

**ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS**

**UNIVERSITÉ DE TOURS**

**FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »**

Année 2020-2021

N° 41

**THÈSE D'EXERCICE**

**pour le**

**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

Marie Morillon née le 10 janvier 1994 à Tours

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

24 septembre 2020

**Influence des conditions environnementales retrouvées au sein du microbiote et des paramètres physiologiques de l'hôte sur l'expression des facteurs d'entrée de *Salmonella* Typhimurium**

JURY

Président : **DIMIER-POISSON Isabelle Professeur des Universités Faculté de pharmacie- Tours**

Membres :

**GREPINET Olivier Ingénieur INRA- Nouzilly**

**BRIANT Stéphanie Pharmacienne d'officine- Tours**

**BAUDOUIN Maxime Pharmacien d'officine- Tours**

**ANNEE : 2019 - 2020**

**Directrice : Pr Véronique MAUPOIL**

**Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS**

**Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN**

## **ENSEIGNANTS**

### **17 PROFESSEURS**

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAudeau	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

### **2 PROFESSEURS EMERITES**

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES

### **38 MAITRES DE CONFERENCES**

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BOUESOCQUE-DELAJE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE

**DELAYE**  
**DENEVAULT**  
**DOUZIECH-EYROLLES**  
**DUMAS**  
**GERMON**  
**GLEVAREC**  
**HERVE-AUBERT**  
**JUSTE**  
**LAJOIE**  
**LANOUE**  
**MARC**  
**MARCHAIS**  
**MAVEL**  
**MUNNIER**  
**OMBETTA-GOKA**  
**UDIN**  
**PASQUALIN**  
**PRIE**  
**RESAUD**  
**SOUCE**  
**TAUBER**  
**VELGE-ROUSSEL**  
**VERCOILLIE**  
**VERGOTE**  
**VIERRON**  
**ZHANG**

**Pierre-Olivier**  
**Caroline**  
**Laurence**  
**Jean-François**  
**Stéphanie**  
**Gaëlle**  
**Katel**  
**Matthieu**  
**Laurie**  
**Arnaud**  
**Jillian**  
**Hervé**  
**Sylvie**  
**Emilie**  
**Jean-Edouard**  
**Audrey**  
**Côme**  
**Gildas**  
**Renaud**  
**Martin**  
**Clovis**  
**Florence**  
**Johnny**  
**Jackie**  
**Emilie**  
**Bei-Li**

CHIMIE THERAPEUTIQUE  
CHIMIE THERAPEUTIQUE  
AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE  
BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE  
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE  
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE  
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE  
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE  
BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES  
PHARMACIE GALENIQUE  
CHIMIE THERAPEUTIQUE  
PHARMACIE GALENIQUE  
CHIMIE ORGANIQUE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE  
PHARMACOLOGIE  
CHIMIE ORGANIQUE  
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE  
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
PHARMACOLOGIE

## 1 DIRECTEUR DE RECHERCHE

**CHALON**

**Sylvie**

INSERM

## 2 CHARGES DE RECHERCHE

**MEVELEC**  
**MOIRE**

**Marie-Noëlle**  
**Nathalie**

INRA  
INRA

## 1 PRAG

**WALTERS-GALOPIN**

**Susan**

ANGLAIS

## 3 AHU

**FOUCAULT**  
**FOUCAULT-FRUCHARD**  
**MARLET**

**Amélie**  
**Laura**  
**Julien**

HEMATOLOGIE  
PHARMACIE CLINIQUE  
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

## 4 ATER

**BILLET**  
**DRIOUCH**  
**LAKHRIF**  
**VERGES**

**Kevin**  
**Abderrazzak**  
**Zineb**  
**Valentin**

BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
FORMATIONS BIO3 INSTITUTE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE



## SERMENT DE GALIEN

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

Date :

L' tudiant

--  
Morillon Marie, le  
24/09/2020

Le Doyen de la Faculté  
Mme Véronique Maupoil



## Remerciements

*Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de thèse Olivier Grépinet pour m'avoir accompagnée, pour sa gentillesse mais aussi sa rigueur qui m'ont permis d'avancer durant la rédaction de ma thèse et la préparation de ma soutenance, ainsi que Mme Dimier-Poisson pour sa disponibilité, son soutien et son aide précieuse tout au long de mes études.*

*Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe SPVB de l'INRA et plus particulièrement Isabelle Virlogeux-Payant et Isabelle Lantier sans qui je n'aurais pas pu réaliser les manipulations, et avancer sur mon travail.*

*Je tiens à remercier mes amis de fac qui m'ont été d'une grande aide durant mes études pour voir les choses plus positivement et moins stressantes, surtout Mallia, ma cops, qui sera sûrement très g n e en lisant ces lignes mais sans qui rien n'aurait été pareil, sans oublier Adrien mon ringard préféré, Antoine, Bouix, Pierre, Efflam, Paul, Julien, Charles, Rémi, Emilien, Mathieu, et mes binômes préférés Muco et Benoit.*

*Je tiens aussi à remercier mes amis de l'extérieur, du lycée, qui m'ont permis de garder la tête sur les épaules et de penser à autre chose que la fac, je remercie donc L a mon ancienne colocataire qui a su me supporter pendant trois belles années, mon amie depuis plus de 10 ans et j'en suis sûre pour la vie, ainsi que Guigui, Steve, Arthur, Alban, Thomas, Matthieu, Edouard, Martin , JB, Alex, Raph, Pierro, Eliott et tous les autres avec qui on grave petit à petit de superbes souvenirs et des moments inoubliables.*

*Je tiens bien sûr à remercier toute ma belle et grande famille que j'aime plus que tout et plus particulièrement ma mère, mon père et mon frère qui ont vécu mon parcours depuis le début et qui ont su trouver les mots justes pour me motiver, m'apaiser, me réconforter. Ainsi que tous mes cousins Camille, Pauline, Charlotte, Antoine, Romain, Baptiste, Nicolas, Vincent, Thomas, Elise et Antoine. Et toi mon Martin qui est aussi mon ami de tous les jours et sans qui je n'aurais pas fait de belles rencontres tel que le Guet-apens. Sans oublier les petits derniers de la famille Gabin et Paul que*

*j'aime déjà de tout mon cœur ainsi que mes oncles et tantes et mes grands-parents qui se sont investis tout au long de mon parcours et qui ont su me rendre fière, sans oublier toi papy qui est parti trop tôt.*

*Et bien sûr je te remercie toi, Maxime, pour tout ce qu'on a pu vivre et ce que l'on vivra encore ensemble, je te touche le nez.*

## Résumé

La salmonellose est l'une des maladies d'origine alimentaire la plus répandue dans le monde. *Salmonella* Typhimurium est un des sérotypes les plus incriminés dans cette pathologie responsable de gastro-entérites aiguës sans aggravation mais pouvant devenir mortelles chez les sujets les plus fragiles. Dans le but de coloniser son hôte, l'entérobactérie doit pénétrer dans la muqueuse intestinale en utilisant des cellules phagocytaires ou en déclenchant sa propre internalisation à l'aide des 3 facteurs d'entrée actuellement identifiés : le système de sécrétion de type 3 n°1 (T3SS-1) et deux invasines, Rck et PagN. Face à l'impact de cet agent pathogène, nous avons cherché à mieux comprendre son mécanisme d'action *in vivo*, et plus particulièrement la cinétique d'expression de ces 3 facteurs d'entrée dans un modèle murin d'infection systémique létale, en utilisant l'imagerie par bioluminescence pour visualiser l'activité transcriptionnelle des fusions construites à cet effet. Ainsi, nous avons mis en évidence une cinétique d'expression précoce du T3SS-1 et la transcription du gène *pagN* au sein de 2 organes : le caecum et les ganglions mésentériques. Les conditions d'expression de ces facteurs d'entrée *in vitro* ont également été étudiées en utilisant des molécules rencontrées par la bactérie dans le tractus intestinal au cours de l'infection. Parmi les métabolites testés, le thiosulfate et le succinate semblent potentialiser l'activation du facteur d'entrée le plus connu dans la littérature, le T3SS-1, et donc favoriser la colonisation de l'hôte par *S. Typhimurium*. A l'heure actuelle, seuls les traitements symptomatiques sont utilisés chez les patients atteints de gastro-entérite aiguë d'origine infectieuse. Une nouvelle classe de médicaments sont néanmoins de plus en plus prescrits et utilisés : les probiotiques. Ces derniers peuvent être pris aussi bien dans un but prophylactique que thérapeutique. Des travaux indiquent que certains de ces potentiels probiotiques semblent réduire les symptômes et soulager les patients. Cependant, beaucoup d'études semblent remettre en cause leur efficacité et très peu justifient leur bénéfice en terme de santé.

## Abstract

Salmonellosis is one of the most common foodborne diseases in the world. *Salmonella* Typhimurium is one of the most implicated serotypes in this pathology responsible for acute gastroenteritis without aggravation but which can become fatal with most fragile subjects. In order to colonize its host, the Enterobacteriaceae must enter the intestinal mucosa using phagocytic cells or by triggering its own internalization using the 3 entry factors currently identified: the type 3 secretion system number one (T3SS-1) and two invasins, Rck and PagN. Faced with the impact of this pathogen, we sought to better understand its mechanism of action in vivo, and more particularly the kinetics of expression of these 3 input factors, by using bioluminescence imaging to visualize the transcriptional activity of fusions constructed for this purpose in a murine model of lethal systemic infection. Thus, we have demonstrated the early expression kinetics of T3SS-1 and the transcription of the pagN gene in 2 organs: the cecum and the mesenteric ganglia. The conditions for the expression of these entry factors in vitro have also been studied using molecules encountered by the bacteria in the intestinal tract during infection. Among the metabolites tested, thiosulfate and succinate appear to potentiate the activation of the entry factor best known in the literature, T3SS-1, and therefore promote colonization of the host by *S. Typhimurium*. Currently, only symptomatic treatments are used in patients with acute infectious gastroenteritis. A new class of drugs are nevertheless increasingly prescribed and used: probiotics. These can be taken for both prophylactic and therapeutic purposes. Research indicates that some of these potential probiotics appear to reduce symptoms and provide relief for patients. However, many studies seem to question their effectiveness and very few justify their health benefits

## Listes des abr vations

**AHLs** : Acyl-Homos rine-Lactones

**ANSES** : Agence Nationale de S curit  Sanitaire de l'alimentation de l'Environnement et du travail

**ATCC** : American Type Culture Collection

**CDD** : Charge Coupled Device

**CT** : Commission de Transparence

**DO** : Densité Optique

**EGF<sub>R</sub>** : Récepteur de l'Epidermal Growth Factor

**HAS** : Haute Autorité de Santé

**IL-8** : Interleukine 8

**IVIS** : In Vivo Imaging System

**LPM** : Low Phosphate Magnesium

**MICI** : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

**NAC** : Nouveaux Animaux de Compagnie

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ORF** : Cadre de lecture ouvert

