

Centre Armand Frappier Santé Biotechnologies

RÔLE DU PETIT ARN RÉGULATEUR RYFA POUR LA SURVIE DE *SALMONELLA ENTERICA* DANS LES PHAGOCYTES ET LA VIRULENCE CHEZ LA VOLAILLE

Par
Tessier, Alexandra

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Dr Jonathan Perreault
INRS-Armand Frappier

Examineur externe

Dr Sébastien Faucher
Université McGill

Directeur de recherche

Dr Charles M Dozois
INRS- Armand Frappier

Codirecteur de recherche

Dre France Daigle
Université de Montréal

REMERCIEMENTS

D'abord j'aimerais remercier mon directeur de maîtrise Charles Dozois pour ses conseils et sa disponibilité. J'aimerais aussi remercier Sébastien Houle pour son assistance dans tous les aspects de ma maîtrise. Merci Carole, Hossein, Fariba, Sabin, Privil et Hicham. J'ai adoré travailler à vos côtés durant 2 ans. Je n'aurais pas pu avoir de meilleurs collègues.

Merci à ma codirectrice France pour son aide dans certaines étapes cruciales de mon projet. Merci aux examinateurs Jonathan Perreault et Sébastien Faucher d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie aussi le CRSNG d'avoir financé mes recherches, ainsi que la fondation Armand-Frappier et le CRIPA.

Je tiens à remercier aussi mes parents France et Daniel, ma sœur Arielle et mon chum Vincent pour leur appui dans tous les hauts et les bas des études supérieures. Cette maîtrise n'aurait pas été possible sans vous.

RÉSUMÉ

Escherichia coli et *Salmonella enterica* sont deux entérobactéries assez proches phylogénétiquement. Cependant, chez la volaille, les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) causent la colibacillose, une infection respiratoire pouvant progresser à une infection systémique. *S. enterica* colonise plutôt l'intestin, souvent de façon asymptomatique pour l'animal et pose un risque d'infection alimentaire. L'expression de certains gènes de ces deux bactéries est régulée par des petits ARN régulateurs. Chez les *E. coli* uropathogènes, il est connu que le petit ARN *ryfA* est important pour la virulence. Ce petit ARN est aussi présent chez *S. enterica* et chez les APEC. Le but de cette maîtrise était de voir l'effet de *ryfA* sur la virulence de *S. enterica* en caractérisant les interactions avec les phagocytes et puis, en observant avec des infections chez la volaille si la virulence et la capacité de colonisation sont diminuées chez les mutants. Nous nous attendions à voir certaines différences après la délétion du petit ARN et pas nécessairement les mêmes que chez les UPEC. Nous avons constaté que quand le petit ARN est muté, la motilité augmente chez *Salmonella*. Également, la bactérie est moins résistante au stress oxydatif. Quand *ryfA* est muté chez *Salmonella* UK-1, moins de bactéries sont associées aux fibroblastes de poulet CEC-32 et elles survivent moins dans la lignée de macrophages humains THP-1. Mes données suggèrent que le petit ARN joue un rôle important chez *Salmonella*. D'autres expériences restent encore à faire pour conclure sur l'effet de *ryfA* sur la virulence de *Salmonella* et des APEC chez la volaille.

Mots-clés : *Salmonella* Typhimurium; APEC; volaille; petits ARN régulateurs; phagocytes; virulence

ABSTRACT

Escherichia coli and *Salmonella enterica* are two Enterobacteriaceae phylogenetically close. In poultry, the avian pathogenic *E. coli* (APEC) cause colibacillosis, a respiratory infection that can lead to systemic infection. *S. enterica* is an intestinal infection, frequently asymptomatic in chickens but poses a food contamination problem. Both bacteria have small regulating RNAs that control the expression of some genes. In uropathogenic *E. coli*, it is known that a small RNA *ryfA* is important for virulence. *RyfA* is also found in *S. enterica* and APEC. We wanted to characterised the effect of this small RNA on *S. enterica*'s virulence and expected to find some effects, not necessarily the same found in UPEC. We looked at interactions with phagocytes and infections in young chicks to assess the impact of *RyfA*. We found that when the small RNA is deleted, motility increased in *Salmonella*. The bacteria were also more sensitive to oxidative stress. In *Salmonella* UK-1, the mutant bacteria were associating less with chicken fibroblast CEC-32 and less fit to survive in human macrophages THP-1. More experiments need to be done to conclude on the effect of *RyfA* on the virulence of *Salmonella* and APEC.

Keywords : *Salmonella* Typhimurium; APEC; poultry; small regulatory RNA; phagocytes; virulence

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
1 INTRODUCTION	1
1.1 Les facteurs de virulence	4
1.1.1 Les adhésines	4
1.1.2 Les systèmes de sécrétion	5
1.1.3 La motilité	6
1.1.4 L'invasion et la survie dans les macrophages	6
1.1.5 Les sidérophores	7
1.1.6 Les biofilms	8
1.2 Réponse au stress	8
1.2.1 Stress oxydatif	8
1.2.2 Choc thermique	9
1.3 La régulation génique	9
1.3.1 Les facteurs sigma et les anti-sigma	10
1.3.2 Système à deux composantes	10
1.3.3 Les petits ARN régulateurs	11
1.4 Le petit ARN RyfA	12
1.5 Question et objectifs	13
1.5.1 Hypothèse	14
2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	15

2.1	Les souches, les plasmides et les conditions de croissance	15
2.2	Construction des mutants	16
2.3	Motilité	17
2.4	Résistance au stress oxydatif	17
2.5	Résistance au stress osmotique	18
2.6	Agglutination des levures	18
2.7	Biofilms	18
2.8	Adhérence	18
2.9	Survie dans les macrophages	19
2.10	Infections des jeunes poussins	19
2.11	Tests statistiques	20
3	RÉSULTATS	21
3.1	Motilité	21
3.2	Résistance au stress oxydatif	21
3.3	Résistance au stress osmotique	22
3.4	Biofilm	23
3.5	Agglutination de levures	24
3.5	Adhésion	25
3.6	Survie dans les macrophages	26
3.7	Infections chez de jeunes poussins	27
4	DISCUSSION	30
4.1	Motilité	30
4.2	Stress oxydatif	31
4.3	Biofilms	32
4.4	Stress osmotique	32
4.5	Interactions cellules-bactéries	33

4.6	Infections	35
4.7	Complémentation	37
4.8	Le petit ARN TimR	37
4.9	Expériences proposées	38
5	CONCLUSION	40
6	BIBLIOGRAPHIE	41

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Les <i>E. coli</i> intestinaux et extra-intestinaux.....	2
Figure 1.2 Structure du système de sécrétion de type III.....	5
Figure 1.3 Modes de vie et transmission de <i>Salmonella</i>	7
Figure 1.4 Les petits ARN régulateurs en cis et en trans.....	11
Figure 1.5 Position du peptide présumé et du petit ARN <i>timR</i> par rapport à <i>ryfA</i>	13
Figure 3.1 Effet de <i>ryfA</i> sur la motilité.....	21
Figure 3.2 Résistance au peroxyde d'hydrogène en fonction de <i>ryfA</i>	22
Figure 3.3 Production de biofilm après 48 heures à 20°C	24
Figure 3.4 Titre d'agglutination aux levures de <i>Salmonella</i> UK-1.....	25
Figure 3.5 Adhésion de <i>Salmonella</i> UK-1 aux CEC-32 après 2h30.....	25
Figure 3.6 Survie de <i>Salmonella</i> UK-1 dans les THP-1	26
Figure 3.7 Poids et comptes des poussins après l'infection avec <i>Salmonella</i> UK-1	27
Figure 4.1 Étude de transcriptome quand <i>ryfA</i> est muté chez <i>E. coli</i> CFT073.....	30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Les souches et les plasmides utilisés	15-16
Tableau II. Les amorces utilisées	17
Tableau III. Résistance de <i>Salmonella</i> au stress osmotique	23

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide desoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
APEC	<i>E. coli</i> pathogènes aviaires
ARN	Acide ribonucléique
CFU	Unités formatrices de colonies
Cm	Chloramphénicol
CIPA	Comité institutionnel de protection des animaux de l'INRS
DAEC	<i>E. coli</i> diffusément adhérent
DAP	Acide diaminopimélique
DMEM	Dulbecco's modified Eagles Medium
DO	Densité optique
DOC	Deoxycholate de sodium
EPS	Exopolysaccharides
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragiques
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasives
EPEC	<i>E. coli</i> entéro-pathogènes
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxigéniques
ExPEC	<i>E. coli</i> extra-intestinaux
FBS	Sérum de veau fœtal
GVBS	Tampon gélatine véronal
Km	Kanamycine
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LD50	Dose létale 50%
LPS	Lipopolysaccharides
MAPS	<i>MS2-affinity purification and sequencing</i>
MOI	Multiplicité d'infection
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NMEC	<i>E. coli</i> causant des méningites néo-natales
NRAMP	<i>Natural resistance-associated macrophage protein</i>
ON	<i>Overnight</i>
PBS	Tampon phosphate saline
PCR	Réaction de polymérase en chaîne

PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
RT-PCR	Rétrotranscription et réaction de polymérase en chaîne
RBS	Site de liaison au ribosome
RNS	Espèces réactives d'azote
rpm	Révolution par minutes
ROS	Espèces réactives d'oxygène
SCV	<i>Salmonella containing vacuole</i>
SPI	Ilots de pathogénicité de <i>Salmonella</i>
srRNA	Petit ARN régulateur
SS	Système de sécrétion
T3SS	Système de sécrétion de type 3
TLR	<i>Toll like receptor</i>
UK	<i>Universal killer</i>
UPEC	<i>E. coli</i> uropathogènes
WT	Souche sauvage

1 INTRODUCTION

Escherichia coli

Escherichia coli est une bactérie Gram négative de la famille des Entérobactéries. Parmi les différentes souches de cette espèce, on trouve des non-pathogènes ou des commensales, des pathogènes intestinaux et des pathogènes extra-intestinaux (Kaper *et al.*, 2004) (figure 1.1). Le nom *E. coli* évoque plus souvent les souches intestinales pathogènes comme la O157:H7, mais les ExPEC et leur impact sur la santé humaine n'est pas à négliger. Cette famille est capable de coloniser le tractus intestinal et va causer des maladies, typiquement lorsqu'introduit dans des milieux normalement stériles (Manges, 2016; Wiles *et al.*, 2008). Par exemple, si la bactérie se trouve au niveau de la vessie.

Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux ou ExPEC incluent les *E. coli* uropathogènes ou UPEC, les *E. coli* causant la méningite néo-natale NMEC et les *E. coli* pathogènes aviaires ou APEC. Ce dernier groupe cause une maladie nommée la colibacillose qui est commune chez le poulet, mais aussi chez les canards, dindes et autres volailles. Les APEC colonisent les sacs aériens des poulets et l'infection peut devenir systémique causant la mort de l'animal (Kaper *et al.*, 2004). La colibacillose est responsable chaque année de lourdes pertes économiques dans l'industrie de la volaille s'élevant à des centaines de millions de dollars (Kathayat *et al.*, 2021). C'est la première cause de mortalité dans l'industrie avec 20 % des morts qui lui sont attribuées. Trois sérotypes, O78, O2 et O1, causent la majorité des infections (Kathayat *et al.*, 2021). Ces infections ont plusieurs facteurs de risque incluant des infections virales et des sources de stress (Ewers *et al.*, 2007). Les APEC peuvent infecter les poulets à tout âge, avec des taux d'infection plus élevés entre 4 et 6 semaines (Kathayat *et al.*, 2021).

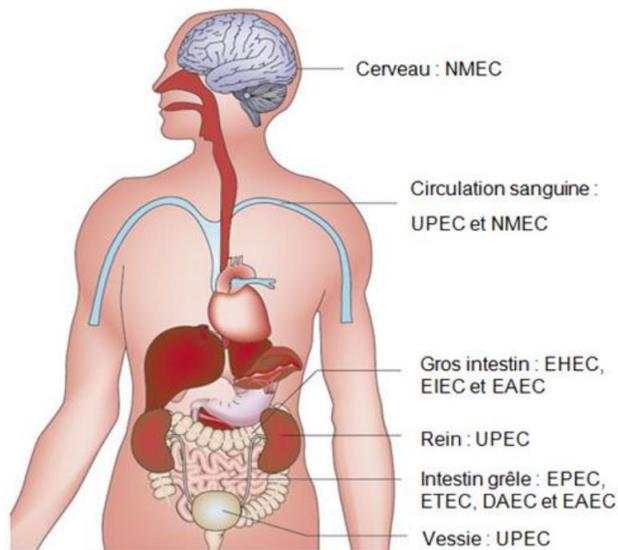


Figure 1.1 Les *E. coli* intestinaux et extra-intestinaux. Adaptée de Croxen and Finlay (2010).

Les NMEC colonisent le cerveau et peuvent se retrouver dans le sang. Les UPEC colonisent la vessie, peuvent infecter les reins et ensuite se retrouver dans le sang. Les EHEC et EIEC colonisent seulement le gros intestin et les EPEC, ETEC et DAEC colonisent seulement l'intestin grêle. On retrouve les EAEC dans le gros intestin et dans l'intestin grêle.

Salmonella

Salmonella est une bactérie Gram négative en forme de bacille et il existe deux espèces, *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* comporte six sous-espèces et plus de 2200 sérovars (Chan *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2019). Les sérovars peuvent se classifier en *Salmonella* typhiques et non-typhiques. Les typhiques tels que les sérovars Typhi et Paratyphi causent des infections graves systémiques chez l'humain (Ferrari *et al.*, 2019). Les non-typhiques vont causer des maladies intestinales moins graves. Dans certains cas rares, la maladie peut progresser à une bactériémie et mener au décès (Chambers & Gong, 2011). Les salmonelloses engendrent aussi des coûts importants en soins médicaux chaque année. Par exemple, aux États-Unis plus de 168 000 visites chez le médecin sont dues aux salmonelloses et 15 000 hospitalisations selon l'OMS en 2005 (Chambers & Gong, 2011). Des cas d'infections asymptomatiques persistantes par *S. enterica* ont été documentés pour plusieurs sérovars (Chambers & Gong, 2011). Chez la volaille, c'est le cas de figure le plus commun pour *S. enterica* sérovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) ce qui pose tout de même un risque à la santé des consommateurs (Fàbrega & Vila, 2013). En effet, les salmonelles sont responsables de la majorité des toxi-infections alimentaires, la viande de volaille étant une des sources les plus

communes (Carrasco *et al.*, 2012; Nyachuba, 2010). *Salmonella enterica* est une bactérie apparentée à *E. coli*, mais il y a plusieurs différences dans leur mode de vie et les infections qu'ils peuvent causer. *S. enterica* se distingue, entre autres, par sa capacité à envahir les macrophages et à survivre et se répliquer dans ceux-ci (Kenney, 2019). Ce mécanisme joue un rôle important dans l'échappement à la réponse immunitaire.

