to gentamicin, as demonstrated by a lower MIC. Gentamicin is an aminoglycoside that is poorly interanalysed by eukaryotic cells, therefore the antibiotic selectively kills extracellular bacteria without affecting bacteria within host cells [35]. However, some reports have indicated that gentamicin enters macrophages and kills intracellular bacteria [36]. Thus, the decrease in survival of intracellular bacteria containing plasmid with the *tet* gene could be because of the entrance of gentamicin inside macrophages. In our study

this possibility was ruled out by using the antibiotic polymyxin B to kill extracellular bacteria during infection of macrophages. When polymyxin was used the decrease in survival rate observed in strains carrying plasmid with the *tet* gene was still observed and all the strains, with or without the *tet* gene, demonstrated a similar MIC to polymyxin.

In our hands, growth profiles of bacteria with or without plasmid in LB broth were similar, however a consistent growth defect for *Salmonella* strains bearing plasmids pACYC184 (with or without the *tet* gene) was observed. This growth defect was most likely due to a portion of the plasmid other than the *tet* gene as removal of the gene did not lead to wild-type growth, and addition of the *tet* gene to plasmid pACYC177 did not result in a growth defect. We have tested in vitro stresses that can mimic the macrophage environment such as acidity and the presence of hydrogen peroxide. Resistance to acid was similar in the plasmid-free strain or strains bearing plasmids with or without the *tet* gene. A difference in susceptibility to H₂O₂ was observed between strains carrying plasmids with the *tet* gene and the wild-type strain or strains carrying plasmids without the *tet* gene at bacterial densities of 1×10^7 cells ml⁻¹ but not at lower densities that correlated to the bacterial density during infection. The increased susceptibility to H₂O₂ seen at high bacterial densities could represent a pleiotropic effect of the *tet* gene. The THP-1 macrophages has a basal level production of H₂O₂ that is approximately 25 picomol 10⁶ cells [37]. However, the correlation between the increased in sensitivity to H₂O₂ and the lower survival of bacteria within macrophages needed to be further investigated.

Diaz-Ricci et al. [5] have demonstrated that plasmid maintenance enhances gene expression, independently of the host, type and number of plasmids, including pACYC184 and pBR322. An increase of intracellular cyclic AMP in cells carrying plasmids was observed and higher β -galactosidase activity was measured. They ruled out any antibiotic-mediated gene expression enhancement by control experiments in which different antibiotics were used. They determined that the effect was due to plasmid maintenance and that antibiotics have no significant influence on gene expression. In our model, the mammalian host cell and culture medium lack the selective pressure(s) for plasmid encoded resistance genes, demonstrating that it was the presence of the *tet* gene in the plasmid and not exogenous antibiotics that caused the observed defect in bacterial survival rates.

Multicopy plasmids have greatly helped gene structure–function studies. However, the use of such plasmids can lead to copy number artifacts. Furthermore, as demonstrated in our current study, the presence of the tetracycline resistance gene should also be considered. The re-introduction of the mutated gene at wild-type levels would be the ideal solution for gene

complementation. Several methods have been developed to insert a stable copy of a gene onto bacterial chromosomes allowing for the study of their function in single copies without the need for antibiotic resistance markers [38–41]. This can be applicable for complementation, where a single copy of the mutated gene can be stably inserted into the chromosome of the mutated strain. Thus pleiotropic effects from plasmid maintenance genes can be avoided in this system and the use of selective agents, such as antibiotics, is no longer necessary. Use of the tetracycline resistance gene for mutation or complementation should be carefully considered in light of our finding that the presence of the gene can effect bacterial survival and thus bias results.

Acknowledgements

We thank Charles M. Dozois for critical reading of this manuscript. This work was supported by National Institutes of Health grants AI24533 (to R.C. III) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant 251114-02 (to F.D.).

References

- [1] Bailey, J.E., Da Silva, N.A., Peretti, S.W., Seo, J.H. and Srienc, F. (1986) Studies of host–plasmid interactions in recombinant microorganisms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 469, 194–211.
- [2] Birnbaum, S. and Bailey, J.E. (1991) Plasmid presence changes the relative levels of many host cell proteins and ribosome components in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 736–745.
- [3] Brownlie, L., Stephenson, J.R. and Cole, J.A. (1990) Effect of growth rate on plasmid maintenance by *Escherichia coli* HB101(pAT153). *J. Gen. Microbiol.* 136, 2471–2480.
- [4] Mason, C.A. and Bailey, J.E. (1989) Effect of plasmid presence on growth and enzyme activity of *Escherichia coli* DH5a. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 54–60.
- [5] Diaz-Ricci, J.C., Bode, J., Rhee, J.I. and Schugerl, K. (1995) Gene expression enhancement due to plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* 177, 6684–6687.
- [6] Lenski, R.E. and Bouma, J.E. (1987) Effects of segregation and selection on instability of plasmid pACYC184 in *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* 169, 5314–5316.
- [7] Godwin, D. and Slater, J.H. (1979) The influence of the growth environment on the stability of a drug resistance plasmid in *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* 111, 201–210.
- [8] Helling, R.B., Kinney, T. and Adams, J. (1981) The maintenance of plasmid-containing organisms in populations of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 123, 129–141.
- [9] Noack, D., Roth, M., Geuther, R., Muller, G., Undisz, K., Hoffmeier, C. and Gaspar, S. (1981) Maintenance and genetic stability of vector plasmids pBR322 and pBR325 in *Escherichia coli* K12 strains grown in a chemostat. *Mol. Gen. Genet.* 184, 121–124.
- [10] Jones, I.M., Primrose, S.B., Robinson, A. and Ellwood, D.C. (1980) Maintenance of some ColE1-type plasmids in chemostat culture. *Mol. Gen. Genet.* 180, 579–584.