**PCR** : Polymerase de Réaction en Chaîne

**P.I** : Post. Inoculation

**RCK** : Resistance to Complement Killing

**ROI** : Region Of Interest

**SPVB** : Signalisation, Portage, Virulence Bactérienne

**SCV** : *Salmonella* Containing Vacuole

**SRO** : solution de réhydratation orale

**TIAC** : Toxi Infection Alimentaire Collective

**TSA** : Tryptone Soja Agar

**TSB** : Bouillon de Tryptone Soja

**T3SS** : Type 3 Secretion System

**T3SS-1** : Appareil de sécrétion de type 3 n 1

**UFC** : Unité Formant des Colonies

## Table des matières

Introduction.....	13
<b>I. <i>Salmonella</i> Typhimurium .....</b>	<b>13</b>
<b>1-1 Taxonomie et caractéristiques.....</b>	<b>13</b>
<b>1-2 Epidémiologie.....</b>	<b>13</b>
<b>1-3 Symptômes et diagnostic .....</b>	<b>15</b>
<b>1-4 Traitements et préventions .....</b>	<b>15</b>
<b>II. Les mécanismes d'invasion de <i>S. Typhimurium</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>2-1 Mécanisme dépendant du T3SS-1 .....</b>	<b>23</b>
<b>2-2 Mécanisme indépendant du T3SS-1 .....</b>	<b>24</b>
<b>III. Contexte et sujet d'étude : .....</b>	<b>25</b>
Matériels et méthodes.....	28
<b>I. Plasmides, souches bactériennes et conditions de croissance utilisées .....</b>	<b>28</b>
<b>II. Transformation bactérienne .....</b>	<b>28</b>
<b>2-1 Choc thermique .....</b>	<b>28</b>
<b>2-2 Electroporation .....</b>	<b>30</b>
<b>III. Validation des fusions transcriptionnelles .....</b>	<b>31</b>
<b>3-1 Fusion Prck-<i>lux</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>3-2 Fusion PinvF-<i>lux</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>3-3 Fusion PpagN-<i>lux</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>IV. Criblage de différentes molécules et fluides biologiques .....</b>	<b>33</b>
<b>V. Construction des plasmides utilisés pour la transposition.....</b>	<b>35</b>
<b>5-1 Restriction et purification sur colonne .....</b>	<b>35</b>
<b>5-2 Ligature .....</b>	<b>35</b>
<b>VI. Intégration chromosomique des différentes fusions .....</b>	<b>36</b>
<b>6-1 Transformation dans la souche 14028 contenant le pHSG415-tnsABCD .....</b>	<b>36</b>
<b>6-2 Vérification des clones par PCR .....</b>	<b>36</b>
<b>VII. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....</b>	<b>36</b>
<b>7-1 Mélange réactionnel et programme .....</b>	<b>36</b>
<b>7-2 Electrophorèse en gel d'agarose.....</b>	<b>38</b>

<b>VIII. Infection expérimentale sur souris.....</b>	<b>38</b>
<b>8-1 Préparation des inoculums .....</b>	<b>38</b>
<b>8-2 Description de la manipulation préliminaire.....</b>	<b>38</b>
<b>8-3 Description de la seconde manipulation <i>in vivo</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>8-4 Bactériologie .....</b>	<b>42</b>
Résultats.....	43
<b>I. Validation des fusions transcriptionnelles.....</b>	<b>43</b>
<b>II. Criblages de molécules biologiques.....</b>	<b>45</b>
<b>III. Expression <i>in vivo</i> des facteurs d'entrée.....</b>	<b>45</b>
<b>3-1 Fusion constitutive Psig70_c35-<i>lux</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>3-2 Expression de InvF (T3SS-1).....</b>	<b>47</b>
<b>3-3 Expression de l'invasine PagN .....</b>	<b>47</b>
<b>3-4 Bilan de la manipulation préliminaire <i>in vivo</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>IV. Intégration chromosomique des fusions transcriptionnelles .....</b>	<b>51</b>
<b>V. Analyse de l'activité des fusions Psig70_c35-<i>lux</i> et PpagN-<i>lux</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>5-1 Comparaison des activités des fusions en fonction du sens d'intégration .....</b>	<b>52</b>
<b>5-2 Comparaison des activités des fusions en fonction du support génétique.....</b>	<b>53</b>
<b>VI. Seconde manipulation <i>in vivo</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>6-1 Fusion Psig70_c35-<i>lux</i> chromosomique.....</b>	<b>55</b>
<b>6-2 Fusion PpagN-<i>lux</i> chromosomique .....</b>	<b>57</b>
<b>6-3 Bilan de la seconde manipulation <i>in vivo</i> .....</b>	<b>58</b>
Discussion.....	60
Conclusion.....	69
Résumé.....	6
Bibliographie.....	70

## Liste des Figures

Figure 1: Recommandations de la Haute Autorité de Santé pour la prise en charge de la gastro entérite aiguë.....	17
Figure 2: Répartition de la flore intestinale d'après (20) .....	19
Figure 3: Les probiotiques utilisés chez l'Homme d'après (26).....	21
Figure 4: Les 3 voies d'entrées de <i>Salmonella</i> d'après (28).....	23
Figure 5: Représentation de l'îlot de pathogénicité SPI-1 de <i>S. Typhimurium</i> et de la localisation de la zone intergénique étudiée pour le promoteur du gène <i>invF</i> (d'après Ellermeier and Slauch 2007). .....	26
Figure 6: Régulation de l'expression du gène codant la protéine Rck et ses promoteurs (39) .....	27
Figure 7: Représentation schématique du locus <i>pagN</i> de <i>S. Typhimurium</i> .....	27
Figure 8: Principe de la construction des fusions transcriptionnelles (40) .....	31
Figure 9: Chronologie de la manipulation <i>in vivo</i> .....	40
Figure 10: Chronologie de la seconde manipulation <i>in vivo</i> .....	41
Figure 11 : Validation par test <i>in vitro</i> des différentes fusions transcriptionnelles plasmidiques luminescentes dans <i>S. Typhimurium</i> 14028.....	44
Figure 12 : Imagerie <i>in vivo</i> de souris infectées par <i>S. Typhimurium</i> 14028 portant les différentes fusions transcriptionnelles plasmidiques.....	49
Figure 13 : Imagerie des organes <i>ex vivo</i> de souris inoculées avec la souche portant la fusion <i>ppagn-lux</i> . ....	50
Figure 14: Comparaison de l'activité des constructions plasmidiques et chromosomiques des fusions <i>ppagn-lux</i> et <i>Psig70_c35-lux</i> . ....	53
Figure 15 : Représentation schématique de l'intégration chromosomique des fusions transcriptionnelles dans <i>S. Typhimurium</i> 14028 (sens Forward).....	54
Figure 16 : Imagerie <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> de souris portant la souche avec la fusion <i>Psig70_c35-lux</i> chromosomique.....	56
Figure 17 : Imagerie <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> de souris portant la souche avec la fusion <i>PpagN-lux</i> chromosomique.....	58
Figure 18 : Utilisation des métabolites du microbiote pour le cycle de Krebs de <i>Salmonella</i> (44).....	61



## Liste des Tableaux

Tableau I : Plasmides et souches bactériennes utilisés dans cette étude. ....	29
Tableau II : Produits biologiques utilisés et testés au TECAN.....	34
Tableau III : Amorces PCR utilisées dans cette étude.....	37
Tableau IV : Composition du mélange réactionnel pour une PCR avec 23 $\mu$ L du mix pour 2 $\mu$ L d'ADN (volumes en $\mu$ L pour 8 tubes).....	37

## Introduction

### **I. *Salmonella* Typhimurium**

#### **1-1 Taxonomie et caractéristiques**

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et comporte actuellement 2 espèces : *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*. L'espèce *enterica* est elle-même divisée en 6 sous-espèces : *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* et enfin *enterica* qui fait l'objet de notre recherche. Il existe plus de 2500 sérotypes de *Salmonella* résultant de différentes combinaisons antigéniques avec 3 antigènes majeurs : l'antigène O, l'antigène H et l'antigène capsulaire Vi (1). Un classement des sérotypes en fonction des antigènes O et H est retrouvé dans le schéma de Kauffmann-White (2).

Les salmonelles sont des bacilles Gram négatifs, aéro-anaérobies facultatifs, flagellés, et mesurant entre 0,7 µm et 1,5 µm de largeur et 2 à 5 µm de longueur. Elles sont prototrophes, c'est-à-dire qu'elles se cultivent facilement dans des milieux minimum sans nécessité de facteurs de croissance. Les conditions optimales de croissance sont une température de 37°C et un pH neutre.

#### **1-2 Epidémiologie**

Au sein de l'espèce *S. enterica* sous-espèce *enterica*, les deux sérotypes les plus fréquemment isolés dans le monde après une infection d'origine alimentaire sont *S. Enteritidis* à hauteur de 65% et *S. Typhimurium* à 12%. En effet, ces 2 sérotypes sont responsables de la majorité des infections chez l'Homme et les animaux à sang chaud. Malgré une amélioration en terme de prévention, on estime à 93,8 millions le nombre de cas de gastro-entérites chez l'Homme dans le monde dues à *Salmonella* spp (1).

La capacité de *S. Typhimurium* à infecter un large éventail d'hôtes est problématique avec des répercussions différentes en fonction de l'espèce. En effet chez la souris, *S. Typhimurium* va induire une infection systémique ressemblant à la typhoïde chez l'Homme (3) alors que chez le porc et les bovins cela se manifestera par une simple gastro-entérite (4). De plus, l'infection

par ces sérotypes dits ubiquistes peut se traduire chez les animaux, comme la volaille, par du portage asymptomatique engendrant dans les pays industrialisés un problème à la fois économique avec les élevages contaminés et un problème en terme de santé publique.

En effet, les salmonelles d'origine animale peuvent ensuite être retrouvées dans les aliments ingérés par l'Homme et les contaminer (5). Ainsi, d'après le rapport de l'Anses 2017, l'infection par *Salmonella* est la 2<sup>ème</sup> cause des gastro-entérites d'origine alimentaire en Europe (viande telle que la volaille, œufs, produits laitiers et produits carnés) et le premier agent pathogène confirmé après déclaration obligatoire dans les foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en France. Par définition, une TIAC correspond à l'apparition d'au moins deux cas similaires au niveau de la symptomatologie, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. Récemment, plusieurs sérotypes de *Salmonella* ont été responsables d'incidents médiatisés concernant la contamination de produits alimentaires. En 2017 en France, des préparations de lait en poudre ont été contaminés par *Salmonella* Agona infectant 36 nourrissons, et entraînant le rappel des produits dans plus de 50 pays par le laboratoire Lactalis (6,7). Les Etats-Unis et le Canada sont aussi concernés par les infections d'origine alimentaire, notamment en 2013 avec une épidémie suite à la consommation de graines de Chia contaminées par plusieurs sérotypes de *Salmonella* (8), ou plus récemment encore en 2018 la souche *Salmonella* Mbandaka a entraîné 136 cas de salmonelloses causant 34 hospitalisations dans 36 états différents après consommation de céréales de la marque Kellogg's (6). L'ensemble de ces incidents entraîne donc à la fois un coût pour le pays mais aussi un risque pour l'Homme.

En plus des infections d'origine alimentaires, on estime que 3 à 5% des cas de salmonelloses chez l'Homme sont associées au contact d'animaux de compagnie exotiques tels que les reptiles ou encore les amphibiens appelés les NAC (nouveaux animaux de compagnie) (9). En effet, il est connu que les animaux à sang froid tels que les tortues sont considérées comme source d'infection par *Salmonella* avec leur portage asymptomatique. Aux Etats-Unis, l'achat de certaines espèces a même été interdite en 1975 car jugées trop dangereuses pour l'Homme. Les bactéries sont excrétées dans les fèces de l'animal entraînant un réel risque de contamination pour le propriétaire ainsi que pour son environnement (eau et sol) qui devient source de danger (10). Entre 2011 et 2013, une épidémie a été déclarée dans plusieurs états

d'Amérique entraînant 473 cas de salmonelloses suite à un contact avec des tortues de petites tailles (11).

Les mécanismes de contamination sont plus complexes dans les pays en voie de développement et certaines pathologies telles que le paludisme ou le VIH prédisposent à une invasion de la bactérie et à un risque de décès des patients. On estime que *Salmonella* est à l'origine d'environ 681 000 décès suite à une complication et 57% de ces décès sont survenus en Afrique (12).