L'industrie de la volaille et les enjeux

La consommation de viande de poulet dans le monde est en augmentation et en 2016, la production de viande a été estimée à 100 millions de tonnes (Wessels *et al.*, 2021). La consommation de poulet est répandue, car la viande de poulet est facile à produire, peu coûteuse et est peu restreinte par des préoccupations religieuses. Autre que l'utilisation d'antibiotiques, les risques que comporte la consommation de poulet sont contrôlés par des lavages au chlore ou aux composés organiques (Wessels *et al.*, 2021). Des inquiétudes ont été soulevées concernant la sécurité de ces pratiques et les consommateurs ont une perception négative de celles-ci (Wessels *et al.*, 2021). Notamment, les lavages seraient seulement efficaces lorsque les comptes bactériens sont bas et peuvent rendre indétectable une contamination sans enlever le risque de toxi-infections (Wessels *et al.*, 2021).

L'utilisation des antibiotiques est fréquente dans l'industrie pour contrôler la présence de ces pathogènes (Martin *et al.*, 2015). Le problème grandissant de résistance auquel nous sommes confrontés nous contraint à trouver des alternatives. De tous les antibiotiques vendus aux États-Unis, environ 80% sont destinés à l'élevage d'animaux et 70% de ceux-ci sont d'une importance médicale (Martin *et al.*, 2015). L'utilisation de ces antibiotiques chez les animaux est directement liée à l'augmentation des bactéries résistantes et multi-résistantes et des infections causées par celles-ci chez les humains (Martin *et al.*, 2015).

Également, les vaccins disponibles contre les APEC n'offrent pas une protection contre plusieurs sérotypes à ce jour (Kathayat *et al.*, 2021). Autre que les impacts économiques des APEC, il y a aussi des impacts sur la santé humaine. En effet, les infections par les APEC auraient un potentiel zoonotique qui commence à être plus étudié. Chez les souris, les APEC peuvent causer des infections urinaires et des méningites néo-natales (Kathayat *et al.*, 2021). En comparant les UPEC, les NMEC et les APEC, on voit qu'ils ont beaucoup de facteurs de virulence en commun ce qui explique que ces infections soient possibles. Dans certains cas, les souches APEC présentes dans la viande consommée vont coloniser de façon asymptomatique le tractus

intestinal humain et plusieurs semaines ou mois plus tard, un transfert des bactéries au niveau de la vessie mènera à une infection urinaire. La viande de poulet serait donc en quelque sorte un réservoir pour les infections urinaires chez les humains (Manges, 2016).

1.1 Les facteurs de virulence

L'établissement d'une maladie par des agents infectieux est dépendant des facteurs de virulence. Des gènes codent pour ces facteurs de virulence qui augmentent la capacité qu'ont les bactéries de réaliser les étapes de leur cycle d'infection (Emody L, 2003). Ces gènes sont parfois codés sur des îlots de pathogénicité (PI) ou sur des plasmides (Emody L, 2003). Les îlots de pathogénicité sont des régions du génome où se situent de nombreux facteurs de virulence et qui ont des taux de bases azotées guanines et cytosines différents du reste du génome (Hacker & Kaper, 2000). Ces îlots semblent être acquis par transfert horizontal (Hacker & Kaper, 2000).

1.1.1 Les adhésines

Les adhésines sont d'importants facteurs de virulence chez *Salmonella* et chez *E. coli*, car l'adhérence à des cellules de l'hôte est souvent la première étape d'une infection. Les fimbriae sont des structures filamenteuses permettant l'attachement grâce à des adhésines à leurs extrémités et ont aussi des effets au niveau de la motilité et de la formation de biofilm (Kathayat *et al.*, 2021). Il existe trois formes principales de fimbriae selon leur mode d'assemblage; les pili de type IVb, les fimbriae curli et les fimbriae assemblés par la voie chaperon-placier (Dufresne & Daigle, 2017). Ces derniers sont les plus étudiés. Leur assemblage se fait par deux protéines, le chaperon va lier les sous-unités et les amener au placier (Waksman & Hultgren, 2009). Celui-ci va former un pore à la surface cellulaire et va ainsi assembler les sous-unités en fimbriae. Les gènes servant à la synthèse des fimbriae sont organisés en opéron tel que l'opéron *fim* pour les fimbriae type 1 et l'opéron *pap* pour les fimbriae P ou en groupe de gènes fimbriaires (FGC) (Dufresne & Daigle, 2017). Certains fimbriae vont se lier à des sucres spécifiques connus et d'autres ont des cibles qui sont encore inconnues. Nommons entre autres, les fimbriae de type 1 qui lient le mannose (Muller *et al.*, 2009).

Les fimbriae de type 1, les fimbriae P et S sont les principaux acteurs de l'adhésion chez les APEC (Kathayat *et al.*, 2021). *Salmonella* exprime un grand nombre de fimbriae différents incluant des curli et les *fim* qui ne sont pas homologues aux fimbriae de type 1 d'*E. coli*. Une douzaine de fimbriae distincts sont présents d'un sérovar à l'autre. (Dufresne *et al.*, 2018)

1.1.2 Les systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétion permettent aux bactéries de transporter des protéines à travers leurs membranes (Green & Meccas, 2016). Ceux-ci sont souvent des facteurs de virulence, car cet export peut être des effecteurs, des toxines, etc. Il existe plusieurs systèmes de sécrétion distincts et une même bactérie peut en exprimer plusieurs comme c'est le cas des ExPEC. Ils expriment le système de sécrétion de type V, entre autres, qui sécrète plusieurs autotransporteurs tels que les toxines Vat et Sat (Henderson *et al.*, 2004).

Salmonella exprime deux systèmes de sécrétion de type III (T3SS) qui sont essentiels à son mode de vie intracellulaire (Steele-Mortimer *et al.*, 2002). Le T3SS est fréquemment appelé l'aiguille et la seringue parce qu'il transporte à travers trois membranes ; les deux membranes de la bactérie et la membrane de l'hôte (Green & Meccas, 2016) (figure 1.2). Parmi les neuf protéines conservées d'un T3SS à un autre, huit sont partagés avec la structure des flagelles de plusieurs bactéries (Green & Meccas, 2016).

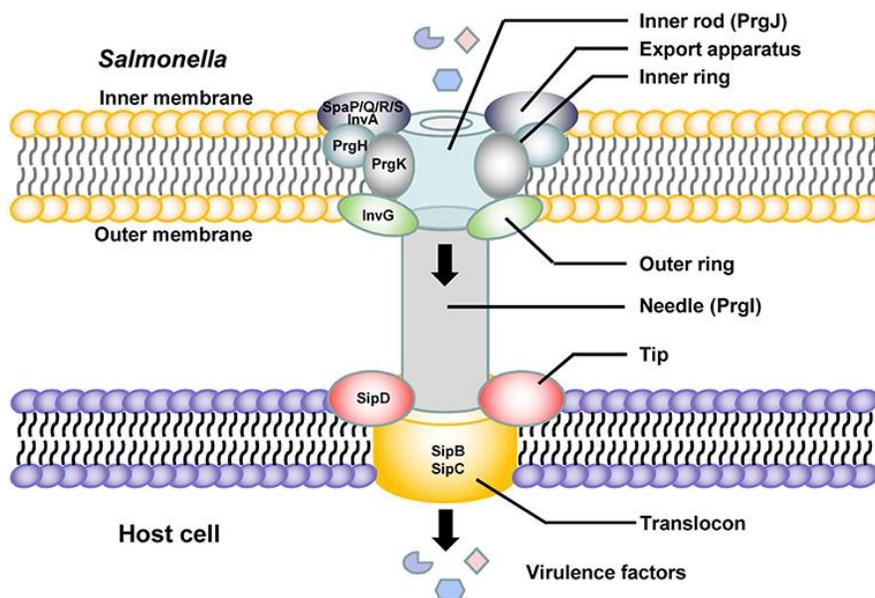


Figure 1.2 Structure du système de sécrétion de type III, figure tirée de Lou *et al.*, 2019

Le système de sécrétion de type III fait penser à une aiguille avec sa structure traversant la membrane cellulaire de l'hôte. Plusieurs protéines hautement conservées forment cette structure. Les effecteurs ou facteurs de virulence sont injectés directement dans l'hôte pour modifier les fonctions de la cellule. Ce processus nécessite de l'ATP.

L'îlot de pathogénicité 1 de *Salmonella* (SPI-1) code pour un des deux systèmes de sécrétion de type III (T3SS) essentiels au mode de vie intracellulaire de la bactérie (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). SPI-1 désigne une région de 40 kilobases qui inclut 39 gènes liés au T3SS-1 ainsi que des régulateurs de la virulence agissant localement ou ailleurs dans le génome (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). Le T3SS-2 sert à la survie et la réplication dans les macrophages (Fass & Groisman, 2009).

1.1.3 La motilité

Les flagelles, composés de trois grandes parties; le rotor, le crochet et le filament, assurent la motilité des bactéries (Imada, 2018). La motilité doit être bien régulée lors de l'établissement de la maladie. Il semblerait que chez *Salmonella*, la motilité est surtout importante dans les débuts de l'infection (Diepold & Armitage, 2015). Le flagelle et le système de sécrétion de type III sont exprimés à tour de rôle, mais pas en même temps. Les régulateurs FlhDC et VirF sont aussi contre-régulés. (Diepold & Armitage, 2015) Une hypothèse est que l'expression différentielle permet de ne pas exporter de protéines flagellaires par erreur dans le TSS3 et induire une réponse immunitaire (Diepold & Armitage, 2015).

Une souche de *S. Typhimurium* rendue hypermotile par la délétion de *flgM* est moins virulente que la souche sauvage (Josenhans & Suerbaum, 2002). Des études ont aussi montré que les mutants *S. Typhi* pour ces régulateurs étaient déficients pour l'invasion dans les cellules épithéliales et les macrophages. (Josenhans & Suerbaum, 2002)

1.1.4 L'invasion et la survie dans les macrophages

L'invasion est une étape importante de l'établissement de la maladie (figure 1.3). L'invasion va se faire dans les cellules épithéliales avec l'aide du T3SS-1 dans le cas de *Salmonella*. Le T3SS-1 est impliqué dans un réarrangement du cytosquelette (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). À l'entrée de la bactérie dans la cellule, celle-ci est dans une vacuole nommée « *Salmonella* containing vacuole » ou SCV. Dans le cas de persistance dans les macrophages, c'est le T3SS-2 qui entre en jeu en permettant la survie et la réplication dans la vacuole (Pucciarelli & García-Del Portillo, 2017). Les protéines effectrices T1 et T2 ont des activités sur plusieurs cibles dans les cellules eucaryotes (Pucciarelli & García-Del Portillo, 2017).

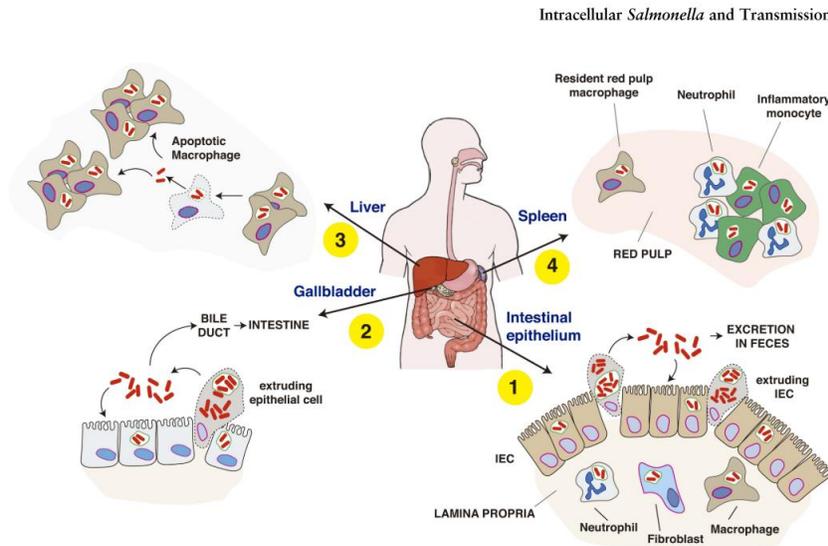


Figure 1.3 Modes de vie et transmission de *Salmonella* Typhimurium durant l'infection locale ou systémique, figure tirée de Pucciarelli et al, 2017

Durant son cycle d'infection, *Salmonella* Typhimurium peut occuper différents sites chez l'hôte. D'abord, l'invasion a lieu au niveau des cellules épithéliales de l'intestin. La bactérie y rencontre des cellules immunitaires de l'hôte et a une prolifération lente, puis atteint la vésicule biliaire. Ce site voit une multiplication rapide et une dissémination dans l'intestin et les fèces. L'infection devient systémique et le foie et la rate deviennent des sites de haute répliation particulièrement dans les macrophages.

1.1.5 Les sidérophores

Les sidérophores sont des molécules permettant à la bactérie de sécuriser des quantités de fer de l'environnement ou pendant l'infection (Kramer *et al.*, 2020). Le fer est peu disponible chez l'hôte et la compétition est forte pour les faibles quantités présentes. De plus, le fer est important comme cofacteur de plusieurs enzymes essentiels pour des bactéries comme *E. coli* et *S. enterica*. Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire souvent très diffusibles qui vont capter le fer insoluble (Fe^{3+}) (Kramer *et al.*, 2020). La bactérie va ensuite internaliser le fer via des récepteurs spécifiques au sidérophore. Ce processus est important pour la virulence et est régulé par plusieurs acteurs pour assurer la production de sidérophores rapidement et seulement dans certaines conditions selon la concentration en oxygène, la quantité de fer et la phase de croissance (Kramer *et al.*, 2020). L'entrée de trop de fer dans la cellule a un effet toxique ce qui rend cette régulation doublement importante (Domínguez-Acuña & Portillo, 2022). Le répresseur Fur, activé par la présence de Fe^{2+} , est le principal acteur de cette régulation. *Salmonella* Typhimurium et les APEC expriment un dérivé de l'entérobactine, la salmocheline, qui n'est pas reconnu par le système immunitaire inné via l'*enterobactin-scavenging protein*

lipocalin-2 (Domínguez-Acuña & Portillo, 2022) Ils expriment aussi l'entérobactine, la yersiniabactine et l'aérobactine (Kathayat *et al.*, 2021; Kramer *et al.*, 2020).

1.1.6 Les biofilms

Les bactéries peuvent croître de façon planctonique ou en biofilms (Harrell *et al.*, 2021). Les biofilms sont des regroupements de bactéries adhérant à une surface qui forment une communauté bactérienne complexe avec un comportement distinct. La sécrétion d'exopolysaccharides entourant les bactéries permet une forte adhésion et aussi une protection contre les antibiotiques et le système immunitaire ce qui favorise la persistance (Harrell *et al.*, 2021). Le biofilm joue donc un rôle important dans les infections chroniques et est estimé présent dans 80% des cas (Harrell *et al.*, 2021). Chez *Salmonella*, la formation de biofilms dans l'hôte est bien documentée. Plusieurs voies régulatrices vont activer ou réprimer la production de biofilms en réponse à certains types de stress (Harrell *et al.*, 2021). Chez les Salmonelles non-typhoïdes, les biofilms seraient associés à une réduction de la virulence, mais à une augmentation de la persistance et à des infections asymptomatiques (Harrell *et al.*, 2021).