- [11] Finlay, B.B. and Brumell, J.H. (2000) *Salmonella* interactions with host cells: in vitro to in vivo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 623–631.
- [12] Ralph, P. and Nakoinz, I. (1977) Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J. Immunol.* 119, 950–954.
- [13] O'Callaghan, D. and Charbit, A. (1990) High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* 223, 156–158.
- [14] Foster, J.W. and Hall, H.K. (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172, 771–778.
- [15] Boyer, E., Bergevin, I., Malo, D., Gros, P. and Cellier, M.F. (2002) Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 70, 6032–6042.
- [16] Buchmeier, N.A., Libby, S.J., Xu, Y., Loewen, P.C., Switala, J., Guiney, D.G. and Fang, F.C. (1995) DNA repair is more important than catalase for *Salmonella* virulence in mice. *J. Clin. Invest.* 95, 1047–1053.
- [17] Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. and Boyer, H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95–113.
- [18] Chang, A.C. and Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134, 1141–1156.
- [19] Chang, A.C. and Cohen, S.N. (1974) Genome construction between bacterial species in vitro: replication and expression of *Staphylococcus* plasmid genes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1030–1034.
- [20] Griffith, J.K., Kogoma, T., Corvo, D.L., Anderson, W.L. and Kazim, A.L. (1988) An N-terminal domain of the tetracycline resistance protein increases susceptibility to aminoglycosides and complements potassium uptake defects in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 598–604.
- [21] Levy, S.B., McMurry, L.M., Barbosa, T.M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M.C., Rood, J.I. and Taylor, D.E. (1999) Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1523–1524.
- [22] McMurry, L., Petrucci Jr., R.E. and Levy, S.B. (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3974–3977.
- [23] Levy, S. (1984) Resistance of the tetracyclines In: *Antimicrobial Drug Resistance* (Bryan, L., Ed.), pp. 191–240. Academic Press Inc, New York.
- [24] Daniels, D.W. and Bertrand, K.P. (1985) Promoter mutations affecting divergent transcription in the Tn10 tetracycline resistance determinant. *J. Mol. Biol.* 184, 599–610.
- [25] Kleckner, N. (1989) Transposon Tn10 In: *Mobile DNA* (Berg, D.E. and Howe, M.M., Eds.), pp. 227–268. ASM Press, Washington DC.
- [26] Backman, K. and Boyer, H.W. (1983) Tetracycline resistance determined by pBR322 is mediated by one polypeptide. *Gene* 26, 197–203.
- [27] Lenski, R.E., Simpson, S.C. and Nguyen, T.T. (1994) Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness. *J. Bacteriol.* 176, 3140–3147.
- [28] Griffith, J.K., Buckingham, J.M., Hanners, J.L., Hildebrand, C.E. and Walters, R.A. (1982) Plasmid-conferred tetracycline resistance confers collateral cadmium sensitivity of *E. coli* cells. *Plasmid* 8, 86–88.
- [29] Bochner, B.R., Huang, H.C., Schieven, G.L. and Ames, B.N. (1980) Positive selection for loss of tetracycline resistance. *J. Bacteriol.* 143, 926–933.
- [30] Herrin Jr., G.L., Russell, D.R. and Bennett, G.N. (1982) A stable derivative of pBR322 conferring increased tetracycline resistance and increased sensitivity to fusaric acid. *Plasmid* 7, 290–293.
- [31] Dosch, D.C., Salvacion, F.F. and Epstein, W. (1984) Tetracycline resistance element of pBR322 mediates potassium transport. *J. Bacteriol.* 160, 1188–1190.
- [32] Lodge, J.K., Kazic, T. and Berg, D.E. (1989) Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J. Bacteriol.* 171, 2181–2187.
- [33] Valenzuela, M.S., Ikpeazu, E.V. and Siddiqui, K.A. (1996) *E. coli* growth inhibition by a high copy number derivative of plasmid pBR322. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 876–883.
- [34] Eckert, B. and Beck, C.F. (1989) Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *J. Bacteriol.* 171, 3557–3559.
- [35] Vaudaux, P. and Waldvogel, F.A. (1979) Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 743–749.
- [36] Drevets, D.A., Canono, B.P., Leenen, P.J. and Campbell, P.A. (1994) Gentamicin kills intracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 62, 2222–2228.
- [37] Mouthys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G., Nys, M., Lamy, M. and Deby, C. (2001) Oxidative processes in human promonocytic cells (THP-1) after differentiation into macrophages by incubation with *Chlamydia pneumoniae* extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 781–788.
- [38] Boyd, D., Weiss, D.S., Chen, J.C. and Beckwith, J. (2000) Towards single-copy gene expression systems making gene cloning physiologically relevant: lambda InCh, a simple *Escherichia coli* plasmid-chromosome shuttle system. *J. Bacteriol.* 182, 842–847.
- [39] Huang, L.C., Wood, E.A. and Cox, M.M. (1997) Convenient and reversible site-specific targeting of exogenous DNA into a bacterial chromosome by use of the FLP recombinase: the FLIRT system. *J. Bacteriol.* 179, 6076–6083.
- [40] Martinez-Morales, F., Borges, A.C., Martinez, A., Shanmugam, K.T. and Ingram, L.O. (1999) Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons used during construction. *J. Bacteriol.* 181, 7143–7148.
- [41] Haldimann, A. and Wanner, B.L. (2001) Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure–function studies of bacteria. *J. Bacteriol.* 183, 6384–6393.
- [42] Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. and Simon, M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8794–8797.
- [43] Wang, R.F. and Kushner, S.R. (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100, 195–199.