### **1-3 Symptômes et diagnostic**

La majorité des infections par *S. Typhimurium* provoque des gastro-entérites sans gravité, et reste confinée au niveau de l'iléon terminal et du côlon. Les premiers symptômes apparaissent après un temps d'incubation d'environ 24 h à 48 h. Ils se manifestent par de la fièvre, des frissons, nausées, vomissements, crampes abdominales et diarrhée (5) et disparaissent spontanément chez les personnes immunocompétentes au bout de quelques jours.

Cependant, des complications plus graves comme la bactériémie peuvent apparaître chez certaines populations de patients telles que les nourrissons, les personnes immunodéprimées ou ceux atteints de malnutrition. Les infections systémiques touchent 5 % des personnes infectées. Afin de diagnostiquer les gastro-entérites causées par *Salmonella*, seule la coproculture est valable.

### **1-4 Traitements et préventions**

Pour les personnes souffrant de gastro-entérites non compliquées, il n'est pas recommandé d'avoir recours à l'antibiothérapie. De plus, le mésusage des antibiotiques a entraîné l'apparition de résistances chez différents sérotypes de *Salmonella*, dont *S. Typhimurium*, face à des antibiothérapies comme la Ceftriaxone et l'Ampicilline (13,14). C'est pourquoi il est aujourd'hui recommandé d'avoir recours à d'autres traitements dits de soutien et de confort ainsi que de privilégier la prévention pour améliorer les conditions de vie du patient.

### **1-4-1 Les traitements de soutien**

Afin de compenser les pertes hydriques dues à la symptomatologie et dans le but de prévenir les complications et hospitalisations chez les sujets fragiles (personnes âgées, immunodéprimées ou encore les enfants), des traitements de soutien sont utilisés (15,16) :

- Les solutions de réhydratation orale (SRO) en première intention chez les enfants et les adultes souffrant de diarrhée aiguë de toute causes avec une déshydratation légère à modérée.
- L'administration nasogastrique de SRO pour les patients de tout âge avec une déshydratation modérée ne pouvant tolérer une ingestion directe par voie orale.
- Des liquides intraveineux isotoniques (NaCl) peuvent être administrés en cas de déshydratation grave ou échec de traitement par SRO.

### **1-4-2 Les traitements de confort**

De plus, face aux symptômes gênants et dans le but de soulager les patients, des traitements de confort peuvent être recommandés voire prescrits :

- Les médicaments anti-diarrhéiques anti-sécrétoires tels que le Lopéramide (exemple Imodium®), recommandé par la commission de transparence (CT) en 2018 qui va à la fois inhiber la motricité intestinale et diminuer la sécrétion intestinale hydroélectrolytique. Il existe aussi le Racécadotril (Tiorfan®) qui possède une action anti-sécrétoire pure sans ralentir le transit intestinal.
- Les médicaments considérés comme antiseptiques intestinaux : le Diosmectite (Smecta®) qui a le pouvoir de fixer les toxines d'origines bactérienne et virale ainsi que de pansement digestif à base d'argile.
- Les anti-nauséeux et antiémétiques tels que les médicaments à base de Dompéridone (comme le Motilium®), de Métoclopramide (tel que le Primperan®) ou encore de Métopimazine (Vogalène®) sont indiqués dans les cas de nausées et vomissements de gastro-entérites. La Haute Autorité de Santé (HAS) a publié en avril 2019 (17) que la prescription de ces médicaments doit être envisagée seulement en cas de vomissement ayant à court terme des complications graves ou gênantes. De plus, compte tenu de leurs effets indésirables, tels des troubles cardiaques graves et des troubles

neurologiques, ces médicaments sont à éviter chez le sujet âgé et seul le Métoclopramide peut être utilisé chez l'enfant.

- Les anti-spasmodiques tel que le Phloroglucinol/+Triméthylphloroglucinol (Spasfon®) sont indiqués dans le traitement symptomatique des douleurs liées aux troubles fonctionnels du tube digestif selon l'avis de la CT de 2017.

La HAS a publié un tableau de recommandations en 2006 pour la prise en charge de la diarrhée aiguë sans signes de gravité (**Figure 1**).

3<sup>e</sup> vague de réévaluation des médicaments - 2006

## **Diarrhées aiguës sans signe d'invasion muqueuse (Gastro-entérites saisonnières et "tourista" \*)**

### ÉVITER TOUTE DÉSHYDRATATION

#### Chez l'adulte jeune en bonne santé - Une approche diététique

Il faut corriger la déshydratation due à la diarrhée par une boisson suffisante (au moins 2 litres par jour).

- Éviter certains aliments tels que les fruits et légumes verts, les plats épicés, les plats ou boissons glacés. Dans ces conditions, la diarrhée cesse spontanément en 3 ou 4 jours.
- Pour le confort du patient, envisager éventuellement la prescription d'un ralentisseur du transit (type loperamide).
- En cas de vomissements répétés, envisager de recourir à une réhydratation parentérale.

#### Populations fragiles

##### – Chez l'enfant :

##### Administer des solutés de réhydratation orale (SRO) dès que possible.

La déshydratation est une complication d'autant plus grave que l'enfant est jeune. Il faut l'éviter par l'utilisation aussi précoce que possible de solutés de réhydratation orale (SRO), dont l'efficacité a été largement démontrée\*\*.

- Si une déshydratation modérée s'est déjà installée, l'alimentation sera interrompue durant 4 à 6 heures (l'allaitement au sein peut être poursuivi), puis reprise pour ne pas prolonger un déficit calorique.
- En cas de déshydratation sévère, l'hospitalisation s'impose pour assurer une réhydratation par voie parentérale.

##### – Chez le sujet âgé :

##### Une fragilité à ne pas sous-estimer

La déshydratation est particulièrement à risque dans cette population. Elle est susceptible de conduire à des complications d'affections déjà existantes. Une surveillance accrue du sujet est à mettre en œuvre.

#### À tout âge

Surveiller les signes éventuels d'invasion muqueuse (glaires ou sang dans les selles...).

De tels signes peuvent conduire à demander une coproculture, à la recherche d'une infection à salmonelles, à shigelles, à *Campylobacter jejuni* ou à certains *Escherichia coli* entéro-invasifs.

Le nifuroxazide, dont l'efficacité thérapeutique est mal établie, n'est pas le traitement recommandé dans l'indication des diarrhées aiguës présumées d'origine infectieuse.

La Haute Autorité de santé a attribué, aux médicaments ayant pour principe actif le nifuroxazide, un SMR insuffisant pour justifier leur prise en charge par la solidarité nationale\*\*\*.

\* Les diarrhées aiguës sans signe d'invasion muqueuse observées en France sont pour la plupart d'origine virale (gastro-entérites épidémiques saisonnières).

La "tourista" est plus souvent bactérienne, mais en général non invasive.

\*\* Ces solutés (remboursables depuis juin 2003) permettent de maintenir ou de restaurer l'équilibre hydro-électrolytique. Le sachet de poudre (dont le contenu associe des glucides, un alcalinisant, du potassium et du chlore) doit être dilué dans de l'eau minérale et administré régulièrement à l'enfant au biberon ou au verre par petites quantités, aussi fréquemment que nécessaire, selon sa soif.

\*\*\* Les praticiens gardent la possibilité de prescrire ces médicaments. Certaines spécialités de nifuroxazide en gélules (pour adultes et enfants de plus de 6 ans) sont disponibles sans ordonnance.

### Figure 1 : Recommandations de la Haute Autorité de Santé pour la prise en charge de la gastro entérite aiguë

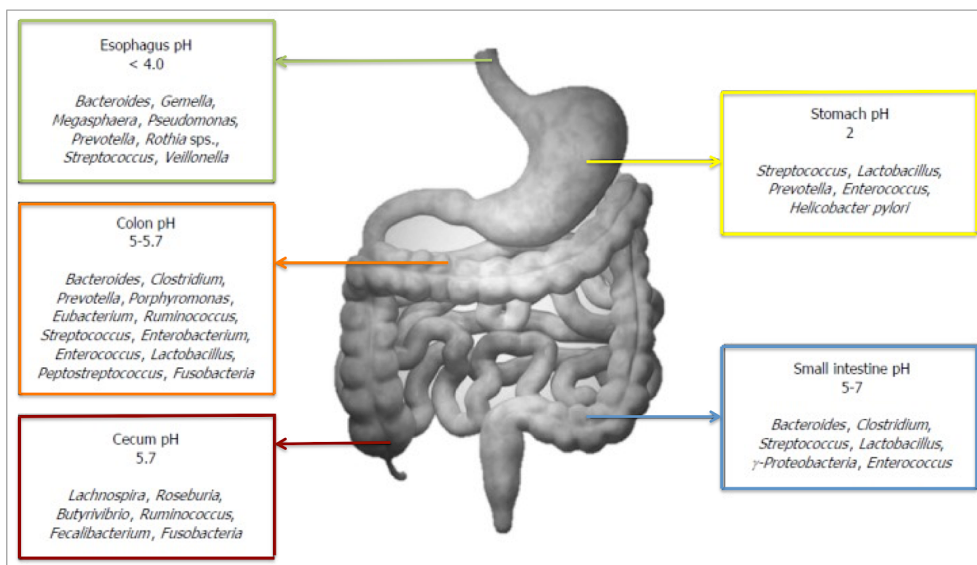
L'HAS a publié en 2006 ses recommandations concernant la prise en charge des gastro entérites saisonnières et infectieuses, notamment éviter la déshydratation, d'autres recommandations particulières ont été rédigées pour les sujets fragiles.

### 1-4-3 Prévention et mesures d'hygiène

Il n'existe actuellement aucun vaccin disponible pour la prévention des salmonelloses non typho ides. La meilleure protection reste à ce jour la mise en place de mesures d'hygiène alimentaire adéquates. Par exemple, une bonne cuisson des aliments en particulier des viandes, ainsi que la consommation d'œufs plutôt cuits que crus sont recommandées chez les personnes les plus vulnérables (18). Enfin, il est conseillé de se laver les mains après contact avec des NAC ou des personnes contaminées. En plus des règles hygiéno-diététiques, il se développe de plus en plus des traitements prophylactiques comme les probiotiques qui auraient un effet bénéfique pour prévenir et réduire les symptômes des diarrhées d'origines infectieuses.

#### 1-4-3-1 La place du microbiote intestinal dans le tractus digestif

Le microbiote intestinal humain ou animal correspond à l'ensemble des micro-organismes vivant en symbiose avec notre corps ; il est constitué de champignons, virus, parasites et bactéries non pathogènes. Sa composante bactérienne est dominante et diffère tout au long du tube digestif par sa variété et son nombre, allant de 1000 bactéries dans l'estomac jusqu'à  $10^{12}$  bactéries dans le côlon (**Figure 2**), les 2 phylums (embranchements) majoritaires étant les Bacteroidetes et les Firmicutes (19).



**Figure 2 : Répartition de la flore intestinale d'après (20)**

Cette figure illustre la composition du microbiote dans les différentes parties du tractus intestinal, en vert l'œsophage, en jaune l'estomac, en orange le côlon, en rouge le caecum et en bleu l'intestin grêle avec les segments duodénum, jéjunum et iléum.