1.2 Réponse au stress

Durant son cycle d'infection, la bactérie fait face à plusieurs stress. Entre autres, elle doit faire face à la réponse immunitaire de l'hôte menée par les phagocytes. Les phagocytes sont des cellules du système immunitaire qui peuvent faire la phagocytose des bactéries (Genovese *et al.*, 2013). Les neutrophiles ou hétérophiles chez le poulet et les macrophages sont les principaux acteurs de la phagocytose. Les phagocytes expriment à leur surface des TLR (toll like receptors) qui reconnaissent des motifs associés aux pathogènes (Genovese *et al.*, 2013). Par exemple, le TLR4 reconnaît les LPS et le TLR5 reconnaît la flagelline (Genovese *et al.*, 2013). La phagocytose peut être dépendante de l'opsonisation ou indépendante de l'opsonisation. Quand elle est indépendante, ce sont surtout la dectin-1, le récepteur de mannose et les *scavengers* qui reconnaissent le pathogène (Genovese *et al.*, 2013).

1.2.1 Stress oxydatif

Après l'internalisation des bactéries dans une vacuole, le phagosome, elles vont être tuées par des espèces réactives d'azote (RNS) et d'oxygène (ROS) et des antimicrobiens (Babior, 2000). C'est l'effet de la dégranulation et l'explosion oxydative. Les agents oxydants sont générés par 4 enzymes; la NADPH oxydase, la superoxyde dismutase, l'oxyde nitrique synthase et la

myéloperoxydase (MPO) (Babior, 2000). Certains vont produire l'O₂⁻ et d'autres vont catalyser la production de peroxyde d'hydrogène(H₂O₂)(Babior, 2000). Chez les mammifères, la myéloperoxydase génère des oxydants forts tels que l'acide hypochloreux (HOCl), le radical hydroxyle (OH[•]), singlet oxygène (¹O₂) et l'ozone (O₃) (Babior, 2000). Les oxydants causent des dommages à l'ADN ainsi qu'aux systèmes de réparation cellulaire (Nathan & Shiloh, 2000).

Les méthodes employées par les bactéries pour résister au stress oxydatif incluent la production d'enzyme. Il y a entre autres, les catalases, les superoxide dismutases et les peroxiredoxines (Nathan & Shiloh, 2000). Certains réactifs peuvent aussi protéger contre le stress oxydatif comme l'ascorbate et le pyruvate (Nathan & Shiloh, 2000). Les bactéries résistantes au stress oxydatif ont plusieurs régulateurs spécifiques pour répondre au stress oxydatif tels que *soxRS* et *oxyR*. (Nathan & Shiloh, 2000).

Les bactéries ont aussi des méthodes pour résister à la phagocytose. Entre autres, elles peuvent éviter la phagocytose en sécrétant des substances toxiques pour les phagocytes, en évitant l'opsonisation et avec une capsule de polysaccharides (Hsieh & Allen, 2020; Uribe-Querol & Rosales, 2017).

1.2.2 Choc thermique

Une autre réponse au stress importante est la réponse au choc thermique (*heat shock*). Cette réponse implique de nombreuses protéines, les HSP, qui permettent le fonctionnement du métabolisme à une température plus élevée (Maleki *et al.*, 2016). Par exemple, des protéines chaperonnes vont permettre le repliement des protéines et protéger de la dénaturation (Maleki *et al.*, 2016). Chez *E. coli* et *Salmonella*, la réponse est médiée par le facteur sigma 32 qui se lie au promoteur des gènes associés (Maleki *et al.*, 2016).

1.3 La régulation génique

Les bactéries utilisent différents mécanismes pour la régulation de leurs gènes surtout dans l'environnement changeant qui est l'hôte. La régulation se fait parfois au niveau de l'ADN ce qu'on nomme régulation transcriptionnelle et parfois au niveau de l'ARN ou de la protéine, respectivement la régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle. Les acteurs de la régulation peuvent être entre autres des protéines, des facteurs sigmas et des petits ARN régulateurs. Contrairement aux eucaryotes, les trois étapes de la synthèse des protéines ne sont pas séparées par le noyau chez les bactéries et la bactérie peut donc s'adapter rapidement en produisant de nouvelles protéines. C'est ce qui permet à une bactérie d'utiliser les sucres qui sont

disponibles dans son milieu, de changer quand la disponibilité change et de survivre dans des milieux pauvres en nutriments (Wright & Lockhart, 1965).

La régulation du fimbriae de type 1 chez *E. coli* est assurée par des protéines régulatrices qui modulent un élément inversible FimS (Muller *et al.*, 2009). Chez *Salmonella*, la régulation est complètement différente (Dufresne & Daigle, 2017). L'élément inversible est absent et seuls des régulateurs affectent directement l'expression de Fim (Dufresne & Daigle, 2017).

Salmonella et *E. coli* ont certains régulateurs globaux qui affectent plusieurs gènes à la fois. Par exemple, chez *Salmonella*, SirA est un régulateur global de la gastroentérite et de la formation de biofilm (Garai *et al.*, 2012). HilA est un des régulateurs de la virulence les plus importants et est nécessaire à l'expression des îlots de pathogénicité 1, 4 et 5. (Garai *et al.*, 2012)

1.3.1 Les facteurs sigma et les anti-sigma

La bactérie possède différents facteurs sigma qui se fixent à l'ARN polymérase pour lui permettre de reconnaître les promoteurs. Le sigma 70 codé par *rpoD* s'occupe de l'expression des gènes « housekeeping », c'est-à-dire, les fonctions habituelles de la bactérie (Tripathi *et al.*, 2014). D'autres facteurs sigmas vont être reliés à des réponses spécifiques. Par exemple, le facteur sigma S ou *rpoS* est relié à une réponse générale de stress (Tripathi *et al.*, 2014). Pour que l'ARN polymérase transcrive les gènes jouant un rôle dans la réponse au stress, elle doit être liée avec sigma S. Il existe aussi des facteurs anti-sigma. Ceux-ci servent à séquestrer les facteurs sigma pour réprimer les gènes associés (Tripathi *et al.*, 2014). Un exemple est dans la régulation de la mobilité par l'anti-sigma FlgM (Diepold & Armitage, 2015). Ce régulateur se fixe au facteur σ_{28} et l'empêche de se lier à l'ARN polymérase (Diepold & Armitage, 2015).

1.3.2 Système à deux composantes

Les systèmes à deux composantes impliquent un senseur membranaire qui peut s'autophosphoryler en réponse à un signal et ensuite, transmettre le message sous la forme d'une phosphorylation à un régulateur agissant sur l'ADN (Breland *et al.*, 2017). Ce type de régulation est rapide et permet une adaptation reliée au changement de l'environnement tel que celle reliée à l'infection chez l'hôte (Breland *et al.*, 2017). Plusieurs systèmes à deux composantes sont impliqués dans la virulence chez *E. coli* et *Salmonella*. Par exemple, dans le cas de PhoP, PhoQ chez *Salmonella* le système réagit à la concentration de Mg^{2+} dans le milieu, mais aussi plusieurs autres types de signaux (Groisman *et al.*, 2021; Kato & Groisman, 2008). Ce système a un effet sur l'invasion en modulant l'expression de SPI-1 (Aguirre *et al.*, 2006).

1.3.3 Les petits ARN régulateurs

En plus d'être ARN messagers et des constituants des ribosomes, les ARN occupent d'autres rôles dans la cellule qui sont de plus en plus étudiés. Les petits ARN régulateurs (srRNA) sont des ARN d'une taille entre 50 et 500 nucléotides qui ne codent pas pour des protéines et qui le plus souvent, régulent la traduction des protéines en s'appariant à des ARN messagers soit pour bloquer leur traduction, les stabiliser ou initier leur dégradation (Bloch *et al.*, 2017). Il existe deux groupes de srRNA soit ceux qui opèrent en cis et ceux qui opèrent en trans (figure 1.4). Le premier groupe correspond à un ARN qui est codé au niveau de la séquence qu'il régule sur le brin complémentaire. Celui-ci a une complémentarité avec la séquence cible et une grande spécificité d'interaction (Waters & Storz, 2009). Dans plusieurs des systèmes connus de cis-srRNA, l'expression d'un petit peptide toxique sera régulée ainsi (Waters & Storz, 2009). Quand l'ARN antisens s'apparie avec la cible, il va masquer le site de liaison au ribosome (RBS). Pour les srRNA en trans, l'ARN est codé ailleurs dans le génome et la complémentarité est plus limitée. Ceci permet d'avoir plusieurs cibles c'est-à-dire un effet pléiotropique (Bloch *et al.*, 2017). De cette façon, l'expression d'un ARN régulateur peut avoir l'effet d'activer ou de réprimer des voies en lien avec la réponse à un stress ou en lien avec une étape du cycle d'infection (Bloch *et al.*, 2017). La protéine chaperonne Hfq est parfois requise pour les srRNA en trans (Bloch *et al.*, 2017). Parmi les srARN connus les plus étudiés des bactéries, on compte RhyB et CsrB, ceux-ci ont respectivement des rôles dans la régulation du fer et dans la régulation globale (Massé & Gottesman, 2002; Liu *et al.*, 1997).

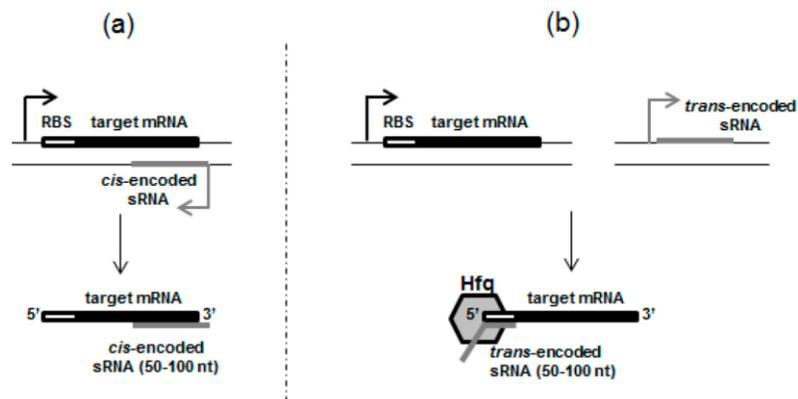


Figure 1.4 Les petits ARN régulateurs en cis et en trans, tirée de Bloch *et al.* 2017

Les petits ARN régulateurs se divisent en deux grandes familles. a) Les petits ARN agissant en cis sont codés au même endroit que leur séquence cible et sont indépendants de Hfq. b) Les petits ARN agissant en trans sont codés ailleurs dans le génome et ont souvent besoin de la protéine chaperonne Hfq.

1.4 Le petit ARN RyfA

Le petit ARN *ryfA* a été découvert et étudié récemment, notamment chez les bactéries *Shigella*, *E. coli* et *Salmonella* (Fris *et al.*, 2017). Celui-ci joue un rôle inconnu, mais des études récentes ont montré que ce serait un ARN indépendant de Hfq (Bak *et al.*, 2015). Une surexpression de cet ARN a un effet inhibiteur sur la croissance parce que son accumulation est toxique chez *Salmonella* (Andresen *et al.*, 2020). Celui-ci est d'une taille de 300 nucléotides et est situé entre les gènes *sseA* et *sseB* (Bessaiah *et al.*, 2021). Des expériences avec des souches UPEC mutantes pour ce srRNA ont montré des différences de phénotypes intéressantes (Bessaiah *et al.*, 2021). Le mutant *ryfA* est plus motile que la souche sauvage (WT) (Bessaiah *et al.*, 2021). Le mutant exprime moins de fimbriae de type 1, produit moins de biofilm et résiste moins au stress oxydatif et osmotique (Bessaiah *et al.*, 2021). L'effet de la mutation de *ryfA* sur la virulence a été confirmé par des modèles d'infections urinaires chez les souris (Bessaiah *et al.*, 2021). Le mutant *ryfA* colonisait moins les vessies et reins des souris (Bessaiah *et al.*, 2021). Des résultats non-publiés chez la souche APEC CH138 ont montré des effets similaires dans des infections chez de jeunes poulets. Des expériences de séquençage d'ARN (RNAseq) ont montré que plusieurs gènes reliés à la réponse de stress général sont moins exprimés quand *ryfA* est enlevé (Bessaiah *et al.*, 2021). De plus, il y avait des gènes reliés à l'utilisation de certains sucres qui étaient surexprimés chez le mutant *ryfA* (Bessaiah *et al.*, 2021).

Un article publié récemment concernant RyfA de *Salmonella* a identifié un petit peptide putatif TimP qui serait exprimé à partir de l'ARN de *ryfA*, suggérant que le RyfA n'est pas entièrement non-codant (Andresen *et al.*, 2020). Dans cet article, le petit ARN TimR est aussi décrit. Celui-ci est codé à côté de RyfA dans le sens inverse et peut potentiellement interagir avec RyfA (figure 1.5). Chez la souche UPEC CFT073, des mutations éliminant le cadre de lecture du peptide TimP présumé chez *E. coli* ont montré que les effets observés en mutant RyfA ne sont pas dus au peptide (Bessaiah *et al.*, 2021). L'existence de ce peptide est encore remise en question chez *E. coli*. De plus, chez *Salmonella* sa production a été seulement démontrée dans des conditions de surexpression (Andresen *et al.*, 2020).

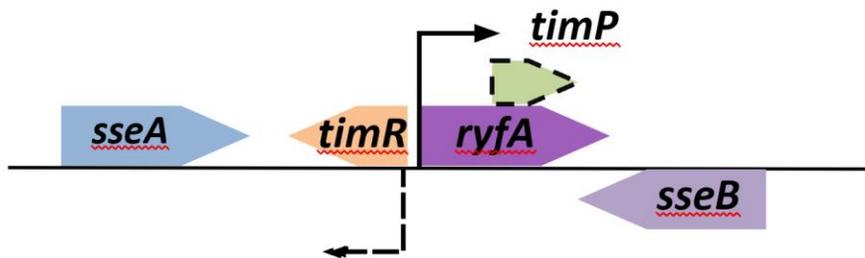


Figure 1.5 Position du peptide présumé et du petit ARN *timR* par rapport à *ryfA*, figure par Carole Anamali

Le petit ARN *timR* est codé juste avant le début de *ryfA* dans le sens inverse. Le peptide TimP serait codé dans la séquence de *ryfA*. *sseA* et *sseB*, des gènes qui codent respectivement pour la 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase et la *serine sensitivity enhancing B*, se trouvent de chaque côté des petits ARN.

1.5 Question et objectifs

Mon projet de maîtrise cherche à démontrer un effet de ce petit ARN *ryfA* sur la virulence de *Salmonella*. Le premier objectif est de voir l'effet de *ryfA* sur des phénotypes liés à la virulence chez *S. Typhimurium*. Entre autres, on veut comparer la résistance aux stress oxydatif et osmotique et la motilité des souches mutantes et sauvages. Le deuxième objectif est de voir les interactions avec des cellules, la survie dans les macrophages et l'adhésion à différentes lignées cellulaires quand *RyfA* est muté chez *S.Typhimurium*. Finalement, avec des infections chez les poulets, on veut connaître l'effet de *ryfA* sur la colonisation des organes et la virulence de *S.Typhimurium* chez l'hôte. Les souches de *S.Typhimurium* utilisées seront SL1344 et UK-1. SL1344 est une souche de *S.Typhimurium* typique causant des infections asymptomatiques chez les poulets (Clark *et al.*, 2011). La souche UK-1 est très virulente et va causer des infections systémiques chez les poussins menant à la mort. Parmi les quelques différences génomiques entre ces souches, on trouve une protéine homologue à la protéine effectrice du T3SS, NleC (Luo *et al.*, 2012). Quand celle-ci est enlevée, UK-1 perd de sa virulence (Luo *et al.*, 2012). UK-1 peut aussi infecter et tuer des veaux, cochons et chevaux (Luo *et al.*, 2012). Initialement, compléter les études sur *ryfA* chez les APEC faisait partie des objectifs de ce projet. Bien que la comparaison entre *E. coli* et *Salmonella* est restée en avant-plan durant ma maîtrise, je n'ai pas réussi à faire les expériences avec les APEC qui étaient prévues et ne présente pas ici de résultats chez les APEC.

1.5.1 Hypothèse

On s'attend à ce que la mutation de RyfA ait des effets semblables à ceux vus chez *E. coli* sur les phénotypes liés à la virulence. On prévoit quand même des différences dues aux modes de vie différents de ces bactéries. Le mutant *ryfA* de *Salmonella* devrait avoir une survie diminuée dans les macrophages qui se traduit en une réduction de la virulence pendant l'infection de l'hôte.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Les souches, les plasmides et les conditions de croissance

Les souches utilisées se trouvent dans le tableau I. Les bactéries sont cultivées dans le bouillon Luria-Bertani (LB) (Alpha Bioscience, Baltimore, MD) à 37°C avec agitation à 250 rpm sauf si mention autre. Les antibiotiques et autres ajouts si requis sont aux concentrations suivantes : kanamycine 50 µg/ml, ampicilline 100 µg/ml, chloramphénicol 30 µg/ml, acide diaminopimélique (DAP) 50 µg/ml.

Tableau I. Les souches et les plasmides utilisés

Plasmide ou souche	Description	Provenance
Souches		
UK-1	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium UK-1 WT	(Curtiss <i>et al.</i> , 1996)
SL1344	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium SL1344 WT	(Gulig & Curtiss, 1987)
SL1344 Δ <i>ryfA</i>	Délétion de <i>ryfA</i>	Ce projet
SL1344 comp	Ré-introduction de <i>ryfA</i> au site <i>attTn7</i>	Ce projet
UK-1 Δ <i>ryfA</i>	Délétion de <i>ryfA</i>	Ce projet
UK-1 comp	Ré-introduction de <i>ryfA</i> au site <i>attTn7</i>	Ce projet
CFT073	UPEC O6 WT	(Mobley <i>et al.</i> , 1990)
CFT073 Δ <i>ryfA</i>	Délétion de <i>ryfA</i>	(Bessaiah <i>et al.</i> , 2021)
CFT073 Δ <i>oxyR</i>	CFT073 Δ <i>oxyR</i> ::Km; Kmr	(Crépin <i>et al.</i> , 2012b)
<i>E. coli</i> χ 7213	<i>E. coli</i> Δ <i>asd</i>	(Kaniga <i>et al.</i> , 1998)
<i>Serratia liquefaciens</i>	Témoin positif biofilm	ATCC27592 (Ewing <i>et al.</i> , 1973)
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	<i>E. coli</i> non-pathogène	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)

Plasmides		
pKD46	Lambda red recombinase, inducible à l'arabinose, AmpR	(Datsenko & Wanner, 2000)
pGP-Tn7-Cm	pGP-Tn7-FRT:: Cm, AmpR, Cmr	(Crépin <i>et al.</i> , 2012b)
pSTNSK	pST76-K::tnsABCD, Kmr	(Crépin <i>et al.</i> , 2012a)
pKD3	Cassette résistance Cm	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD4	Cassette résistance Kn	(Datsenko & Wanner, 2000)
pMEG375	AmpR, CmR, sacB	(Dozois <i>et al.</i> , 2003)

2.2 Construction des mutants

Les mutants ont été réalisés avec la méthode de Datsenko & Wanner en utilisant les plasmides pKD4 (kanamycine) et pKD3 (chloramphénicol) pour amplifier les cassettes de résistance (Datsenko & Wanner, 2000). Les amorces CMD2545 et CMD2546 ont été utilisées pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol, puis la cassette a été insérée au niveau de *ryfA* en délétant le gène. La cassette de résistance a été enlevée par la méthode détaillée dans Datsenko & Wanner, 2000. Les souches complémentées ont une seule copie du gène insérée au site *attTn7* à l'aide des plasmides pSTNSK et pGp-Tn7-Cm selon la méthode détaillée par Crépin *et al.* (Crépin *et al.*, 2012a). Le plasmide pGp-Tn7-*ryfA* a été construit par un clonage Gibson (Gibson *et al.*, 2009) avec les amorces CMD2735-CMD2736 et les enzymes de restriction XhoI et KpnI (NEB). La souche χ 7213 qui a un besoin de supplément avec l'acide diaminopimélique (DAP) à cause d'une mutation Δasd a été transformée avec pGp-Tn7-*ryfA* et conjuguée avec les souches WT avec le plasmide pSTNSK. Les colonies CmS et DAP+ ont été criblées par PCR (CMD 2448-CMD1522) pour confirmer l'intégration au site Tn7. Pour réaliser le mutant par échange allélique, la région *sseA-sseB* a été amplifiée chez le mutant *ryfA*::Cm avec les amorces CMD2797-CMD2798. Le plasmide pMEG375 a été digéré par les enzymes *PacI* et *PmeI* et le pMEG375-*sseA- Δ ryfA-sseB* a été construit par clonage Gibson (Gibson *et al.*, 2009). La souche DAP- est transformée avec la construction et conjuguée avec la souche WT. Après l'intégration du plasmide dans la souche sauvage, les colonies poussant sur gélose sucrose sans sel Cm ont été criblées pour la sensibilité au Cm et Amp, puis par PCR (CMD2618-CMD2619).

Tableau II. Les amorces utilisées

Amorces	Direction	Caractéristiques	Séquence 5'-3'
CMD2545	F	Après <i>sseA</i>	GGCCTTTCCAGCAGGCTTTG
CMD2546	R	Avant <i>sseB</i>	GGGTGACGAACCGATCGATA
CMD2448	F	<i>glmS</i>	AAAGGCACCGACGTTGACCA
CMD1522	R	Cassette Cm	CGGTCTGGTTATAGGTACAT
CMD2797	F	Avant <i>sseA</i> + homologie pMEG375	GCG CCG GAT CCT TAA TAA CCG CCT GTC AGC AAC GGT
CMD2798	R	Après <i>sseB</i> + homologie pMEG375	TGC ATG CCT GCA GGT TTC ATC GCG AAT TTG CTG ACC G
CMD2618	F	Avant <i>ryfA</i>	GGCTGCAGGAATTCCCTCGAGCATATCGCGCCG TTCTACGA
CMD2619	R	Après <i>ryfA</i>	CAAGGCCTTCGCGAGGTACCGCTCACGCTTAT CCGGCCTA

Légende : F = sens, R = antisens

2.3 Motilité

Les bactéries ont été incubées pendant la nuit (« overnight » ON) dans le milieu LB à 37°C. Des cultures fraîches ont été préparées en diluant 1:100 dans du milieu frais et incubées (37°C, avec agitation) jusqu'à une densité optique (D.O.) de 0.6 à 600 nm. Des boîtes de Petri contenant 22 mL de gélose molle 1% tryptone, 0,5% NaCl, 0,4% agar ont été coulées la veille du test. Le pourcentage d'agar idéal a été déterminé empiriquement. Les géloses ont étéensemencées en leur centre avec une aiguille sans toucher le fond, puis incubées 18 heures à 37°C. Le diamètre de motilité a été mesuré. Cette expérience a été réalisée plus que trois fois indépendantes et avec au moins deux réplicats techniques à chaque répétition. Un test t de Student a été réalisé sur les données pour déterminer des différences significatives.

2.4 Résistance au stress oxydatif

Les bactéries ont été préparées comme au test de motilité. Des boîtes de Petri de 20 mL de LB-agar 1,5% ont été coulées. 100 µl de bactéries a été mélangé avec 3 mL de top agar (LB-agar

0,5%) à 50 °C et le mélange a été versé sur la gélose. Après un temps de solidification, un papier Whatman de 6 mm a été déposé stérilement au centre de la gélose avec une pince. 10 µl de peroxyde d'hydrogène à 50% a été déposé au centre du papier Whatman et la gélose a été incubée 18 heures à 37°C. Le diamètre d'inhibition a été mesuré.

2.5 Résistance au stress osmotique

Des géloses de LB agar supplémenté de 0,2 M, 0,4 M et 0,6 M d'urée ont été coulées et des dilutions de bactéries ont été posées sur les géloses avec et sans urée pour faire le compte par la méthode des gouttes. Le NaCl a aussi été utilisé de la même façon pour induire un stress osmotique avec des concentrations entre 0,6 M et 1 M.

2.6 Agglutination des levures

Les cultures bactériennes à D.O. 0,6 ont été concentrées 100 X par centrifugation pour obtenir une suspension d'environ 2×10^{11} cellules par mL, puis 40 µl a été dilué en série 1:2 dans une plaque 96 puits contenant 40 µl d'une suspension de levures commerciales 3% dans du PBS. La lecture a été faite par deux personnes après 15 minutes sur glace. Le test a aussi été réalisé avec des cultures ON et des cultures sans agitation.

2.7 Biofilms

À partir des cultures ON, des dilutions à 0,05 de D.O. ont été préparées et 150 µl a été ajouté dans une plaque de 96 puits en polystyrène. Chaque souche avait cinq réplicats techniques. Les puits témoins stériles ont été remplis avec du LB. La plaque a été incubée à 37°C et à 20°C pour 24 heures et 48 heures. Après l'incubation, la plaque a été rincée trois fois à l'eau distillée. Le violet de cristal à 0,1% a été ajouté à chaque puit (175 µl), puis la plaque a été incubée à température de la pièce pour 10 minutes. Le violet de cristal a été rincé cinq fois avec de l'eau distillée, puis les biofilms ont été solubilisés avec 200 µl de solution éthanol-acétone (80:20). L'absorbance à 595 nm de longueur d'onde a été mesurée avec un lecteur de plaque.

2.8 Adhérence

Les cellules CEC-32 (RRID: CVCL D160), une lignée de fibroblastes aviaires, ont été maintenues avec le milieu DMEM (Wisent Bioproducts) supplémenté avec 10% de FBS inactivé (sérum de vœu foetal) à 37°C 5% de CO₂ et recultivés à 70% de confluence. Elles ont été préparées la veille du test dans une plaque 24 puits avec 2×10^5 cellules par puits. Les bactéries ont été incubées

dans du LB à 37 °C jusqu'à une D.O. de 0,6. Le matin de l'expérience, le milieu des cellules a été changé et les bactéries ont été lavées et resuspendues dans du DMEM pour ajouter à la plaque avec une multiplicité d'infection (MOI) de 10. On a supposé une quantité de 3×10^8 CFU/mL pour une D.O. de 0,6. Le manno-pyranose a été ajouté dans certains puits pour une concentration finale de 1,25%. La plaque a été centrifugée à 600 X g pendant 5 minutes pour synchroniser les interactions. La suspension bactérienne a été étalée sur gélose pour confirmer la MOI. Après une incubation de 2 heures, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS, puis lysées avec du PBS-deoxycholate de sodium (DOC) 0,1%. Des dilutions ont été étalées sur gélose, puis comptées.

2.9 Survie dans les macrophages

Des cellules de la lignée de monocyte humain THP-1 (ATCC TIB-202) ont été maintenues avec du RPMI 1640 complété de 10% FBS, 1% d'acides aminés non-essentiels (Wisent) et de 1 mM de pyruvate de sodium (Wisent) à 37°C et 5 % CO₂. La lignée de monocytes a été différenciée en macrophages avec du phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) à une concentration de 10^{-7} M pendant 48 heures. Pour ce test, les bactéries ont été poussées sans agitation et la plaque est préparée telle que les tests d'adhésion avec un temps d'interaction bactéries-cellules de 1h30. Par la suite, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS à 37°C, puis un milieu contenant 50 µg/mL de gentamicine a été ajouté aux puits. Après une incubation de 2 ou 24 heures, les cellules ont été rincées et lysées comme précédemment. L'incubation de 24 heures a été continuée avec 12 µg/mL de gentamicine. Les lysats dilués ont été étalés sur gélose pour faire le compte.

2.10 Infections des jeunes poussins

Le protocole pour les infections a été révisé et approuvé par le Comité institutionnel de protection des animaux de l'INRS (CIPA) en accordance avec les réglementations. Des poussins de deux à trois jours après l'éclosion ont été commandés (Agence d'inspection des aliments du Canada, Ottawa, Canada). Après la réception, les poussins ont été infectés oralement avec la souche sauvage ou Δrya de *Salmonella* Uk-1 dépendant du groupe. Les souches ont été préparées en ensemençant des bouillons avec des précultures avec une dilution de 1:100. Après avoir atteint une D.O de 0.6, les cultures ont été diluées pour obtenir les concentrations voulues avec 15% de glycérol et étalées sur gélose pour confirmer le compte. Par la suite, les tubes ont été placés à -80°C pour 24 heures et d'autres dilutions et étalements ont été faits le matin de l'infection.

L'infection a été faite par la voie orale à l'aide d'une pipette avec un volume de 100 µl. Les poussins ont été pesés à la même heure chaque jour et après 6 jours, les poussins ont été sacrifiés. La rate et une partie du foie ont été récupérés, pesés et homogénéisés dans 2 fois le volume en PBS. Le sang a aussi été récupéré. Les dilutions ont été étalées sur gélose MacConkey, puis le nombre d'unités formatrices de colonies (CFU) a été compté. Les comptes sur gélose MacConkey et sur gélose LB ont été comparés. L'identité des colonies a été vérifiée par PCR (CMD2618-CMD2619).

2.11 Tests statistiques

Les tests statistiques ont été faits avec le programme Prism 8.0.1 (Graphpad). Les tests utilisés sont des tests de t de Student non-pairés.

3 RÉSULTATS

3.1 Motilité

Puisqu'un effet de *ryfA* sur la motilité a été constaté chez les UPEC (Bessaiah *et al.*, 2021), la motilité a été étudiée chez le mutant *ryfA* de *Salmonella*. Pour comparer la motilité des bactéries avec une délétion de *ryfA* et des bactéries de phénotype sauvage, des tests sur gélose molle ont été réalisés pour mesurer le diamètre de motilité.