A la naissance notre tube digestif est stérile, la composition du microbiote va dépendre de différents facteurs. Le mode d'accouchement, le type d'alimentation dans les premiers jours de vie, l'hygiène, l'environnement ou la prise de médicaments vont avoir un impact et une influence sur la colonisation bactérienne du tractus digestif. Tout au long de notre vie, le microbiote restera relativement stable avec néanmoins des changements ponctuels suite par exemple à une infection. Cependant, si les variations sont trop récurrentes, le risque de problèmes de santé pour l'hôte est augmenté. En effet, de nombreux rôles ont été attribués au microbiote tels que le métabolisme des nutriments, le métabolisme des xénobiotiques et médicaments, l'immunomodulation et la protection face aux agents pathogènes (20). Le microbiote possède un rôle important dans le maintien de la barrière intestinale afin de préserver son équilibre et d'assurer au mieux ses fonctions et sa structure, assurant la santé de l'hôte. Chez un individu sain, le microbiote vit en symbiose avec son hôte, empêchant les pathogènes de proliférer. En revanche, si l'équilibre est rompu, comme après une antibiothérapie à large spectre, il y a un risque de multiplication des bactéries potentiellement pathogènes aux dépens des bactéries commensales, on parle alors de dysbiose. Cette dysbiose est impliquée dans un large éventail de maladies comme l'obésité, le diabète de type 1, les



maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (21), mais aussi dans les salmonelloses. En effet, il a été prouvé que le microbiote protège contre les agents pathogènes diarrhéiques comme *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* (22). Par exemple, des études ont montré que des souris traitées par Streptomycine ont été plus sensibles à l'inflammation et la colonisation intestinale par *Salmonella* que les souris non traitées (23).

#### 1-4-3-2 L'intérêt des probiotiques

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants pouvant apporter des avantages à la santé humaine lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate. Les prébiotiques sont quant à eux considérés comme des ingrédients alimentaires non digestibles pouvant avoir un effet bénéfique sur la santé, en stimulant la croissance ou l'activité d'une ou plusieurs bactéries résidant dans le côlon (24). L'ajout d'un prébiotique au probiotique potentialiserait l'effet de ce dernier, l'ensemble est appelé synbiotique. Les mécanismes d'action des probiotiques consistent à renforcer la communauté des bactéries commensales, à supprimer la croissance des agents pathogènes, à moduler la réponse immunitaire pour médier la sécrétion de cytokines, et à stimuler la prolifération de cellules immunitaires et épithéliales pour fortifier la barrière intestinale (25). Depuis quelques années, beaucoup de probiotiques sont retrouvés sur le marché, néanmoins ces derniers doivent répondre à des critères de sécurité et de fonctionnalité. En effet, la sécurité des souches est définie tout d'abord par son origine, son caractère non pathogène et son profil de résistance aux antibiotiques. De plus, ils doivent pouvoir survivre dans le tractus digestif tout en conservant leur effet immunomodulateur. Les probiotiques commercialisés doivent aussi maintenir leurs propriétés tout au long du processus de production et de distribution. L'ensemble de ces contraintes explique pourquoi la liste des probiotiques utilisés chez l'Homme comprend majoritairement des espèces bactériennes appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus* (26) (**Figure 3**).

Type <i>Lactobacillus</i>	Type <i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Autres micro-organismes
<i>L. acidophilus</i> (a), *			
<i>L. amylovorus</i> (b), *			
<i>L. casei</i> (a), (b), *			
<i>L. gasseri</i> (a), *	<i>B. adolescentis</i> (a)		
<i>L. helveticus</i> (a), *	<i>B. animalis</i> (a), *	<i>Enterococcus faecium</i> (a)	<i>Bacillus clausii</i> (a), *
<i>L. johnsonii</i> (b), *	<i>B. bifidum</i> (a)	<i>Lactococcus lactis</i> (b), *	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (a)
<i>L. pentosus</i> (b), *	<i>B. breve</i> (b)	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (boulardi)
<i>L. plantarum</i> (b), *	<i>Infantis</i> (a)	(a), *	(a), *
<i>L. reuteri</i> (a), *	<i>B. longum</i> (a), *		
<i>L. rhamnosus</i> (a), (b), *			

a) Principalement sous forme de produits pharmaceutiques; b) principalement comme additifs alimentaires; \* Micro-organismes QPS (Qualified Presumption of Safety).

**Figure 3 : Les probiotiques utilisés chez l'Homme d'après (26)**

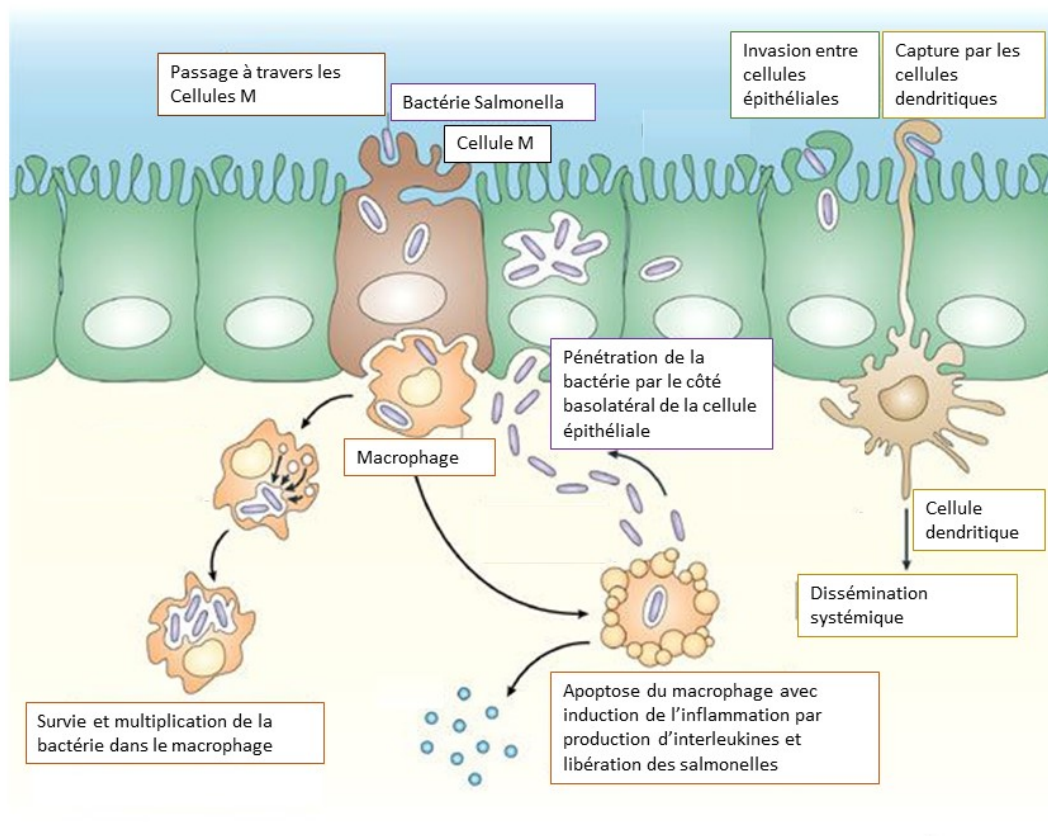
Listes non exhaustives des probiotiques utilisées comme produits pharmaceutiques ou additifs alimentaires chez l'Homme.

L'efficacité des probiotiques reste controversée avec des applications variées et dans de nombreux domaines tels que les allergies, les MICI, les cancers colorectaux, les pathologies vaginales, les infections urinaires ou encore les diarrhées. Une méta-analyse a récemment évalué l'effet des probiotiques sur la diarrhée infectieuse aiguë, pour cela les auteurs ont recherché toutes les études réalisées sur le sujet entre 1966 et 2010. Les essais étaient randomisés ou semi-randomisés pour comparer un placebo avec un probiotique chez des personnes ayant des diarrhées infectieuses présumées ou avérées. Au total, 63 études ont été retenues, soit 8014 patients ; 56 essais sur 63 concernaient des enfants. Les résultats ont montré qu'aucun effet secondaire n'a été attribué aux probiotiques, avec au contraire une réduction moyenne de 25 heures de la durée de la diarrhée et un apport de bénéfices sur la fréquence des selles (27). Néanmoins, les auteurs considèrent que, malgré les résultats encourageants, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour définir une stratégie d'utilisation adaptée à chaque groupe spécifique de patients.

## II. Les mécanismes d'invasion de *S. Typhimurium*

L'infection par *Salmonella* commence tout d'abord par une contamination par voie orale après ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. Une fois l'acidité gastrique franchie, elle atteint la lumière intestinale. Afin de coloniser le tractus intestinal, *Salmonella* doit traverser la barrière épithéliale, soit de manière passive à l'aide de cellules phagocytaires (telles que les cellules dendritiques) ou par l'intermédiaire de cellules non phagocytaires (comme les cellules M), soit de manière active en déclenchant sa propre internalisation dans les cellules non phagocytaires (28) (**Figure 4**). Il existe 2 mécanismes d'internalisation : le premier, le plus connu, est le mécanisme Trigger nécessitant un système de sécrétion de type 3 (T3SS), le deuxième est le mécanisme Zipper utilisant des invasines. Après avoir pénétré dans les cellules, la bactérie se retrouve dans des vacuoles appelées SCV (*Salmonella* Containing Vacuole) (29) où elle se multiplie et provoque l'apoptose des cellules infectées accompagnée d'une réponse inflammatoire importante avec la production de TNF $\alpha$  et d'IL-8.

Une fois la barrière épithéliale franchie, les bactéries vont devoir surmonter la réponse immunitaire de l'hôte (macrophages, neutrophiles et monocytes) pour ensuite disséminer vers les organes profonds (rate et foie) et se répliquer.



**Figure 4 : Les 3 voies d'entrées de *Salmonella* d'après (28)**

Cette figure illustre les différentes voies d'entrée de *Salmonella* pour franchir l'épithélium intestinal : **1)** par les cellules M, **2)** par les entérocytes et **3)** à l'aide des cellules phagocytaires. Une fois du côté sub-épithélial, les bactéries peuvent disséminer de façon systémique.

## 2-1 Mécanisme dépendant du T3SS-1

Le mécanisme Trigger est médié par les protéines effectrices du T3SS-1 (pour Type 3 Secretion System), les gènes codant ces protéines sont localisés sur l'îlot de pathogénicité 1 (SPI-1). La transcription des gènes de l'îlot débute par les gènes de structure régulés par HilA, puis par les gènes codant les effecteurs régulés par InvF (**Figure 5**). L'entrée dans les cellules nécessite des conditions particulières retrouvées dans la lumière intestinale avec un pH proche de 8 et une forte osmolarité. Après être entrée en contact avec la cellule eucaryote, la bactérie va insérer son translocon dans la membrane plasmique de la cellule hôte pour injecter un certain nombre de protéines (SipA, SipC, SopE, SopB, SopE<sub>2</sub>...). SipA et SipC lient directement l'actine pour empêcher sa dépolymérisation et SopB, SopE et SopE<sub>2</sub> stimulent les

protéines de la famille des Rho GTPases (Rac1 et Cdc42) qui vont initier la polymérisation de l'actine via le complexe Arp2/3. Cela va entraîner un fort réarrangement du cytosquelette d'actine avec l'apparition d'ondulations que l'on nomme « Ruffles ». Ces modifications membranaires sont transitoires et vont permettre l'internalisation de la bactérie dans des vacuoles à l'intérieur de la cellule. Le retour à la normale se fait grâce à une autre protéine effectrice SptP qui inactive les GTPases (30).

Ce système d'invasion est exprimé dans l'environnement intestinal, il possède aussi un rôle dans l'inflammation en activant des voies pro-inflammatoires à partir de ses effecteurs (31). Le T3SS-1 est considéré comme le facteur d'invasion cellulaire prépondérant de *Salmonella* et a donc été très étudié. De nombreuses études *in vivo* ont montré son rôle dans la pathogénie, notamment pour la colonisation intestinale.

## **2-2 Mécanisme indépendant du T3SS-1**

*Salmonella* peut aussi envahir les cellules de l'hôte par un mécanisme dit de « fermeture éclair » (Zipper) grâce à deux invasines : Rck et PagN.

### **2-2-1 Rck :**

La protéine de membrane externe Rck (Resistance to complement killing) est une invasine qui possède aussi la capacité d'inhiber les voies du complément, protégeant la bactérie contre l'opsonisation et donc de la lyse. En terme de structure, la protéine Rck appartient à la famille des protéines Ail/Lom qui sont des protéines de membrane externe de 17 à 19 kDa possédant une structure secondaire commune, c'est-à-dire huit feuillets bêta transmembranaires et quatre boucles exposées à la surface de la bactérie (32). Le gène codant Rck se trouve sur l'opéron *pefI-srgC* présent sur le plasmide de virulence de *Salmonella*. Seuls les sérotypes Typhimurium, Enteritidis et Bovismorbificans possèdent l'opéron *pefI-srgC*. La bactérie va exprimer cette protéine dans des conditions particulières à 37°C en présence de AHLs (Acyl-Homosérine-Lactones) et du régulateur du quorum sensing SdiA (33) afin d'interagir avec le récepteur du facteur de croissance épidermique EGF<sub>R</sub> présent à la surface de la cellule hôte

(34). Cette interaction active une cascade de signalisation et conduit à un faible réarrangement membranaire afin de permettre l'internalisation de la bactérie.

*Salmonella* n'étant pas capable de produire d'AHLs, la régulation positive de l'opéron *pefI-srgC* par SdiA est par conséquent dépendante d'autres bactéries capables de produire ces petites molécules diffusibles. Une activation de SdiA a pu être observée lorsque des souris ont été inoculées préalablement avec *Y. enterocolitica*, une bactérie productrice d'AHLs qui ne se trouve pas normalement dans le tractus digestif de ces animaux, confirmant ainsi l'activation possible du régulon SdiA dans l'intestin en présence de bactéries productrices d'AHLs (35).

### **2-2-2 PagN :**

L'invasine PagN est une protéine de membrane externe codée par le gène *pagN*, qui est régulé par le système PhoP/PhoQ et n'est connue pour être exprimée que dans des milieux mimant les conditions retrouvées dans la vacuole avec un pH acide et une concentration en ions  $Mg^{2+}$  faible (36). Cette expression intracellulaire suggère que, en plus de son rôle d'invasine, PagN pourrait intervenir dans la sortie de *Salmonella* des macrophages ou des cellules épithéliales (37). Ainsi, PagN permettrait de faciliter les interactions entre *Salmonella* et les cellules de mammifères dans des conditions spécifiques qui ne permettent pas l'expression de SPI-1 et donc l'utilisation du T3SS-1. Les rôles de PagN sont encore mal définis et sembleraient être aussi bien l'invasion que l'adhésion par la liaison aux protéoglycanes cellulaires (38).

Le gène codant PagN est chromosomique et, à l'inverse de Rck, l'invasine PagN est largement distribuée dans le genre *Salmonella* (39).

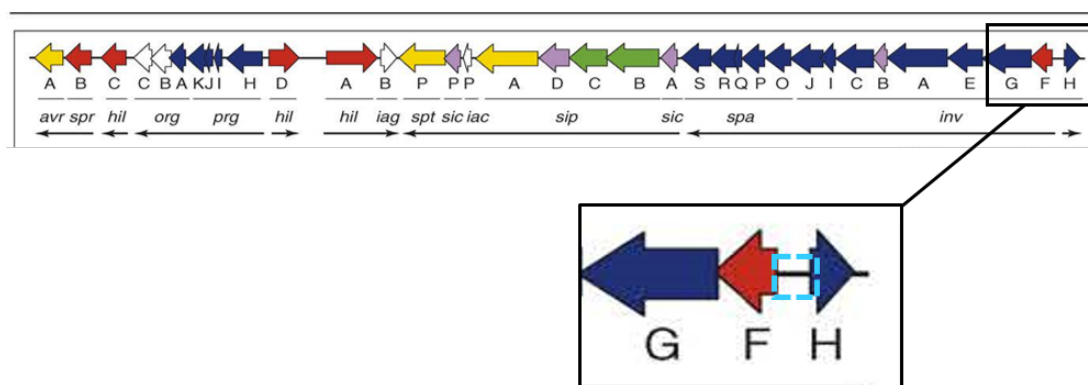
## **III. Contexte et sujet d'étude :**

Récemment, des systèmes T3SS-1 indépendants faisant intervenir les invasines Rck et PagN ont été décrits. Leur rôle dans la virulence de *S. Typhimurium* est encore mal connu et ces deux protéines ne sont pas exprimées *in vitro* en conditions de culture standard. Notamment, aucune donnée n'existe sur la cinétique d'expression de ces différents facteurs d'entrée *in*

*vivo*. De plus, les conditions environnementales et les composantes du microbiote intestinal pouvant activer l'expression de ces facteurs d'entrée sont très peu connues.

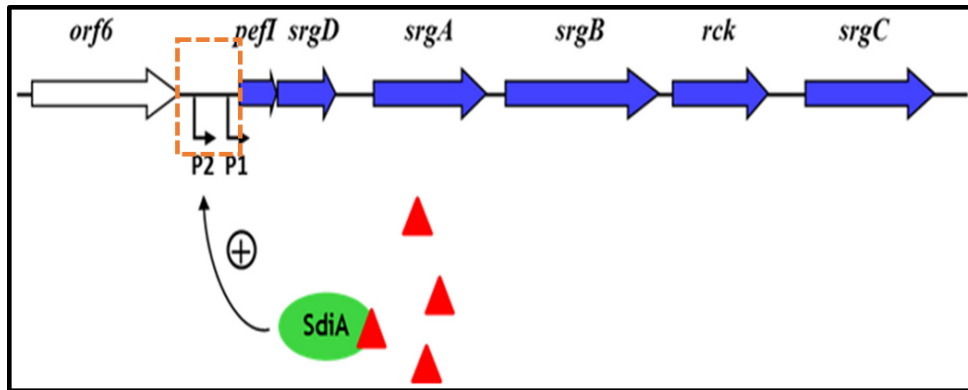
Avant mon arrivée dans l'équipe SPVB (Signalisation, Portage et Virulence Bactérienne), 3 fusions transcriptionnelles plasmidiques avec les promoteurs des facteurs d'entrée de *S. Typhimurium* en amont de l'opéron *luxCDABE* dépourvu de son promoteur ont été construites. Pour étudier l'activité du T3SS-1, il a été choisi d'utiliser le promoteur *invF* de l'opéron *invF-spaS* qui code les protéines de structure du T3SS-1 et qui est transcrit précocement au cours de son activation (**Figure 5**). Pour Rck, la région intergénique se situant en aval de *orf6* et en amont de *pefI* a été clonée en amont de l'opéron *lux* car elle contient les 2 promoteurs identifiés de l'opéron *pefI-srgC* portant l'ORF *rck* (**Figure 6**). Enfin pour PagN, le promoteur n'étant pas identifié, il a donc été choisi de cloner la région intergénique en amont du gène *pagN* qui est un monotranscrit (**Figure 7**). Une quatrième fusion témoin a été utilisée, elle possède le promoteur sig70\_c35 qui est constitutif.

Le premier objectif a été de valider ces fusions. Puis les fusions ont été utilisées : pour premièrement étudier l'impact de différents produits et liquides biologiques présents dans le microbiote intestinal, rencontrés par *Salmonella* au cours d'une infection, sur l'expression des facteurs d'entrée *in vitro*, et enfin pour rechercher les sites d'expression et la cinétique de ces facteurs d'entrée en modèle murin d'infection systémique létale.



**Figure 5 : Représentation de l'îlot de pathogénicité SPI-1 de *S. Typhimurium* et de la localisation de la zone intergénique étudiée pour le promoteur du gène *invF* (40)**

L'ensemble des opérons présents sur SPI-1 est représenté dans la partie haute de la figure : en bleu foncé les gènes structuraux codant pour l'appareil de sécrétion, en vert les gènes du translocon, en jaune les gènes codant les effecteurs, en violet les gènes codant les protéines chaperonnes et en rouge les gènes de régulation dont *invF*. La zone agrandie permet de visualiser la zone intergénique choisie pour notre étude en pointillés bleu clair portant le promoteur de *invF*.



**Figure 6 : Régulation de l'expression du gène codant la protéine Rck et ses promoteurs (41)**

L'opéron *pefI-srgC* se situe sur le plasmide de virulence de *Salmonella*. Les 6 ORFs de l'opéron sont représentés par des flèches bleues et les 2 promoteurs identifiés en amont de *pefI* par des flèches brisées. Les triangles rouges correspondent aux AHLs. La région promotrice étudiée pour l'expression de Rck est représentée par le rectangle en pointillés orange.



**Figure 7 : Représentation schématique du locus *pagN* de *S. Typhimurium***

Le gène *pagN* représenté en jaune, est encadré par 2 ORFs (flèches orange) qui codent des protéines de fonction inconnue. La région choisie pour étudier la transcription de *pagN* est représentée par le rectangle en pointillés bleus.



## Matériels et méthodes

### **I. Plasmides, souches bactériennes et conditions de croissance utilisées**

L'ensemble des constructions bactériennes utilisées est issue de la souche virulente *S. Typhimurium* 14028 provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC) ou de la souche d'*Escherichia coli* CC118  $\lambda$ pir et sont répertoriées dans le **Tableau I**. Les différentes constructions ont été réalisées par transformation de *S. Typhimurium* 14028 ou d'*E. coli* CC118  $\lambda$ pir, respectivement par électroporation ou par choc thermique, avec les différents plasmides listés dans le **Tableau I**.

Les cultures ont été réalisées en bouillon Tryptone soja (TSB, DIFCO) ou en bouillon LB NaCl 50 mM avec agitation (190 rpm), à 30 C ou 37 C et supplémentées en antibiotique si nécessaire aux concentrations suivantes : 10  $\mu$ g/mL ou 30  $\mu$ g/mL pour le chloramphénicol (Cm) et 100  $\mu$ g/mL pour la carbénicilline (Cb). Les étalements ont été réalisés sur des boîtes de gélose Tryptone Soja Agar (TSA, DIFCO) avec antibiotiques si nécessaire, et incubées à 30 C ou 37 C.

### **II. Transformation bactérienne**

#### **2-1 Choc thermique**

La transformation par choc thermique nécessite la préparation de bactéries thermocomp tentes. Pour cela, 1 mL d'une pré-culture de nuit de la souche d'intérêt (*E. coli* CC118  $\lambda$ pir) est inoculé dans 100 mL de TSB qui sont incubés à 37 C pendant environ 3 h sous agitation, jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm entre 0,3 et 0,5. La culture est ensuite refroidie et toutes les étapes ultérieures sont réalisées à +4 C. Les bactéries sont centrifugées pendant 10 min à 5000 g, puis le culot est resuspendu dans 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Après 30 min dans la glace, les bactéries sont centrifugées comme précédemment et le culot est repris dans 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Puis 100  $\mu$ L de bactéries sont mélangées avec 10  $\mu$ L d'ADN (mélange de ligature). Après 15-20 min dans la glace, le mélange subit un choc

thermique dans un bain-marie à 42°C pendant 3 min puis est remis dans la glace pendant quelques minutes. Les bactéries sont ensuite récupérées dans 1 mL de milieu SOC (20 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 0,58 g/L de NaCl, 0,18 g/L de KCl, 2,03 g/L de MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 3,6 g/L de glucose) et incubées à 37°C pendant environ 1 h sous agitation. Enfin, les bactéries ont été étalées sur des boîtes TSA contenant du chloramphénicol et de la carbénicilline, puis incubées la nuit à 37°C.