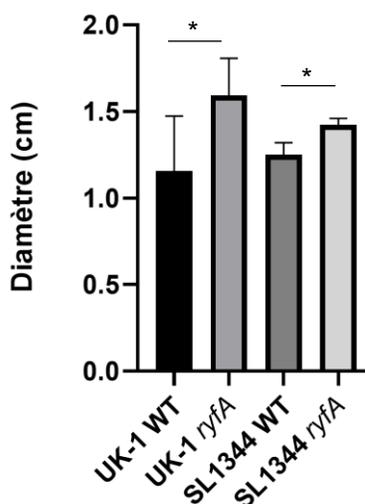


Figure 3.1 Effet de *ryfA* sur la motilité

Diamètre de motilité (cm) des souches de *Salmonella* à 37°C sur gélose 0,4% agar. WT = souche sauvage, * : p-value < 0,05. Les résultats sont des moyennes avec les écarts types. Le test statistique utilisé est un test t de Student non-paramétrique. UK-1 = *Salmonella* Typhimurium UK-1, SL1344 = *Salmonella* Typhimurium, *ryfA* = délétion de *ryfA*

Comme on peut le voir dans la figure 3.1, les diamètres de motilité sont plus grands chez les souches mutantes de *Salmonella* UK-1 (p=0,01) et SL1344 (p=0,02) que chez les souches sauvages. Ce test a été réalisé quatre fois indépendantes. Chacun des tests montraient la différence observée, mais une certaine variabilité du diamètre de motilité. Un test t de Student a été réalisé pour comparer les résultats.

3.2 Résistance au stress oxydatif

Un effet de *ryfA* sur la résistance des bactéries à un stress oxydatif est connu chez les UPEC (Bessaiah *et al.*, 2021). Le peroxyde d'hydrogène a donc été utilisé pour comparer la résistance au stress oxydatif des souches mutantes et sauvages de *Salmonella*. Le diamètre d'inhibition

autour des papiers Whatman contenant le peroxyde a été mesuré sur une gélose ensemencée uniformément de bactéries.

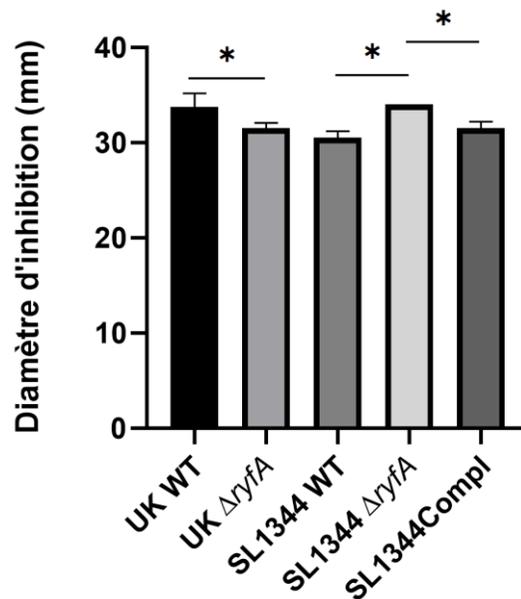


Figure 3.2 Résistance au peroxyde d'hydrogène en fonction de *ryfA*

Diamètre de la zone d'inhibition (mm) des souches de *Salmonella* autour d'un papier avec peroxyde d'hydrogène, * : p-value < 0,05. Le test statistique utilisé est un test t de Student non-pairé. Les résultats sont des moyennes avec les écarts types. Uk-1 = *Salmonella* Typhimurium UK-1, SL1344 = *Salmonella* Typhimurium, WT = souche sauvage, Δ ryfA = délétion de *ryfA*, Compl = Δ ryfA avec ré-introduction de *ryfA* au site Tn7

Comme on peut le voir dans la figure 3.2, SL1344 WT a une zone d'inhibition moins grande que son mutant *ryfA* ($p = 0,02$). Pour la souche complémentée de SL1344, la zone d'inhibition est plus grande que pour SL1344 WT, mais moins grande que le mutant. La différence avec le mutant est significative ($p = 0,04$), mais pas la différence avec le WT. Chez UK-1 WT, la zone d'inhibition est à l'inverse plus grande que pour son mutant ($p = 0,03$). Un test de Student a été réalisé pour comparer les résultats. Ce test a été fait trois fois indépendantes.

3.3 Résistance au stress osmotique

Pour évaluer la résistance au stress osmotique de souches mutantes et sauvages de *Salmonella*, les bactéries ont été diluées et étalées sur des géloses contenant de l'urée ou du NaCl concentré à 0,6M. Les bactéries ont par la suite été striées sur des géloses contenant des concentrations décroissantes pour l'urée et croissantes pour le NaCl. Puisque la résistance au stress osmotique est impactée par *ryfA* chez les UPEC (Bessaiah *et al.*, 2021), nous cherchions à voir si c'est aussi le cas chez *Salmonella*.

Tableau III. Résistance de *Salmonella* au stress osmotique

	Urée			NaCl		
	0,2 M	0,4 M	0,6 M	0,6 M	0,8 M	1 M
UK-1 WT	++	+	-	+	+	+
UK-1 $\Delta ryaA$	++	++	++	+	+	+
SL1344 WT	+	+	+			
SL1344 $\Delta ryaA$	+	+	+			

Croissance relative des différentes souches en présence d'urée ou de NaCl à 37°C, - : pas de croissance, + : peu de croissance (petites colonies), ++ : bonne croissance. WT = souche sauvage, UK-1 = *Salmonella* Typhimurium UK-1, SL1344 = *Salmonella* Typhimurium, *ryaA* = délétion de *ryaA*

Comme on voit dans le tableau III, il n'y a pas de croissance pour *Salmonella* UK-1 WT avec 0,6 M d'urée. Cependant, le mutant *ryaA* est capable de croître. Chez SL1344, la même concentration a seulement l'effet de réduire la taille des colonies chez la souche sauvage et mutante. Toutes les souches sont résistantes aux concentrations élevées de NaCl. Ce test a été fait trois fois indépendantes.

3.4 Biofilm

Pour mesurer la production de biofilm, les bactéries ont été incubées 48 heures à 20°C et les biofilms ont été colorés au cristal violet après plusieurs lavages. L'absorbance a été mesurée pour chaque souche. Plus de biofilm était formé après 48 heures à 20°C qu'après 24 heures à 37°C et donc permettait une meilleure comparaison des souches. La production de biofilm était affectée par *ryaA* chez les UPEC et donc nous voulions voir si c'est aussi le cas chez *Salmonella*.

Comme on voit dans la figure 3.3, chez *Salmonella* UK-1, le mutant *ryaA* produit plus de biofilm que la souche sauvage ($p = <0,0001$). Chez SL1344, ce serait plutôt le contraire ($p = <0,0001$). Chez *E. coli* CFT073, le mutant et le WT produisent environ la même quantité de biofilm dans ces conditions. Ce test a été fait trois fois indépendantes.

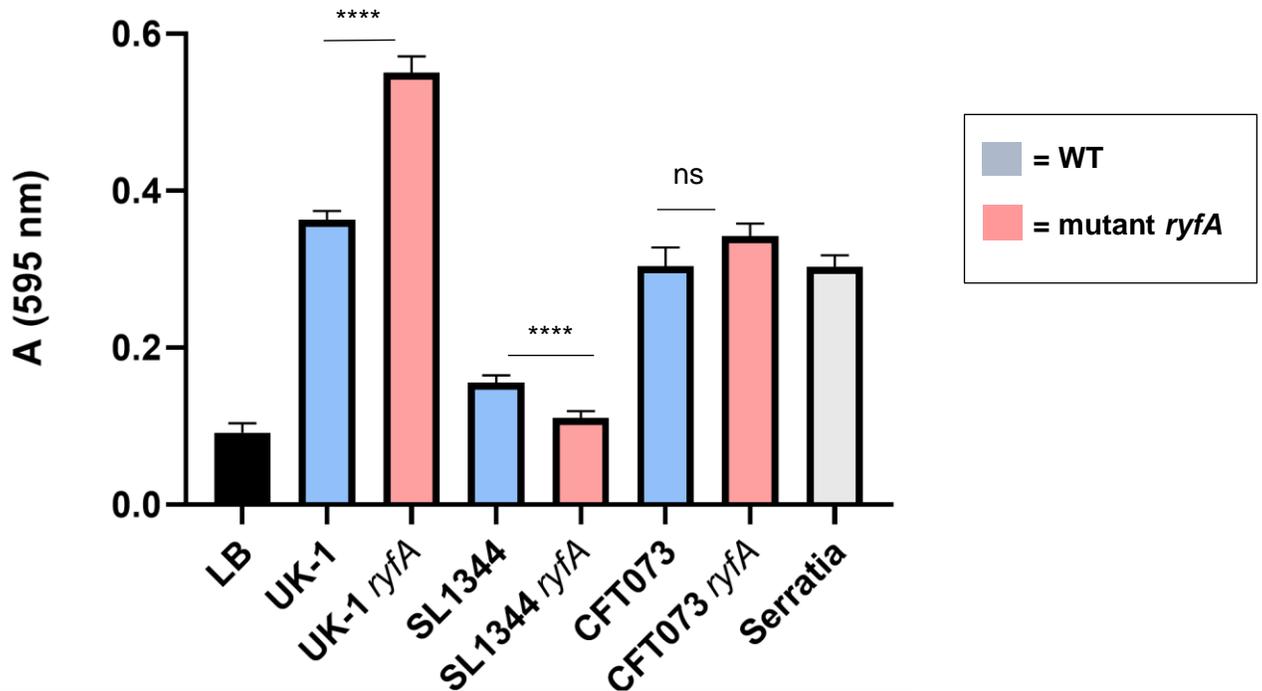


Figure 3.3 Production de biofilm après 48 heures à 20°C

Absorbance (595 nm) des souches de *Salmonella* après colorisation des biofilms au violet de cristal, *Serratia liquefaciens* sert de témoin positif. Le milieu Luria-Bertani sert de témoin négatif. p-value **** : $P < 0,0001$, ns = non-significatif. Le test statistique utilisé est un test t de Student non-pairé. Les résultats sont des moyennes avec les écarts types. UK-1 = *Salmonella* Typhimurium UK-1, SL1344 = *Salmonella* Typhimurium, WT = souche sauvage, *ryfA* = délétion de *ryfA*

3.5 Agglutination de levures

Pour évaluer l'expression des fimbriae de type 1, des dilutions de *Salmonella* UK-1 ont été mises en contact avec des levures et la dilution la plus grande à montrer une agglutination a été notée pour chaque souche. On a obtenu les mêmes résultats avec des suspensions bactériennes en phase stationnaire et cultivées sans agitation.

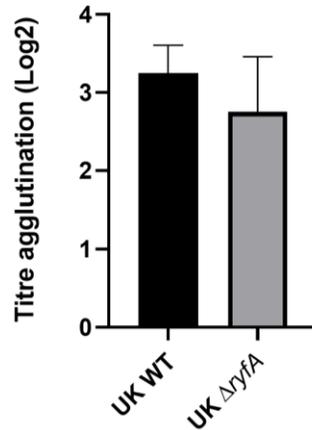


Figure 3.4 Titre d'agglutination aux levures de *Salmonella* UK-1

Dernière dilution montrant de l'agglutination avec une suspension de levures, les résultats sont des moyennes avec écarts types. WT = souche sauvage, UK = *Salmonella* UK-1. La différence n'est pas significative statistiquement. Ces données ont été obtenues avec des suspensions bactériennes au milieu de la phase de croissance cultivées avec agitation à 37°C.

On voit dans figure 3.4, il n'y a pas de différence significative pour le titre d'agglutination entre le mutant UK-1 et la souche sauvage. Ce test a été fait trois fois indépendantes

3.6 Adhésion

Les cellules bactériennes en adhérence avec la lignée de fibroblastes CEC-32 ont été comptées pour les mutants et les souches sauvages. L'impact des fimbriae de type 1 a été évalué en ajoutant du mannose à certains puits pour bloquer ceux-ci.

Comme on voit dans la figure 3.5, les comptes bactériens sont le plus élevés pour UK-1 WT sans mannose. Bien que les barres d'erreurs soient grandes, les comptes pour le mutant *ryfA* sans mannose et la souche sauvage avec mannose sont significativement moins élevés. Un test de Student a été réalisé ($p = 0,03$, $p = 0,01$). Il n'y avait pas de différence significative entre la souche sauvage sans mannose et la souche mutante sans mannose. Ce test a été fait deux fois indépendantes.

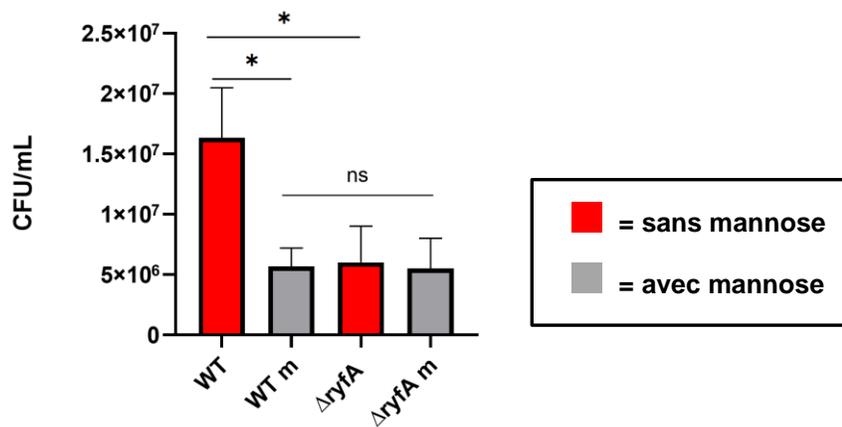


Figure 3.5 Adhésion de *Salmonella* UK-1 aux CEC-32 après 2h30

Nombre d'unités formatrices de colonies par mL de *Salmonella* UK-1 en association avec les CEC-32 avec et sans mannose. * : p-value < 0,05, ns = non-significatif. Le test statistique utilisé est un test t de Student non-pairé. Les résultats sont des moyennes avec les écarts types. WT = souche sauvage, *ryfA* = délétion de *ryfA*, m = manno-pyranose 1,25%

3.7 Survie dans les macrophages

Des tests de survie dans les macrophages humains de la lignée THP-1 ont été réalisés. Les comptes ont été faits après une incubation avec la gentamicine suivie de la lyse des cellules. Les souches sauvages ont été comparées aux mutants en plus des temps 0, 2 et 24 heures.