**Tableau I : Plasmides et souches bactériennes utilisés dans cette étude**

Souches/Plasmides	Description	Résistance antibiotique	Origine
<b>14028</b>	Souche sauvage virulente de <i>S. Typhimurium</i>	/	ATCC
<b>14028 attTn7::PØ-lux-Cm</b>	Souche 14028 avec la fusion PØ-lux intégrée dans le chromosome au site attTn7	Cm10	Cette étude
<b>14028 attTn7::Prck-lux-Cm</b>	Souche 14028 avec la fusion Prck-lux intégrée dans le chromosome au site attTn7	Cm10	Cette étude
<b>14028 attTn7::PinvF-lux-Cm</b>	Souche 14028 avec la fusion PinvF-lux intégrée dans le chromosome au site attTn7	Cm10	Cette étude
<b>14028 attTn7::PpagN-lux-Cm</b>	Souche 14028 avec la fusion PpagN-lux intégrée dans le chromosome au site attTn7	Cm10	Cette étude
<b>14028 attTn7::Psig70_c35-lux-Cm</b>	Souche 14028 avec la fusion Psig70_c35-lux intégrée dans le chromosome au site attTn7	Cm10	Cette étude
<b>CC118 λpir</b>	Souche d' <i>E. coli</i> utilisée pour la réplication du vecteur pUC18R6K-miniTn7T-PacI	/	(42)
<b>pCS26luxCDABE-Cm</b>	Vecteur exprimant l'opéron <i>lux</i> et utilisé pour construire les fusions transcriptionnelles	Cm30	(43)
<b>pCS26-PØ-lux</b>	Vecteur pCS26luxCDABE-Cm dépourvu de promoteur en amont de l'opéron <i>lux</i>	Cm30	(43)
<b>pCS26-Prck-lux</b>	Vecteur pCS26luxCDABE-Cm contenant le promoteur Rck cloné dans les sites <i>XhoI-BamHI</i>	Cm30	Grépinet O

<b>pCS26-PinvF-lux</b>	Vecteur pCS26luxCDABE-Cm contenant le promoteur InvF cloné dans les sites <i>XhoI-BamHI</i>	Cm30	Grépinet O
<b>pCS26-PpagN-lux</b>	Vecteur pCS26luxCDABE-Cm contenant le promoteur PagN cloné dans les sites <i>XhoI-BamHI</i>	Cm30	Grépinet O
<b>pCS26-Psig70_c35-lux</b>	Vecteur pCS26luxCDABE-Cm contenant le promoteur constitutif sig70_c35 cloné dans les sites <i>XhoI-BamHI</i>	Cm30	(43)
<b>pHSG415-tnsABCD</b>	Plasmide Helper thermosensible pour la transposition Tn7	Cb100	(43)
<b>pUC18R6K-miniTn7T-PacI</b>	Vecteur de clonage utilisé pour l'intégration chromosomique	Cb100	(43)
<b>pUC18R6K-PØ-lux</b>	Vecteur pUC18R6K-miniTn7T-PacI contenant la fusion PØ-lux clonée dans le site <i>PacI</i>	Cb100, Cm10	Cette étude
<b>pUC18R6K-PpagN-lux</b>	Vecteur pUC18R6K-miniTn7T-PacI contenant la fusion PpagN-lux clonée dans le site <i>PacI</i>	Cb100, Cm10	Cette étude
<b>pUC18R6K-Psig70_c35-lux</b>	Vecteur pUC18R6K-miniTn7T-PacI contenant la fusion Psig70_c35-lux clonée dans le site <i>PacI</i>	Cb100, Cm10	(43)

## 2-2 Electroporation

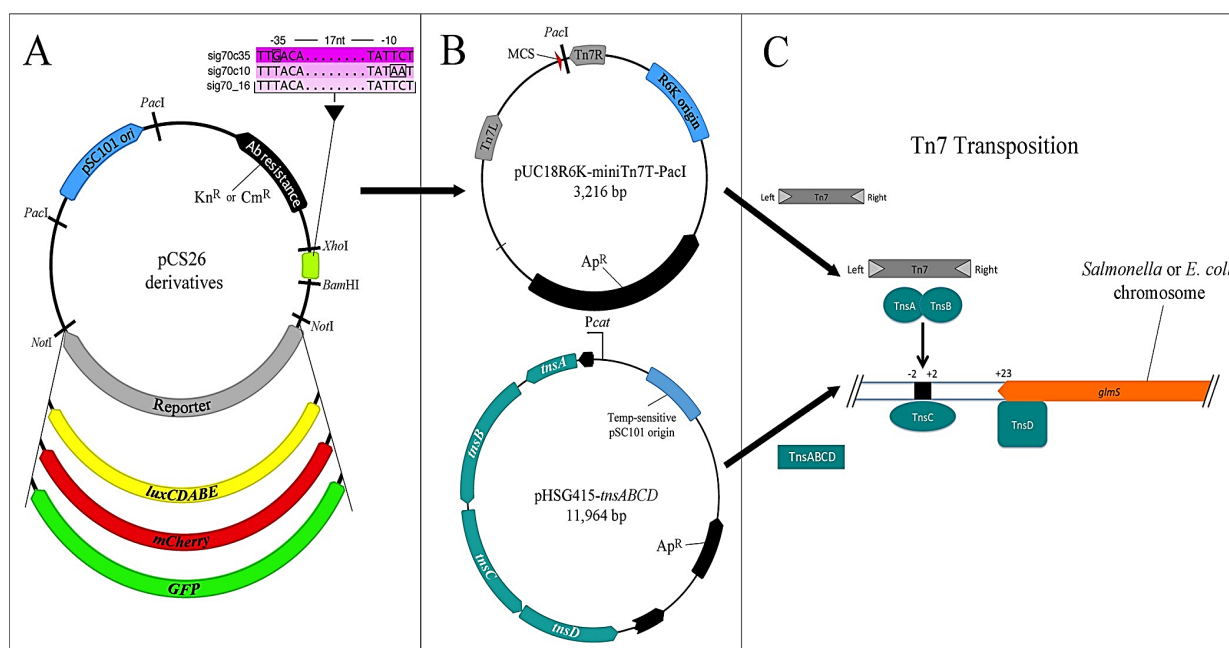
L'électroporation de souches de *S. Typhimurium* nécessite la préparation de bactéries électrocompétentes. Pour cela, 1 mL d'une pré-culture de nuit de la souche d'intérêt est inoculé dans 100 mL de TSB qui sont incubés à 37°C ou 30°C sous agitation jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm comprise entre 0,3 et 0,5.

Toutes les étapes suivantes sont réalisées à +4°C. Les bactéries sont centrifugées pendant 3 min à 10 000 g puis lavées 3 fois avec 10 mL de glycérol 10% froid. Le culot bactérien est finalement resuspendu dans 300 µL de GYT (glycérol 10%, 1,25 g/L d'extrait de levure, 2,5 g/L de tryptone). L'électroporation se réalise avec le Micropulser Biorad, où 100 µL de bactéries électrocompétentes sont mélangées avec 10 à 15 µL d'ADN (200 à 800 ng selon le plasmide). Après un choc électrique de 2,5 kV (programme *E. coli* 2), les bactéries sont

rapidement reprises dans 1 mL de milieu SOC, puis incubées à 37°C (ou 30°C si le plasmide est thermosensible) pendant 1 h à 2 h. Enfin, les bactéries sont étalées sur des boîtes TSA supplémentées en antibiotiques nécessaires et incubées sur la nuit à 37°C.

### III. Validation des fusions transcriptionnelles

Avant mon arrivée au laboratoire et à partir de la méthodologie décrite par Shivak et al. (43) (**Figure 8**), les fusions transcriptionnelles avec l'opéron *lux* de *Photobacterium luminescens* ont été construites avec les promoteurs des différents facteurs d'entrée de *S. Typhimurium* : InvF (T3SS-1), Rck et PagN, ainsi qu'avec un promoteur constitutif sig70\_c35 qui active de manière continue l'opéron *luxCDABE*. L'émission de lumière est produite à l'aide d'une réaction chimique entre une enzyme, la luciférase, et son substrat. Les cadres ouverts de lecture (ORF) *luxA* et *luxB* codent les sous-unités de la luciférase, et les ORF *luxC*, *D* et *E* codent des enzymes pour la synthèse du substrat (44).



**Figure 8 : Principe de la construction des fusions transcriptionnelles (43)**

L'ensemble des constructions résulte de la technique décrite par (43) A) Dans un premier temps, l'intégration des promoteurs des facteurs d'entrée de *Salmonella* (Rck, InvF et PagN) et du promoteur constitutif (sig70\_c35) dans le plasmide pCS26luxCDABE-Cm a été réalisée par digestion *XhoI* /

*BamHI*. B et C) Les étapes suivantes ont consisté à intégrer les plasmides construits au préalable au sein du chromosome de *Salmonella*. Pour cela, deux autres plasmides ont été nécessaires, pUC18R6K-miniTn7T-PacI qui possède une origine de répllication R6K et qui ne se réplique que chez les souches  $\lambda$ pir (telle que *E. coli* CC118) et le plasmide pHSG415-tnsABCD thermosensible portant les gènes de la transposase, pour la transposition Tn7 au sein du chromosome bactérien.

La vérification fonctionnelle du clonage des promoteurs dans le plasmide pCS26luxCDABE-Cm a été réalisée par analyse de la bioluminescence des bactéries lors d'une culture supplémentée en agent activateur de l'expression de nos fusions d'intérêt.

### **3-1 Fusion Prck-lux**

Des boîtes TSA-Cm30 ont été inondées avec quelques millilitres d'une culture de nuit de la souche *S. Typhimurium* portant le plasmide pCS26-Prck-lux et le plasmide pACSdiA (vecteur surexprimant SdiA) ou le vecteur vide pACYC177 (témoin négatif). Puis, 6 disques ont été positionnés sur les tapis bactériens et 8  $\mu$ L des différentes dilutions de AHLs (1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M et 0,1  $\mu$ M) ont été déposés sur les disques. Les boîtes ont ensuite été incubées pendant 4 h à 37°C, puis la luminescence a été observée à l'aide de l'imageur Fusion Fx7 (Vilber Lourmat) avec un temps d'exposition de 5 min.

### **3-2 Fusion PinvF-lux**

Comme ci-dessus, des boîtes LB agar-Cm30 contenant 50 mM NaCl ont été inondées avec quelques mL d'une culture de nuit de la souche *S. Typhimurium* hébergeant le plasmide pCS26-PinvF-lux. Après élimination du surplus de culture et un séchage des boîtes pendant environ 15 min, 4 puits ont été creusés dans la gélose dans lesquels ont été déposés 25  $\mu$ L d'une solution de NaCl à différentes concentrations : 5 M, 2,5 M, 1 M et 500 mM. Après 4 h d'incubation à 37°C, la luminescence a été détectée comme précédemment.

### 3-3 Fusion PpagN-*lux*

La souche portant la fusion pCS26-PpagN-*lux* a été ensemencée au 100 me dans 30 mL de TSB-Cm30 et dans 30 mL de milieu LPM (Low Phosphate Magnesium) Cm30. Puis après 4 h de culture à 37 C sous agitation, 1 mL de culture en TSB et 1 mL de culture en LPM ont été déposés dans une plaque de 24 puits. La luminescence a été observée à l'aide de l'imageur Fusion Fx7 avec un temps d'exposition de 15 min.

## IV. Criblage de différentes molécules et fluides biologiques

Afin de quantifier l'efficacité des différentes constructions et de tester différentes molécules biologiques pouvant activer les promoteurs des facteurs d'entrée de *Salmonella*, le lecteur de microplaques Spark  (TECAN) a été utilisé. Cet appareil permet d'étudier et de contrôler la croissance dans le temps des bactéries grâce à la variation de paramètres (la température, l'agitation, les temps de mesure) et de mesurer simultanément l'émission de luminescence.

Nous avons donc testé 14 produits listés dans le **Tableau II**, dilués dans de l'eau ultra pure pour obtenir des concentrations à 100 mM, sur les souches contenant les 3 fusions plasmidiques PinvF-*lux*, Prck-*lux* et PpagN-*lux* diluées au 1/100 me à partir d'une culture de nuit. Pour cela, 180  L de suspension bactérienne de chaque fusion ont été déposés dans une plaque 96 puits blanche (Corning 3610, Thermofisher), où il a été ajouté 20  L de chaque produit testé pur ou dilué au 1/10 me.