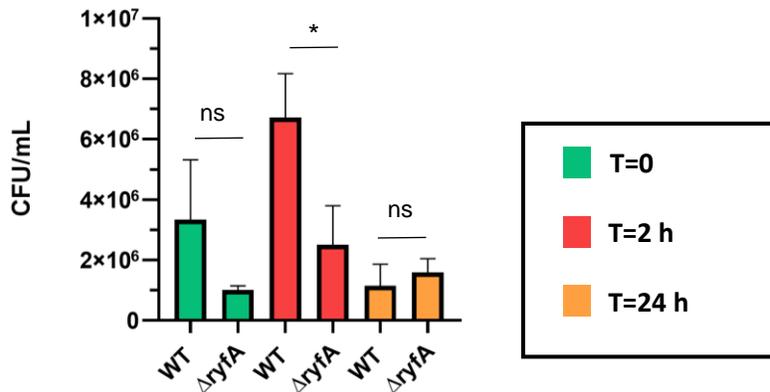


Figure 3.6 Survie de *Salmonella* UK-1 dans les THP-1

Nombre d'unités formatrices de colonies par mL de *Salmonella* UK-1 protégées de la gentamicine à trois temps : T0 = avant l'incubation avec gentamicine. La gradation de l'axe vertical est de 10⁶ CFU/mL. * : p-value < 0,05. Le test statistique utilisé est un test t de Student non-pairé. Les résultats sont des moyennes avec les écarts types. WT = souche sauvage, Δ*ryfA* = délétion de *ryfA*

On peut voir dans la figure 3.6 qu'au temps 0, les résultats sont semblables au test d'adhésion. La souche sauvage de UK-1 a des comptes plus élevés que le mutant *ryfA*, mais ce résultat est non-significatif ici ($p=0,11$). Pour le temps de 2 heures, les comptes augmentent pour la souche sauvage et pour la souche mutante. Cette augmentation est plus marquée chez la souche sauvage. La différence par rapport au mutant est significative statistiquement ($p=0,02$). Après 24 heures, la souche sauvage et la souche mutante ont tous deux une diminution, les ramenant plus ou moins au même compte. La diminution entre 2 et 24 heures est moins élevée pour le mutant *ryfA* que pour le WT. Ce test a été fait deux fois indépendantes.

3.8 Infections chez de jeunes poussins

Pour comparer les capacités de colonisation et la virulence des souches mutantes et sauvages de *Salmonella* UK-1, des infections avec trois doses croissantes de bactéries ont été réalisées chez des poussins de 2-3 jours. Les doses ont été déterminées selon la dose létale dans la publication de Porter et Curtiss de 1997 pour suivre la mortalité dans le groupe mutant et le groupe sauvage. Les poussins ont été pesés chaque jour jusqu'au 6^{ème} jour où les animaux ont été sacrifiés pour récupérer les organes. Le ratio du poids des animaux après 48 heures sur le poids initial à la réception a été calculé ainsi que le ratio du poids à la fin de l'expérience sur le poids initial.

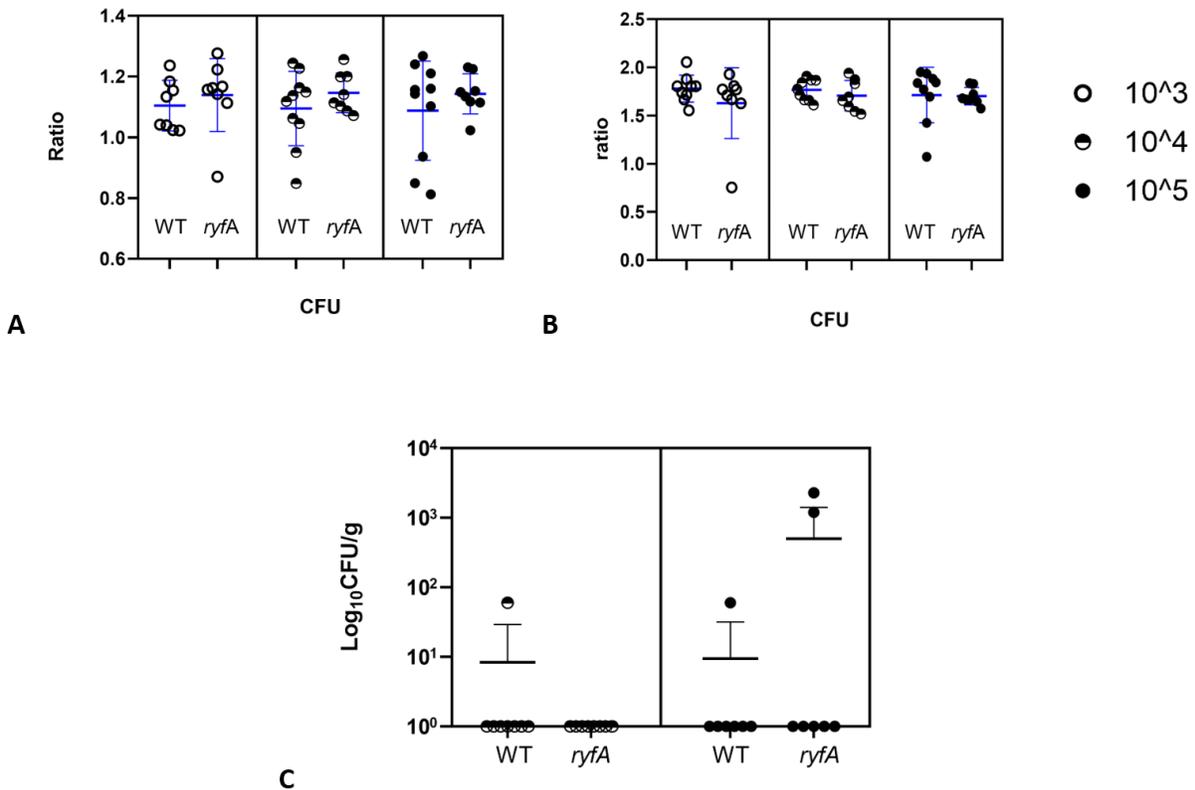


Figure 3.7 Poids et comptes des poussins après l'infection avec *Salmonella* UK-1

A et B. Ratio poids 48h (A) et 6 jours (B) /poids initial des poussins âgés de 2-3 jours selon la souche de *Salmonella* UK-1 et la dose. Les points de données représentent le ratio de prise de poids de différents poussins (n = 8-10). Aucune des différences ne sont statistiquement significatives. WT = souche sauvage, *ryfA* = délétion de *ryfA*

C. Log du nombre d'unités formatrices de colonies par gramme de *Salmonella* UK-1 présent dans la rate des poussins infectés. La dose 10^3 n'avait pas de compte dans les deux groupes et n'est pas montrée ici. Les points de données représentent le compte de différents poussins (n = 8-10). Ces résultats ne sont pas significatifs statistiquement. WT = souche sauvage, *ryfA* = délétion de *ryfA*

Comme on voit dans la figure 3.7 A, après 48 heures, il y a une tendance non-significative. Le ratio de poids moyen est plus bas pour le groupe infecté par la souche sauvage que par le mutant. Les trois animaux ayant eu des comptes chez le mutant n'avaient rien de particulier au niveau de leur prise de poids, un avait pris un peu plus de poids que la moyenne dans son groupe, un autre se situait à la moyenne et l'autre n'avait pas pris de poids après les 48 heures.

Après les 6 jours, la tendance qu'on voyait précédemment est disparue et le ratio moyen est le même dans les deux groupes (figure 3.7 B).

La rate, le foie et le sang ont été récupérés, dilués et étalés sur gélose pour faire le compte des bactéries. Comme on voit dans la figure 3.7 C, la grande majorité des animaux n'avaient pas de

compte dans la rate. Deux animaux ont des comptes plus élevés dans le groupe mutant, mais ce résultat est sans importance statistique. Les résultats du sang ne sont pas montrés ici, mais aucun animal n'avait des comptes dans le sang et les résultats des comptes dans le foie montrent la même tendance qu'avec la rate.

4 DISCUSSION

RyfA est un petit ARN régulateur qui joue un rôle dans la régulation de virulence chez les UPEC. Celui-ci affecte la résistance au stress oxydatif et osmotique en plus de la motilité. L'objectif principal de ce mémoire était d'élucider le rôle du srARN chez *Salmonella*. D'abord, on a réalisé des tests phénotypiques. Ensuite, on a étudié les interactions entre les bactéries et des lignées cellulaires. Finalement, on a réalisé les infections chez le poulet pour comparer la virulence des mutants avec les WT.

4.1 Motilité

Comme c'est le cas chez les APEC et les UPEC, la motilité est augmentée quand *ryfA* est muté chez *Salmonella* (figure 3.1). Les cibles de RyfA chez *Salmonella* incluraient donc des régulateurs de la motilité. Puisque la régulation de la motilité est importante pour la virulence, augmenter la motilité pourrait diminuer la virulence de la bactérie (Josenhans & Suerbaum, 2002). L'expression des flagelles peut aussi avoir pour effet d'alerter le système immunitaire, induisant une forte réponse de l'immunité innée (Diepold & Armitage, 2015). Une bactérie qui exprime moins les flagelles peut donc échapper au système immunitaire plus facilement. On s'attend aussi à ce que certains fimbriae soient sous exprimés (Diepold & Armitage, 2015). Chez les UPEC, l'étude du transcriptome a montré que les gènes *fliC* étaient surexprimés quand RyfA est muté (figure 4.1). Le gène *fliC* code pour une sous-unité de flagelle et est présent chez *Salmonella* aussi avec un pourcentage élevé de conservation des séquences. RpoF et CheW sont aussi liés à la motilité et surexprimés (Bessaiah *et al.*, 2021).

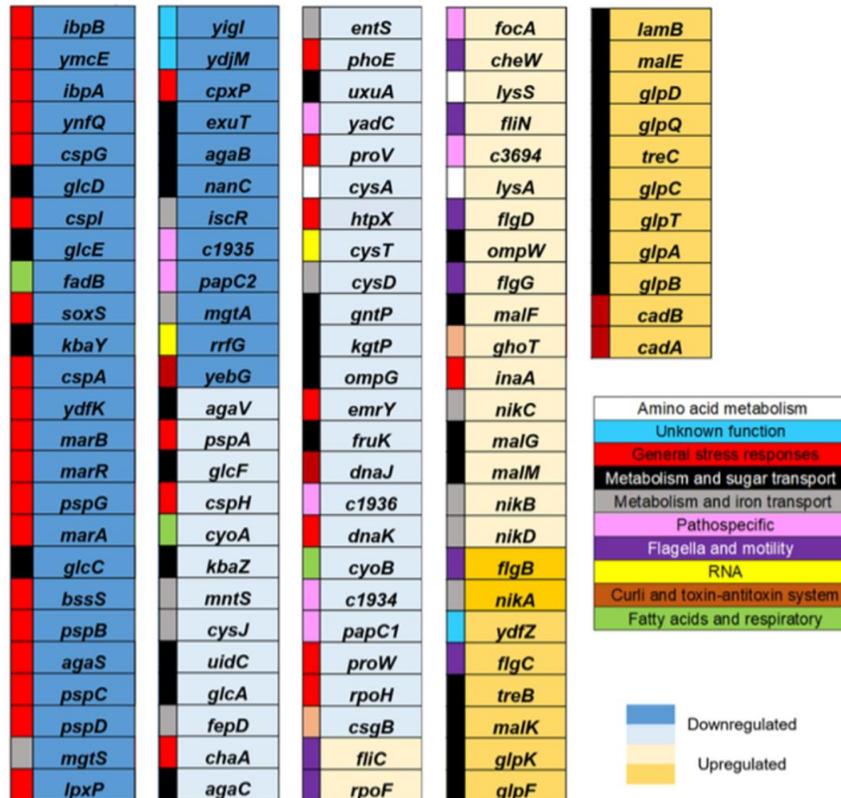


Figure 4.1 Étude de transcriptome quand *ryfA* est muté chez *E.coli* CFT073, tirée de (Bessaiah *et al.*, 2021)

Les gènes en bleus sont moins exprimés quand *RyfA* est muté et les gènes en jaune sont plus exprimés, la case à gauche du nom du gène correspond à la catégorie du gène selon le code de couleur à droite. Les gènes de réponse générale au stress sont nombreux à être sous-exprimés (en rouge).

4.2 Stress oxydatif

En ce qui concerne le stress oxydatif, les mutants *ryfA* de *Salmonella* SL1344 sont plus sensibles au peroxyde d'hydrogène (figure 3.2). Le même résultat avait été constaté chez les UPEC et la mutation de *RyfA* menait à une diminution de l'expression de *SoxS*, un régulateur général de la réponse au stress oxydatif (Bessaiah *et al.*, 2021). *OxyR* est aussi un régulateur qui serait plus important en présence de peroxyde d'hydrogène (Nathan & Shiloh, 2000). Celui-ci affecte plusieurs protéines reliées à la résistance au stress oxydatif. Le système immunitaire a recours à des ROS pour contrer les infections et une diminution de la résistance va affecter la capacité des bactéries de survivre dans les macrophages (Fàbrega & Vila, 2013; Farnell *et al.*, 2003). Chez UK-1, le mutant était plus résistant que le WT (figure 3.2). Il semblerait que les deux souches aient des différences au niveau de la réponse au stress oxydatif ce qui expliquerait que l'effet de *RyfA* soit différent.

Un résultat précédemment chez les UPEC était que la production de ROS par les phagocytes augmentait face au mutant RyfA (Bessaiah *et al.*, 2021). La sensibilité du mutant au stress oxydatif explique donc partiellement seulement que la survie dans les phagocytes diminue. Des tests pour mesurer la production de ROS n'ont pas été faits chez *Salmonella* et il serait intéressant de voir si c'est aussi le cas.

4.3 Biofilms

Concernant la production de biofilm, les résultats pour *Salmonella* UK-1 après 48 heures à la température de la pièce ont montré une tendance significative inverse aux résultats avec *E. coli* uropathogène CFT073 après 48 heures à 37°C (figure 3.3) (Bessaiah *et al.*, 2021). La température étant différente, on peut s'attendre à des différences pour cette raison. Le test de biofilm a été réalisé à 37°C pour *Salmonella*, mais très peu de biofilms étaient formés par UK-1 et SL1344, donc les tests suivants ont été faits à la température de la pièce. Souvent quand une mutation augmente ou diminue la motilité, celle-ci a l'effet contraire sur la formation de biofilm. Il serait intéressant de voir si la motilité à 20°C est augmentée chez le mutant RyfA de UK-1. Les résultats étaient aussi différents entre *Salmonella* SL1344 et *Salmonella* UK-1, bien que les génomes de ces deux souches soient très semblables. Le mutant de SL1344 produisait moins de biofilm que le WT (figure 3.3). Les deux souches affectent l'hôte de façon très différente. Il est possible que la régulation des biofilms soit légèrement distincte d'une souche à l'autre et soit en partie responsable de la différence de virulence. Dans ces conditions, CFT073 WT et CFT073 Δ ryfA produisaient autant de biofilm (figure 3.3). La régulation de la formation de biofilm est plutôt complexe. CsgD est l'inducteur principal de la formation du biofilm en activant l'expression d'EPS, du fimbriae curli et de cellulose. (Harrell *et al.*, 2021) Il est possible que ryfA ait un effet direct ou indirect sur CsgD. Il sera nécessaire de faire des expériences ultérieures pour confirmer cette possibilité.

4.4 Stress osmotique

Concernant le stress osmotique, on voit dans le tableau III certains résultats préliminaires. D'abord, *Salmonella* était très résistante à des hautes concentrations de NaCl, autant pour le mutant que pour la souche sauvage en accord avec la littérature sur *Salmonella* (Thayer *et al.*, 1987). Pour l'urée, on voyait une différence intéressante pour *Salmonella* UK-1. La souche mutante semble être plus résistante à l'urée que la souche sauvage pour UK-1 (tableau III). On sait que l'urée a un effet de dénaturation sur les protéines, mais il est difficile d'expliquer pourquoi

la mutation de *ryfA* aurait un effet protecteur pour la bactérie et ce seulement pour UK-1 (Raghunathan *et al.*, 2020). Il y a certains cas dans la littérature de petits ARN régulateurs qui régulent les uréases (Wen *et al.*, 2013) et c'est peut-être le cas pour RyfA. Il serait intéressant de faire un test quantitatif en étalant des dilutions de bactéries sur des géloses avec urée et en comptant le nombre de colonies. On pourrait aussi regarder l'expression de certains régulateurs de la résistance au stress osmotique (Thayer *et al.*, 1987).

4.5 Interactions cellules-bactéries

Concernant les tests d'association totale avec les cellules CEC-32 fibroblastes de poulet, ce test ne fait pas la distinction entre l'adhésion avec les cellules par l'entremise de différents organes d'adhésion et les bactéries qui ont envahi les cellules. Chez les UPEC, des fimbriae autres que le type 1 sont plus exprimés chez le mutant *ryfA* pour pallier la baisse du fimbriae de type 1 et il n'y avait pas de différence dans l'adhésion à des cellules de vessie entre la souche sauvage et la mutante (Bessaiah *et al.*, 2021). Chez *Salmonella*, on voit cependant que la souche Δ *ryfA* adhère moins aux fibroblastes de poulet que la souche sauvage (figure 3.5). De plus, l'ajout de mannose diminue l'association de la souche WT ce qui suggère un effet des fimbriae de type 1 différent de ce qui est observé chez les *E. coli* uropathogènes (Bessaiah *et al.*, 2021). Sachant que les fimbriae de type 1 chez *E. coli* et *Salmonella* ne sont pas des homologues proches et ont aussi une régulation complètement différente, il est concevable que l'effet de *ryfA* soit différent d'une espèce à l'autre (Dufresne & Daigle, 2017). Le même type de test avec des cellules épithéliales intestinales serait intéressant, car plus proche de recréer l'infection par *Salmonella*. Si les barres d'erreur sont aussi grandes dans ce test, c'est en partie à cause de la variabilité biologique normale et aussi l'utilisation de lignée immortalisée comporte certains désavantages. Une grande variabilité est introduite en fonction du nombre de passages et ces cellules ne se comportent pas comme les cellules primaires vu que ce sont des cellules cancéreuses qui se divisent à l'infini (Carter & Shieh, 2015).

On voit dans la figure 3.4, que les tests d'agglutination de levures ne montrent pas de différence entre le mutant et la souche sauvage. L'expression des fimbriae de type 1 serait donc la même chez le mutant et chez la souche sauvage selon ce test. Ces résultats mettent en doute les tests d'adhésion qui montraient un rôle plus important du fimbriae type 1 dans l'adhésion chez la souche sauvage que chez le mutant. Il est possible que les conditions différentes d'un test à l'autre diminuent l'effet des fimbriae de type 1. Également, le titre d'agglutination obtenu est plutôt

faible (autour de 3). Selon la littérature, *Salmonella* devrait agglutiner fortement en raison de son expression forte des fimbriae de type 1 (Ganner *et al.*, 2013).

On voit par les résultats des tests de survie dans les THP-1 que le mutant RyfA est moins retrouvé après 2 heures que la souche sauvage (figure 3.6). Puisque l'adhésion est diminuée chez le mutant, on peut supposer que la phagocytose et/ou l'invasion sont diminuées aussi. En fait, après 2 heures, on retrouve environ le double du compte au temps 0 pour le mutant et pour la souche sauvage (figure 3.6). On sait que *Salmonella* est capable de se répliquer dans les macrophages, donc ce résultat est attendu (Fàbrega & Vila, 2013). Après 24 heures, il y a une réduction de la croissance pour les deux souches (figure 3.6). Le mutant *ryfA* semble survivre mieux dans les macrophages que le WT, puisque sa diminution entre 2 et 24 heures est moins élevée que pour le WT.

On s'attendait à voir une diminution de l'expression de SPI-1 et le SPI-2 de *Salmonella* quand *ryfA* est muté. Ça ne semble pas être le cas ici. La régulation de SPI-2 est complexe et implique plusieurs régulateurs. D'abord, le SPI-2 code pour un système à deux composantes SpiR/SsrB qui est requis pour son expression (Fass & Groisman, 2009). Tous les promoteurs du SPI-2 peuvent lier la protéine activatrice SsrB. Le senseur SpiR est transmembranaire et répond à un signal inconnu (Fass & Groisman, 2009). Ensuite, d'autres protéines activent l'expression de SPI-2 : IHF, Fis, SlyA et les systèmes PhoP/PhoQ et OmpR/EnvZ (Fass & Groisman, 2009). HilD, un régulateur exprimé par le SPI-1, va aussi jouer un rôle important dans la transcription de ces gènes (Fass & Groisman, 2009). Il y a aussi des répresseurs de SPI-2 tels que H-NS, Hha et YdgT (Fass & Groisman, 2009). Comme les îlots de pathogénicité contiennent souvent un taux élevé de AT dans leur séquence, le répresseur H-NS a une affinité pour la séquence du SPI-2 (Fass & Groisman, 2009). Les activateurs de SPI-2 sont donc des antagonistes de H-NS, bloquant son action. Des études ont montré que HilD avait cet effet dans certaines conditions seulement (Fass & Groisman, 2009).

Les tests avec les macrophages ne différencient pas entre l'invasion initiée par la bactérie et la phagocytose initiée par les macrophages. Bien que *Salmonella* soit souvent associée aux macrophages et à la persistance et la réplication dans ceux-ci, l'invasion dans des cellules non-phagocytes est aussi importante dans son cycle d'infection (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). Il serait intéressant de tester l'invasion dans des cellules épithéliales intestinales. Une diminution de l'invasion quand *ryfA* est éliminé suggérerait un impact du petit ARN sur SPI-1.

Des études préliminaires ont été faites pour voir si la mutation de *ryfA* avait un effet sur la résistance au sérum de poulet et *Salmonella* était plutôt résistante au sérum autant pour le mutant

que pour la souche sauvage. Le sérum contient plusieurs protéines du complément, une composante importante de l'immunité innée qui mène à l'activation de la réponse adaptative (Sarma & Ward, 2011). La cascade initiée par le complément mène à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) qui va tuer les pathogènes en formant des pores dans les membranes (Miajlovic & Smith, 2014; Sarma & Ward, 2011). Une des façons pour les bactéries d'éviter l'action du sérum est d'avoir de l'acide sialique au niveau des LPS. D'autres molécules que la bactérie a à sa surface peuvent inactiver le complément (Dudek *et al.*, 2022). La capsule de polysaccharide peut aussi bloquer le complément. Une autre méthode de protection consiste à réprimer les porines telles que OmpC. Chez les uropathogènes, on voit que OmpC est surexprimé quand *ryfA* est muté (Bessaiah *et al.*, 2021). On sait que *Salmonella* a un mode de vie intracellulaire, mais ceci n'est pas obligatoire et donc la résistance de *Salmonella* au sérum a été observée (Sreekantapuram *et al.*, 2021). En effet, une publication concernant deux sérovars de *Salmonella* a montré que le sérum de poulet ne tuait pas les bactéries et n'inhibait pas leur croissance (Sreekantapuram *et al.*, 2021). Une expérience intéressante aurait été de faire une étude de transcriptome par RNAseq quand les bactéries sont dans le sérum. Bien que le sérum ne semble pas avoir d'impact sur la croissance, il est possible que certains gènes soient exprimés différemment en présence de sérum. Des études semblables ont été faites chez les UPEC, mais dans un milieu riche au milieu de la phase exponentielle de croissance (Bessaiah *et al.*, 2021). On a vu que plusieurs gènes étaient exprimés différemment dans ces conditions quand le gène de *ryfA* a été enlevé. Cependant, les conditions sont loin de représenter les conditions dans l'hôte.

4.6 Infections

Les infections chez les poussins avec *Salmonella* UK-1 doivent encore être optimisées. On voit dans ce premier essai que beaucoup moins d'animaux que prévu sont malades ou morts (figure 3.7C). On s'attendait à une LD₅₀ d'environ 10³ CFU (Porter & Curtiss, 1997) et nos doses plus élevées représentaient 20 fois et 200 fois cela.

C'est probablement l'âge des poussins qui explique la résistance des poussins à notre infection. En effet, il était difficile d'obtenir des poussins ayant exactement 1 jour de vie dans le contexte de l'expérience et donc nous avons des poussins ayant entre 1 et 3 jours de vie. Pour contrôler l'âge des poussins, il faudrait pouvoir avoir l'éclosion sur place. Les expériences qui ont été faites avec des poussins sensibles aux souches UK-1 avaient des poussins qui venaient tout juste d'éclore le jour même (Porter & Curtiss, 1997). En fait, les poussins étaient même à jeun et venaient de « sécher », quand ils ont été infectés par la voie orale (Porter & Curtiss, 1997). De cette façon,

on peut contrôler l'établissement du microbiote ce qui n'était pas possible dans notre expérience. En effet, le microbiote s'installe assez rapidement dans le système digestif des poulets avec 10^{10} par gramme de digestat 3 jours après l'éclosion (Ijaz *et al.*, 2021). L'utilisation de souches déjà passagées dans des poulets avant d'infecter peut aussi augmenter la virulence (Porter & Curtiss, 1997).

Dans la publication qui nous a guidés pour cette expérience (Porter & Curtiss, 1997), la LD_{50} est déterminée ainsi que la colonisation quand les poussins de 1 jour sont infectés avec une forte dose de 10^8 CFU. Cette étude reporte des signes de maladies tels que de la diarrhée et de la léthargie et la mort des poussins entre 3 et 10 jours après l'infection (Porter & Curtiss, 1997). La colonisation montrait environ 8,5 log CFU/g dans l'iléon 3 jours après l'infection. (Porter & Curtiss, 1997) Au même temps dans la rate, il y avait 7 log CFU/g.

On voit dans la figure 3.7A que les poussins ont pris moins de poids en moyenne après 48 heures dans le groupe WT que dans le groupe mutant. Après les 6 jours, la prise de poids des deux groupes est égale (figure 3.7B). Également, les quelques animaux à avoir perdu du poids durant l'expérience étaient dans le groupe WT avec la plus grande dose. Très peu d'animaux avaient des bactéries dans les organes récoltés (figure 3.7C). C'est dans le groupe mutant qu'on retrouvait trois animaux avec des comptes relativement élevés. Dans le groupe WT, on avait plutôt deux animaux au compte faible (figure 3.7C). Possiblement, si les animaux avaient été sacrifiés après 48 heures, on aurait des comptes plus élevés. Une hypothèse est que la réponse immunitaire était diminuée pour le mutant et donc, les animaux étaient moins affectés par l'infection et n'ont pas éliminé ces bactéries.

Une autre limitation était au niveau des organes qui ont été récoltés pour énumération des bactéries. En effet, UK-1 n'avait pas de résistance naturelle à un antibiotique et donc on n'a pas récolté de partie de l'intestin ou du colon. Les comptes auraient été composés de différentes espèces qu'on aurait eu du mal à différencier de notre souche sur gélose MacConkey. En récoltant la rate et le foie, on obtenait des comptes seulement dans le cas d'une infection systémique (Pucciarelli & García-Del Portillo, 2017). Toutefois, il est possible que certains des animaux aient eu des comptes élevés au niveau du site d'infection primaire (Pucciarelli & García-Del Portillo, 2017).

Le modèle des poulets a ses limitations avec *Salmonella*. Un modèle plus classique pour des infections avec *Salmonella* serait un modèle de souris sensibles NRAMP-, comme les souris BALB/c (Hapfelmeier & Hardt, 2005). Chez ce modèle, la bactérie cause une infection intestinale qui devient systémique. Cette infection est plus semblable à l'infection de *Salmonella enterica*

sérovar Typhi chez l'humain (Hapfelmeier & Hardt, 2005). Une publication reporte une LD₅₀ de 2,5x10⁴ CFU pour UK-1 chez des souris BALB/c, alors que SL1344 se situe à 7,8 x 10⁴ CFU (Hapfelmeier & Hardt, 2005).

4.7 Complémentation

Le premier essai pour la complémentation n'a pas rétabli un phénotype tel que le WT et la souche complémentée se comportait comme la souche mutante dans les tests de motilité et de stress oxydatif. Une de nos hypothèses était que la méthode Datsenko avait eu un impact imprévu sur le génome. En effet, l'expression de la recombinaison lambda red aurait pu causer une mutation dans le génome (Mosberg *et al.*, 2012). Des mutants par échange allélique ont donc été générés et la complémentation a été faite sur ceux-ci. Le phénotype de résistance au stress oxydatif (figure 3.2) a été rétabli avec celui-ci. Il serait important d'obtenir les résultats manquants avec la souche complémentée pour confirmer que tous les effets de *ryfA* sont bien entièrement dus à la mutation de ce petit ARN.

4.8 Le petit ARN TimR

Le rôle de TimR dans la cellule est toujours mystérieux. L'histoire de *ryfA* est incomplète si on ne peut répondre à la question : est-ce que ces effets sont indépendants de TimR ou causés par le déséquilibre des deux petits ARN et donc rétablis si les deux ARN sont mutés ? Le mutant TimR ainsi que ses résultats de phénotype auraient été intéressants pour avoir une image complète de cette régulation, mais ce mutant n'a pas été construit durant ma maîtrise malgré de nombreuses tentatives.

Des expériences dans notre laboratoire chez le mutant TimR des UPEC ont montré que TimR n'a pas d'effet sur la motilité (Carole Anamélé, non-publié). Cependant, d'autres résultats préliminaires suggèrent que TimR a un impact sur d'autres phénotypes (non-publié).

Théoriquement, une souche dans laquelle TimR a été muté est soumise à un stress si la production de RyfA est trop grande, le petit ARN est toxique pour la bactérie (Andresen *et al.*, 2020). Il est possible que ce soit la raison pour laquelle le mutant *timR* est si difficile à réaliser chez *Salmonella enterica*.

4.9 Expériences proposées

Une possible future expérience serait d'étudier l'expression des gènes dans la bactérie quand *ryfA* est muté. Des études de transcriptome n'ont pas encore été faites chez les APEC et *Salmonella*. En plus des gènes partagés par les souches comme ceux reliés au métabolisme et aux réponses aux stress, on s'intéresse à des gènes caractéristiques à *Salmonella* tels que les systèmes de sécrétion de type III (Fàbrega & Vila, 2013). Chez les APEC, on voudrait voir l'expression des fimbriae *pap* et *fim* (Kathayat *et al.*, 2021). L'étude de la réponse de l'hôte serait aussi plus complète avec des données de RT-PCR. La réponse immunitaire n'est pas seulement la production de ROS, mais implique différentes voies médiées par des cytokines et interleukines (Genovese *et al.*, 2013).