Par la suite, le TECAN a été utilisé pour comparer l'activité transcriptionnelle des souches portant les fusions PpagN-*lux* et Psig70\_c35-*lux* plasmidiques et chromosomiques. Une culture de nuit des 2 souches a été diluée au 1/100 me dans du TSB et du LPM pour la souche comprenant le promoteur PagN, puis 200  L ont été déposés dans des plaques 96 puits blanches pour ensuite être introduites dans le lecteur.

Le Spark  (TECAN) a ensuite mesuré par intervalle de 15 minutes la luminescence avec un temps d'acquisition de 1000 ms et la densité optique à 600 nm sur une durée de 12 heures. La programmation choisie pour des conditions optimales de cultures des souches fut une température de 37 C avec une agitation continue de la plaque. Les résultats sont ensuite obtenus sous forme de tableau à l'aide du logiciel Spark control Method Editor.

**Tableau II : Produits biologiques utilisés et testés au TECAN**

<b>Produits</b>	<b>Fournisseurs</b>
<b>Acetate (sodium)</b>	RPL, 1697
<b>n-Butyric acid (sodium salt)</b>	Sigma, B-5887
<b>6-aminoCaproic acid</b>	Sigma, A7824
<b>Caprylic acid (n-Octanoid acid) (sodium salt)</b>	Sigma, C-5038
<b>L(-)Fucose</b>	Aldrich, 85138-8
<b>D-glunonic acid (Pentahydroxy-caproic acid)</b>	Sigma, G-4625
<b>Indole</b>	Sigma, W259306
<b>Mannose (D-)</b>	Serva, 28460
<b>myo-Inositol</b>	Sigma, I-5125
<b>Nitrate (sodium)</b>	Merck, 6535
<b>Pyruvic acid (sodium salt)</b>	Sigma, P-2256
<b>Suuccinate dibasic hexahydrate (sodium)</b>	Sigma, S-2378
<b>Thiosulfate (sodium)</b>	Sigma, S-7143
<b>Zinc sulfate</b>	Carlo Erba, 494907

## V. Construction des plasmides utilisés pour la transposition

Afin de pouvoir être insérées dans le chromosome de *S. Typhimurium* 14028 par le mécanisme de transposition Tn7, les fusions transcriptionnelles pCS26-PpagN-*lux*, pCS26-Psig70\_c35-*lux* ont été sous-clonées dans le vecteur pUC18R6K-miniTn7T-PacI.

### 5-1 Restriction et purification sur colonne

La digestion des constructions pCS26-PpagN-*lux* et pCS26-Psig70\_c35-*lux* ainsi que du pUC18R6K-miniTn7T-PacI a été réalisée avec 1  $\mu$ L d'enzyme de restriction PacI mélangée avec 5  $\mu$ L de Tampon (Cutsmart x10), 15  $\mu$ L d'ADN et 29  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O pour un volume final de 50  $\mu$ L.

Après vérification des restrictions par migration sur gel d'agarose à 0,7%, celles-ci ont été purifiées avec le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur et dosées au spectrophotomètre NanoDrop One (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France).

### 5-2 Ligature

La ligature entre 50 ng de pUC18R6K-miniTn7T-PacI linéarisé et environ 50 ng des différentes constructions pCS26-P-*lux*-Cm restreintes par PacI se fait en ajoutant 8 volumes de solution A (tampon) et 1 volume de solution B (ligase) du DNA Ligation Kit Ver. 1 (Takara®, Saint-Germain en Laye, France). Le mélange réactionnel est incubé à 16°C pendant 1 à 2 h. La souche *E. coli* CC118  $\lambda$ pir est ensuite transformée par choc thermique (cf paragraphe 2-1) avec 10  $\mu$ L du mélange de ligature. Le lendemain, une vingtaine de colonies est repiquée sur gélose TSA-Cm10-Cb100 et incubée la journée à 37°C. L'ADN plasmidique des différents clones est ensuite purifié à l'aide du NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) et l'orientation des inserts dans le vecteur pUC18R6K-miniTn7T-PacI est vérifiée par une



digestion des plasmides recombinants avec l'enzyme BglIII et migration sur gel d'agarose à 0,7%.

## **VI. Intégration chromosomique des différentes fusions**

### **6-1 Transformation dans la souche 14028 contenant le pHSG415-tnsABCD**

L'électroporation des différentes constructions dans le vecteur pUC18R6K-miniTn7T-PacI (quelques centaines de nanogrammes d'ADN) a été réalisée dans 100 µL de bactéries électrocompétentes de la souche 14028 portant le plasmide pHSG415-tnsABCD (cf paragraphe 2-2).

Les souches sont incubées à 30°C pendant 2 h car le plasmide pHSG415-tnsABCD est thermosensible. Puis après étalement sur boîte TSA-Cm10, l'incubation est à 37°C pour la nuit afin d'obtenir des colonies de *S. Typhimurium* ayant intégré les constructions réalisées dans pUC18R6K-miniTn7T-PacI et perdu le plasmide thermosensible.

### **6-2 Vérification des clones par PCR**

Pour vérifier le sens d'intégration des constructions au site attTn7 du chromosome de *S. Typhimurium* 14028, l'ADN génomique des différents clones a été purifié et des PCR ont été réalisées avec les amorces décrites dans le **Tableau III**.

## **VII. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

### **7-1 Mélange réactionnel et programme**

Plusieurs PCR ont été réalisées dans cette étude afin de vérifier l'orientation des intégrations chromosomiques. Les mélanges de réaction de PCR sont décrits dans le **Tableau IV**. Les

différentes amorces utilisées proviennent de la société Eurogentec et sont décrites dans le **Tableau III**.

Les différentes PCR ont été réalisées avec le thermocycleur iCycler® (Biorad). Un premier cycle de dénaturation de 3 min à 95°C est suivi de 30 cycles comprenant une étape de dénaturation (30 secondes à 95°C), une étape d'hybridation (30 secondes à 60°C) et une étape d'élongation (1 min/kb à amplifier à 72°C). Un dernier cycle d'élongation long est finalement effectué pendant 5 min à 72°C.

**Tableau III : Amorces PCR utilisées dans cette étude**

Amorce	Séquence	Description
<b>Lux-verif</b>	5' CCTGAAACGTTGAAACCTGTACCTG 3'	Vérification variants S.Typhimurium 14028 attTn7::P-luxCDABE-Cm
<b>glmS-Rev</b>	3' AGCCGCATGTGGAAGAGGTCATTG 5'	Vérification variants S.Typhimurium 14028 attTn7::P-luxCDABE-Cm
<b>Cm-verif</b>	5' TGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTC 3'	Vérification variants S.Typhimurium 14028 attTn7::P-luxCDABE-Cm
<b>glmS-For</b>	3' AACCATCAGCGCGGAACAACCTGGTC 5'	Vérification variants S.Typhimurium 14028 attTn7::P-luxCDABE-Cm

**Tableau IV : Composition du mélange réactionnel pour une PCR avec 23 µL du mix pour 2 µL d'ADN (volumes en µL pour 8 tubes)**

H <sub>2</sub> O pure	dNTPs 5 mM	Amorce Forward 10 mM	Amorce Reverse 10 mM	Tampon green 5X	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	Enzyme GoTaq® Proméga 5 U/mL	ADN (/tube)	Total (/tube)
102.4	8	10	10	40	12	1.6	2	25

## **7-2 Electrophorèse en gel d'agarose**

Les produits PCR ont été mélangés avec un tampon de charge et déposés dans un gel d'agarose 0,7% en TAE 0,5X (2,42 g de TrisBase, 571  $\mu$ L acide acétique, EDTA 5 mM, eau distillée qsp 1 L) contenant du GelRed (Interchim). Les dépôts sont migrés à 5 V/cm et la révélation du gel ainsi que l'acquisition des images sont faites avec l'appareil Gel Doc XR et le logiciel Quantity One® (Biorad).

## **VIII. Infection expérimentale sur souris**

### **8-1 Préparation des inoculums**

Une dilution au 100<sup>ème</sup> des cultures des souches d'intérêt a été réalisée dans un volume final de 400 mL de TSB-Cm30 puis cultivé sur la nuit à 37°C sous agitation. La culture a été transférée dans un pot Nalgène stérile et centrifugée pendant 20 min à 4400 g. Le surnageant a été enlevé et le culot repris avec 15 mL d'une solution de glycérol à 50% en eau physiologique. La suspension a ensuite été répartie dans des tubes Nunc stériles de 1,8 mL à vis externe. Une quinzaine d'aliquots de 1,2 mL ont été obtenus pour chaque souche et congelés à -80°C.

Une estimation de la concentration en bactéries des inoculums est effectuée par mesure de la DO<sub>600nm</sub> après dilution au 100<sup>ème</sup>, puis confirmée par numération sur boîte de manière à ajuster la concentration en bactéries au moment de l'inoculation.

### **8-2 Description de la manipulation préliminaire**

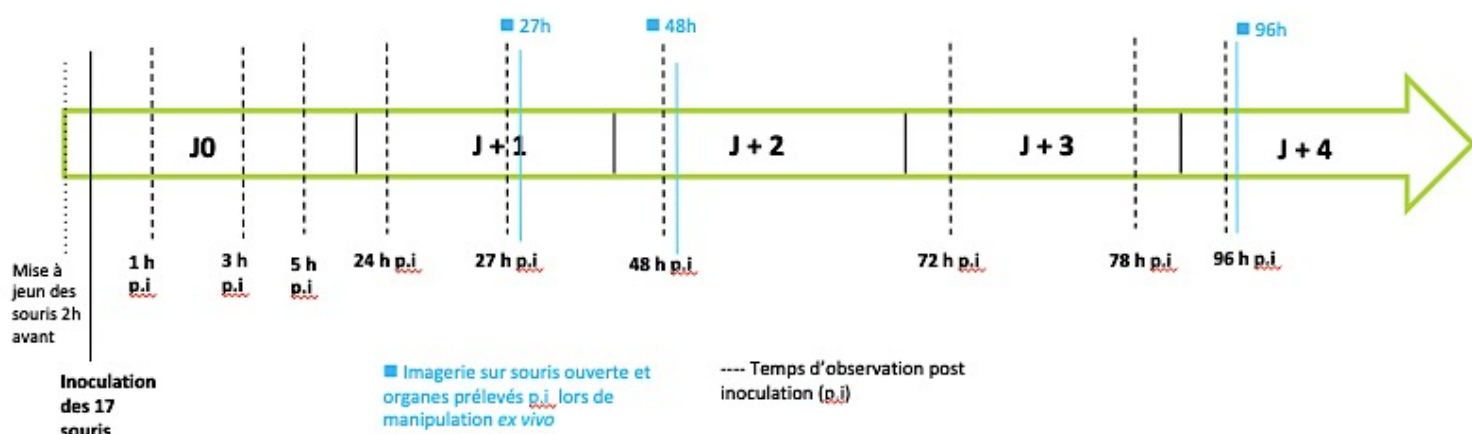
Après validation auprès du comité d'éthique Centre Val de Loire de la saisine numéro 03749.03, 17 souris BALB/c de 6 à 8 semaines ont été commandées puis hébergées et nourries, à base de granules industriels préalablement irradiés, une semaine avant le début de

la manipulation. Deux jours avant l'inoculation, les souris ont été dépilées avec une crème dépilatoire et un rasoir. Puis deux heures avant l'inoculation, les souris sont mises à jeun (privation d'eau et de nourriture). L'inoculation a été réalisée par sonde gastrique avec 0,2 mL d'une suspension bactérienne ajustée à  $2,5 \times 10^9$  bactéries/mL. Sur les 17 souris, 5 n'ont pas été inoculées pour être utilisées en tant que témoin négatif.