Également, le sujet des cibles de RyfA est encore inexploré. On sait que plusieurs gènes sont affectés par la mutation de *ryfA*, mais ceci peut être l'impact direct ou indirect de RyfA. Avec des expériences de MAPS (*MS2-affinity purification and sequencing*) en collaboration avec le groupe d'Éric Massé à l'Université de Sherbrooke, on va pouvoir savoir avec quelles cibles RyfA interagit directement (Carrier *et al.*, 2016).

Une hypothèse qui est aussi encore à tester serait l'effet de la mutation de RyfA sur la résistance aux antibiotiques. On prévoit que muter le petit ARN pourrait rétablir la sensibilité de bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques.

5 CONCLUSION

L'objectif principal de cette maîtrise était de déterminer l'impact de *ryfA* sur la virulence de *Salmonella* chez la volaille. Les résultats de phénotypes présentés dans ce mémoire donnent un début de réponse, mais des résultats d'infections plus concluants seraient nécessaires pour appuyer ceux-ci. Lors de notre infection chez les poussins avec *Salmonella* UK-1, l'âge des poussins et le fait d'utiliser des souches non-passées dans les animaux ont réduit la virulence et la colonisation des bactéries. En ce qui concerne les interactions entre les cellules et les bactéries, on a vu une tendance que la délétion de *ryfA* chez *Salmonella* UK-1 diminuerait l'association avec certaines lignées de cellules et la survie dans les macrophages, mais d'autres tests restent à faire pour le confirmer. Les tests d'adhésion avec mannose suggèrent que les fimbriae de type 1 sont aussi sous-exprimés quand *ryfA* est absent. Cependant, on a démontré que *ryfA* est important pour réguler la motilité et pour la résistance au stress oxydatif. En effet, le mutant *ryfA* avait un phénotype hypermotile et était plus sensible au peroxyde d'hydrogène. On a aussi démontré que chez *Salmonella* UK-1, la production de biofilm augmente et que chez *Salmonella* SL1344, elle diminue. Finalement, *ryfA* ne semblait pas affecter la résistance au sérum de poulet de *Salmonella*.

Dans ce projet, l'expression des gènes quand *ryfA* est muté chez *Salmonella* n'a pas été étudiée, mais ces données fourniraient une partie importante de l'histoire. Il serait intéressant de comparer ces données avec celles chez les UPEC.

Ces travaux de maîtrise confirment que le petit ARN *ryfA* a des effets sur la motilité, la résistance au stress oxydatif et l'adhésion chez *Salmonella* et qu'il pourrait être important pour la virulence, mais d'autres expériences sont encore à faire.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Aguirre A, Cabeza ML, Spinelli SV, McClelland M, García Vescovi E & Soncini FC (2006) PhoP-induced genes within *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* 188(19):6889-6898.
- Andresen L, Martínez-Burgo Y, Zangelin JN, Rizvanovic A, Holmqvist E & Storz G (2020) The Small Toxic *Salmonella* Protein TimP Targets the Cytoplasmic Membrane and Is Repressed by the Small RNA TimR. *mBio* 11(6):e01659-01620.
- Babior B (2000) Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine* 109:33-44.
- Bak G, Lee J, Suk S, Kim D, Young Lee J, Kim K-s, Choi B-S & Lee Y (2015) Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility and fimbriae formation in *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 5(1):15287.
- Bessaiah H, Pokharel P, Loucif H, Kulbay M, Sasseville C, Habouria H, Houle S, Bernier J, Massé É, Van Grevenynghe J & Dozois CM (2021) The RyfA small RNA regulates oxidative and osmotic stress responses and virulence in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLOS Pathogens* 17(5):e1009617.
- Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B & Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277(5331):1453-1462.
- Bloch S, Węgrzyn A, Węgrzyn G & Nejman-Faleńczyk B (2017) Small and Smaller—sRNAs and MicroRNAs in the Regulation of Toxin Gene Expression in Prokaryotic Cells: A Mini-Review. *Toxins* 9(6):181.
- Breland EJ, Eberly AR & Hadjifrangiskou M (2017) An Overview of Two-Component Signal Transduction Systems Implicated in Extra-Intestinal Pathogenic *E. coli* Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7(162).
- Carrasco E, Morales-Rueda A & García-Gimeno RM (2012) Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International* 45(2):545-556.
- Carrier MC, Lalaouna D & Massé E (2016) A game of tag: MAPS catches up on RNA interactomes. *RNA Biol* 13(5):473-476.
- Carter M & Shieh J (2015) Chapter 14 - Cell Culture Techniques. *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)*, Carter M & Shieh J (Édit.) Academic Press, San Diego <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800511-8.00014-9>. p 295-310.
- Chambers JR & Gong J (2011) The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Research International* 44(10):3149-3159.
- Chan K, Baker S, Kim CC, Detweiler CS, Dougan G & Falkow S (2003) Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 185(2):553-563.
- Clark L, Perrett CA, Malt L, Harward C, Humphrey S, Jepson KA, Martinez-Argudo I, Carney LJ, La Ragione RM, Humphrey TJ & Jepson MA (2011) Differences in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain invasiveness are associated with heterogeneity in SPI-1 gene expression. *Microbiology (Reading)* 157(Pt 7):2072-2083.
- Crépin S, Harel J & Dozois CM (2012a) Chromosomal complementation using Tn7 transposon vectors in Enterobacteriaceae. *Applied and environmental microbiology* 78(17):6001-6008.

- Crépin S, Houle S, Charbonneau M-È, Mourez M, Harel J & Dozois CM (2012b) Decreased expression of type 1 fimbriae by a *pst* mutant of uropathogenic *Escherichia coli* reduces urinary tract infection. *Infection and immunity* 80(8):2802-2815.
- Curtiss III R & Hassan JO (1996) Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54(1-4):365-372.
- Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6640-6645.
- Diepold A & Armitage JP (2015) Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1679).
- Domínguez-Acuña L & Portillo FG-d (2022) Ferrous Iron Uptake Is Required for *Salmonella* to Persist within Vacuoles of Host Cells. *Infection and Immunity* 90(6):e00149-00122.
- Dozois CM, Daigle F & Curtiss R, 3rd (2003) Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1):247-252.
- Dudek B, Rybka J, Bugła-Płoskońska G, Korzeniowska-Kowal A, Futoma-Kołoch B, Pawlak A & Gamian A (2022) Biological functions of sialic acid as a component of bacterial endotoxin. *Front Microbiol* 13:1028796.
- Dufresne K & Daigle F (2017) *Salmonella* Fimbriae: What is the Clue to Their Hairdo? Current Topics in *Salmonella* and Salmonellosis, Mihai M (Édit.) *IntechOpen*, Rijeka10.5772/67189. p Ch. 4.
- Dufresne K, Saulnier-Bellemare J & Daigle F (2018) Functional Analysis of the Chaperone-Usher Fimbrial Gene Clusters of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8:26-26.
- Emody L KM, Nagy G. (2003) Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22:29-33.
- Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antão EM, Laturnus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Böhnke U, Steinrück H, Philipp HC & Wieler LH (2007) Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* 297(3):163-176.
- Ewing WH, Davis BR, Fife MA & Lessel EF (1973) Biochemical Characterization of *Serratia liquefaciens* (Formerly *Enterobacter liquefaciens*) an *Serratia rubidaea* (Stapp) and Designation of Type and Neotype Strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 23(3):217-225.
- Fàbrega A & Vila J (2013) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26(2):308-341.
- Farnell MB, Crippen TL, He H, Swaggerty CL & Kogut MH (2003) Oxidative burst mediated by toll like receptors (TLR) and CD14 on avian heterophils stimulated with bacterial toll agonists. *Dev Comp Immunol* 27(5):423-429.
- Fass E & Groisman EA (2009) Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* 12(2):199-204.
- Ferrari RG, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EES & Conte-Junior CA (2019) Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal Based Foods: a Meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 85(14):e00591-00519.

- Fris ME, Broach WH, Klim SE, Coschigano PW, Carroll RK, Caswell CC & Murphy ER (2017) Sibling sRNA RyfA1 Influences *Shigella dysenteriae* Pathogenesis. *Genes* (Basel) 8(2).
- Ganner A, Stoiber C, Uhlik JT, Dohnal I & Schatzmayr G (2013) Quantitative evaluation of *E. coli* F4 and *Salmonella* Typhimurium binding capacity of yeast derivatives. *AMB Express* 3(1):62.
- Garai P, Gnanadhas DP & Chakravorty D (2012) *Salmonella* enterica serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence* 3(4):377-388.
- Genovese KJ, He H, Swaggerty CL & Kogut MH (2013) The avian heterophil. *Developmental & Comparative Immunology* 41(3):334-340.
- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA & Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 6(5):343-345.
- Green ER & Meccas J (2016) Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr* 4(1).
- Groisman EA, Duprey A & Choi J (2021) How the PhoP/PhoQ System Controls Virulence and Mg²⁺ Homeostasis: Lessons in Signal Transduction, *Pathogenesis, Physiology, and Evolution. Microbiology and Molecular Biology Reviews* 85(3):10.1128/membr.00176-00120.
- Gulig PA & Curtiss R, 3rd (1987) Plasmid-associated virulence of *Salmonella* typhimurium. *Infect Immun* 55(12):2891-2901.
- Hacker J & Kaper JB (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54:641-679.
- Hapfelmeier S & Hardt W-D (2005) A mouse model for *S. typhimurium* induced enterocolitis. *Trends in Microbiology* 13(10):497-503.
- Harrell JE, Hahn MM, D'Souza SJ, Vasicek EM, Sandala JL, Gunn JS & McLachlan JB (2021) *Salmonella* Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Front Cell Infect Microbiol* 10:624622.
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC & Ala'Aldeen D (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(4):692-744.
- Hsieh SA & Allen PM (2020) Immunomodulatory Roles of Polysaccharide Capsules in the Intestine. *Front Immunol* 11:690.
- Ibarra JA & Steele-Mortimer O (2009) *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol* 11(11):1579-1586.
- Ijaz A, Veldhuizen EJA, Broere F, Rutten V & Jansen CA (2021) The Interplay between *Salmonella* and Intestinal Innate Immune Cells in Chickens. *Pathogens* 10(11).
- Imada K (2018) Bacterial flagellar axial structure and its construction. *Biophys Rev* 10(2):559-570.
- Josenshans C & Suerbaum S (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* 291(8):605-614.
- Kaniga K, Compton MS, Curtiss R, 3rd & Sundaram P (1998) Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* 66(12):5599-5606.
- Kaper JB, Nataro JP & Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2):123-140.

- Kathayat D, Lokesh D, Ranjit S & Rajashekara G (2021) Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens* 10(4).
- Kato A & Groisman EA (2008) The PhoQ/PhoP Regulatory Network of *Salmonella enterica*. *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*, Utsumi R (Édit.) Springer New York, New York, NY10.1007/978-0-387-78885-2_2. p 7-21.
- Kenney LJ (2019) The role of acid stress in *Salmonella* pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 47:45-51.
- Kramer J, Özkaya Ö & Kümmerli R (2020) Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology* 18(3):152-163.
- Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JF, Oakford L, Yüksel Ü, Giedroc DP & Romeo T (1997) The RNA Molecule CsrB Binds to the Global Regulatory Protein CsrA and Antagonizes Its Activity in *Escherichia coli* *. *Journal of Biological Chemistry* 272(28):17502-17510.
- Luo Y, Kong Q, Yang J, Mitra A, Golden G, Wanda S-Y, Roland KL, Jensen RV, Ernst PB & Curtiss R, III (2012) Comparative Genome Analysis of the High Pathogenicity *Salmonella* Typhimurium Strain UK-1. *PLOS ONE* 7(7):e40645.
- Maleki F, Khosravi A, Nasser A, Taghinejad H & Azizian M (2016) Bacterial Heat Shock Protein Activity. *J Clin Diagn Res* 10(3):BE01-03.
- Manges AR (2016) *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clinical Microbiology and Infection* 22(2):122-129.
- Martin MJ, Thottathil SE & Newman TB (2015) Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers. *Am J Public Health* 105(12):2409-2410.
- Massé E & Gottesman S (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7):4620-4625.
- Miajlovic H & Smith SG (2014) Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiol Lett* 354(1):1-9.
- Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockett CV, Jones BD & Warren JW (1990) Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infection and Immunity* 58(5):1281-1289.
- Mosberg JA, Gregg CJ, Lajoie MJ, Wang HH & Church GM (2012) Improving Lambda Red Genome Engineering in *Escherichia coli* via Rational Removal of Endogenous Nucleases. *PLOS ONE* 7(9):e44638.
- Muller CM, Aberg A, Straseviciene J, Emody L, Uhlin BE & Balsalobre C (2009) Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS Pathog* 5(2):e1000303.
- Nathan C & Shiloh MU (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16):8841-8848.
- Nyachuba DG (2010) Foodborne illness: is it on the rise? *Nutrition Reviews* 68(5):257-269.
- Porter SB & Curtiss R, 3rd (1997) Effect of inv mutations on *Salmonella* virulence and colonization in 1-day-old White Leghorn chicks. *Avian Dis* 41(1):45-57.
- Pucciarelli MG & García-Del Portillo F (2017) *Salmonella* Intracellular Lifestyles and Their Impact on Host-to-Host Transmission. *Microbiol Spectr* 5(4).

- Raghunathan S, Jaganade T & Priyakumar UD (2020) Urea-aromatic interactions in biology. *Biophys Rev* 12(1):65-84.
- Sarma JV & Ward PA (2011) The complement system. *Cell Tissue Res* 343(1):227-235.
- Sreekantapuram S, Berens C, Barth SA, Methner U & Berndt A (2021) Interaction of *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella* Enteritidis with peripheral leucocytes of hens with different laying performance. *Vet Res* 52(1):123.
- Steele-Mortimer O, Brumell JH, Knodler LA, Méresse S, Lopez A & Finlay BB (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(1):43-54.
- Thayer DW, Muller WS, Buchanan RL & Phillips JG (1987) Effect of NaCl, pH, temperature, and atmosphere on growth of *Salmonella typhimurium* in glucose-mineral salts medium. *Appl Environ Microbiol* 53(6):1311-1315.
- Tripathi L, Zhang Y & Lin Z (2014) Bacterial Sigma Factors as Targets for Engineered or Synthetic Transcriptional Control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2.
- Uribe-Querol E & Rosales C (2017) Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Front Immunol* 8:1368.
- Waksman G & Hultgren SJ (2009) Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7(11):765-774.
- Waters LS & Storz G (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136(4):615-628.
- Wen Y, Feng J & Sachs G (2013) *Helicobacter pylori* 5'ureB-sRNA, a cis-encoded antisense small RNA, negatively regulates ureAB expression by transcription termination. *J Bacteriol* 195(3):444-452.
- Wessels K, Rip D & Gouws P (2021) *Salmonella* in Chicken Meat: Consumption, Outbreaks, Characteristics, Current Control Methods and the Potential of Bacteriophage Use. *Foods* 10(8).
- Wiles TJ, Kulesus RR & Mulvey MA (2008) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 85(1):11-19.
- Wright DN & Lockhart WR (1965) Effects Of Growth Rate And Limiting Substrate On Glucose Metabolism In *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* 89(4):1082-1085.