La bioluminescence est observée à l'aide de l'IVIS® (In Vivo Imaging System) Spectrum (Perkin-Elmer) qui est un imageur doté d'une caméra CCD (Charge Coupled Device) placée dans une chambre hermétique à la lumière. Cette caméra est un détecteur photosensible et lorsque la bactérie va émettre un signal sous forme de photons, la caméra va les détecter et produire à son tour par l'intermédiaire de pixels des électrons proportionnellement au nombre de photons reçus. Puis, la charge de pixels va être convertie à l'aide de l'ordinateur sous forme d'image avec un code couleur.

L'analyse de la bioluminescence des bactéries *in vivo* est faite avec 3 acquisitions par lot de souris (face dorsale, latérale et face ventrale) sur une durée totale de 5 jours aux temps suivants 1 h p.i. (post-inoculation), 3 h p.i., 5 h p.i., 24 h p.i., 48 h p.i., 72 h p.i. et 96 h p.i. **(Figure 9)**. Avant chaque observation, toutes les souris ont été anesthésiées par inhalation d'Isoflurane. Les temps d'exposition ont été ajustés au fur et à mesure du déroulement de l'expérience (de 6 secondes à 5 minutes).

En fonction des résultats d'imagerie obtenus, des manipulations *ex vivo* ont été effectuées à 27 h pi, 48 h pi et à 96 h pi. Pour cela, les animaux ont été mis à mort par asphyxie post-anesthésie au CO<sub>2</sub>. Puis, les organes d'intérêt ont été prélevés après dissection, et de manière stérile, pour l'imagerie et l'analyse bactériologique.



**Figure 9 : Chronologie de la manipulation *in vivo***

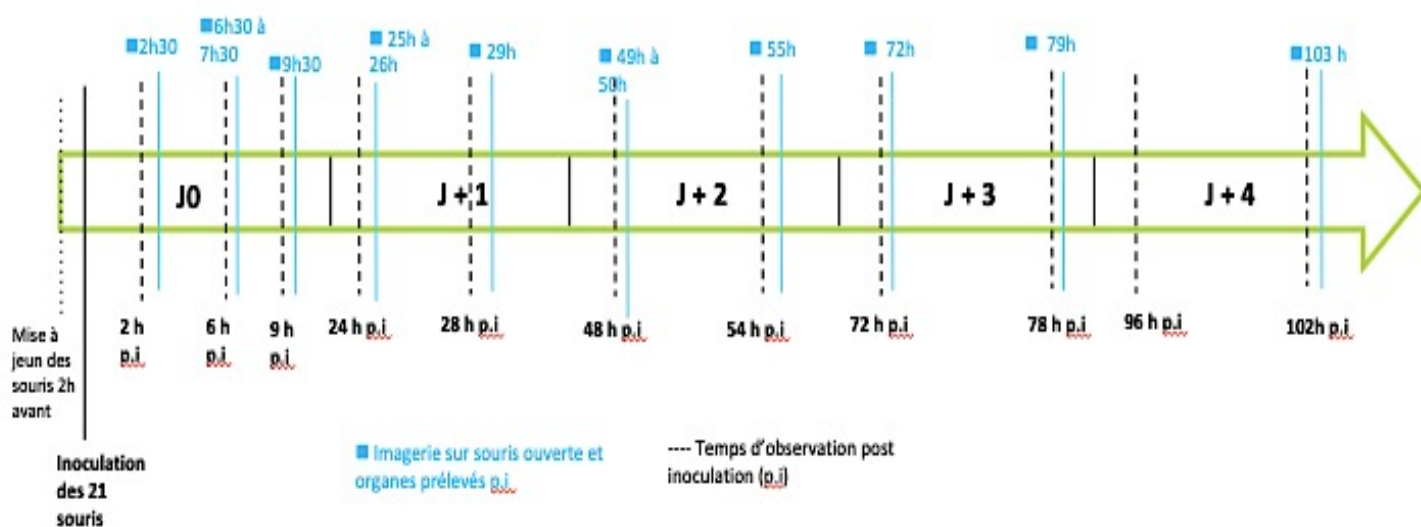
La manipulation *in vivo* comprend différents temps d'exposition et d'observation réalisés sur souris à l'aide de l'IVIS® Spectrum. Les heures d'observation ont été indiquées en noir et correspondent au temps post-inoculation. Les temps de manipulation *ex vivo* et leur imagerie sont indiqués en bleu.

### 8-3 Description de la seconde manipulation *in vivo*

Suite aux résultats obtenus après la manipulation préliminaire, il a été convenu de réaliser une seconde manipulation *in vivo* dans le but de déterminer les sites et la cinétique d'expression du facteur d'entrée PagN après son intégration dans le chromosome de la souche *Salmonella* 14028. Pour cela, 21 souris de 6 à 8 semaines ont été commandées puis hébergées et nourries avec des granules industriels préalablement irradiés, une semaine avec le début de la manipulation. Tout comme pour la manipulation *in vivo* préliminaire, les souris ont été dépilées et rasées 2 jours avant l'inoculation et mises à jeun 2 h avant. L'inoculation a été réalisée par sonde gastrique avec 0,2 mL d'une suspension bactérienne à  $2.5 \times 10^9$  bactéries/mL, sur 3 lots de souris, le lot A (5 souris) comme témoin négatif avec la fusion PØ-*lux* chromosomique, le lot B (8 souris) avec la fusion Psig70\_c35-*lux* chromosomique correspondant au témoin positif et le lot C (8 souris) avec la fusion PpagN-*lux* chromosomique.

La bioluminescence est observée de façon identique que lors de la manipulation préliminaire avec l'imageur IVIS®, son analyse est aussi réalisée avec 3 acquisitions de 5 min par lot de souris (face dorsale, latérale et ventrale) sur une durée de 5 jours avec les temps d'acquisitions suivants : 2 h p.i. (post inoculation), 6 h p.i., 9 h p.i., 24 h p.i., 28 h p.i., 54 h p.i., 72 h p.i., 78 h p.i., 96 h p.i. et 102 h p.i. (**Figure 10**). Avant chaque observation, toutes les souris ont été anesthésiées par inhalation d'Isoflurane.

Après chaque temps d'observations, des manipulations *ex vivo* ont été réalisées à 2 h 30 p.i., 6 h 30 à 7 h 30 p.i., 9 h 30 p.i., 25 h à 26 h p.i., 29 h p.i., 49 à 50 h p.i., 55 h p.i., 72 h p.i., 79 h p.i. et 102 h p.i. Pour cela, les animaux ont été mis à mort par dislocation cervicale. Puis les organes d'intérêt ainsi que les liquides biologiques (sang, selles) ont été prélevés après dissection, et de manière stérile, pour l'imagerie et l'analyse bactériologique.



**Figure 10 : Chronologie de la seconde manipulation *in vivo***

Les différents temps d'observation et d'exposition réalisés sur souris pour cette seconde manipulation *in vivo* ont été réalisés à l'aide de l'IVIS Spectrum®. Les heures d'observation sont indiquées en noir et les temps de manipulation *ex vivo* et leur imagerie sont indiqués en bleu.

## 8-4 Bactériologie

Le dénombrement des salmonelles dans les organes prélevés a été réalisé après les avoir mélangés avec quelques millilitres de TSB dans un sac préalablement pesé (1 mL pour les plaques de Peyer ; 3 mL pour la rate, les ganglions lymphatiques mésentériques et les fécès ; 5 mL pour l'estomac, le duodenum, l'ileum, le jejunum et le caecum) puis broyés à l'aide d'un broyeur MiniMix CC (Interscience). Pour chaque organe, 50 µL de broyat sont étalés en cercle sur des géloses SS (*Shigella Salmonella*) Cm10 de manière exponentielle à l'aide de l'Easy spirale dilute® (Interscience). Pour les organes riches en bactéries tels que le caecum, la rate et l'iléon, une dilution au 100<sup>ème</sup> a été réalisée avant étalement pour une meilleure lecture. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C. Le dénombrement a été réalisé à l'aide du Scan 4000® (Interscience) pour obtenir la concentration de bactéries par mL.

Le protocole est resté identique pour l'ensemble des manipulations *ex vivo* réalisées. Néanmoins, le cœur, les poumons et le cerveau ont été prélevés en plus chez les souris autopsiées 4 jours post-inoculation suite à des signaux visibles lors de l'acquisition de la bioluminescence par l'IVIS® Spectrum.

## Résultats

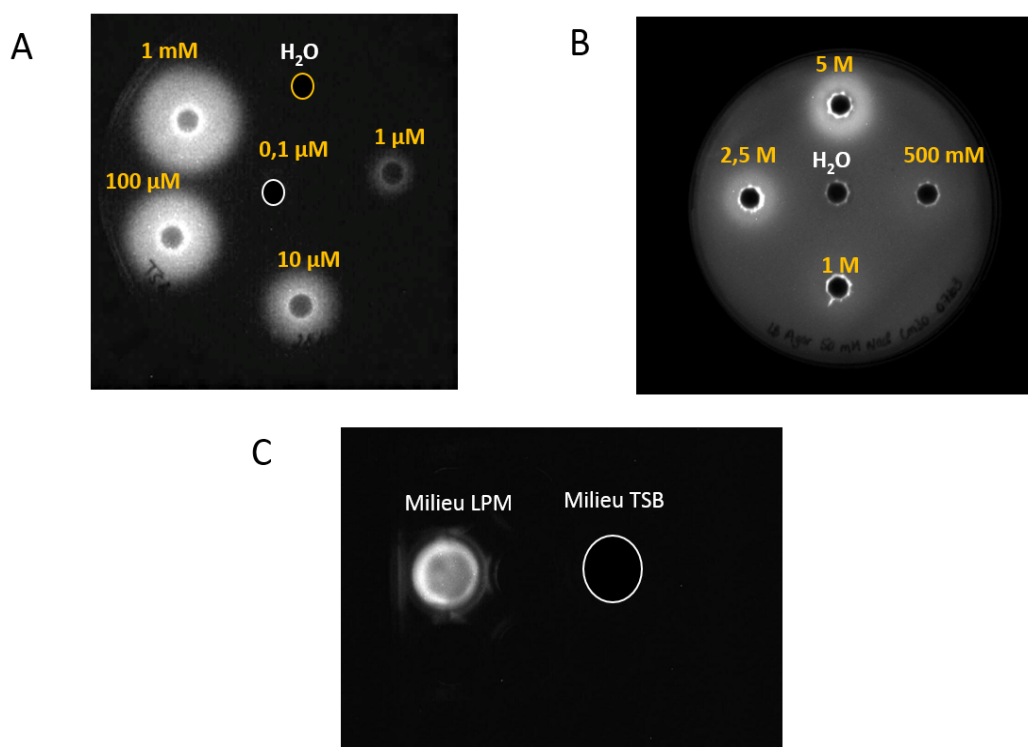
### **I. Validation des fusions transcriptionnelles**

Lors des travaux antérieurs à mon stage, les constructions plasmidiques des fusions transcriptionnelles *PinvF-lux*, *Prck-lux* et *PpagN-lux* ont été réalisées puis vérifiées par séquençage. Dans un premier temps, nous avons souhaité tester leur activité *in vitro* à l'aide de l'imageur Fusion Fx7 (Vilber Lourmat) après les avoir électroporées dans *S. Typhimurium* 14028. Ces facteurs d'entrée n'étant pas exprimés dans des conditions standard de culture, nous avons utilisé des agents activateurs connus pour activer les promoteurs des différentes fusions d'intérêt : une surexpression du régulateur du quorum sensing SdiA en présence d'AHLs pour Rck, un milieu mimant les conditions rencontrées par *Salmonella* dans la vacuole d'endocytose pour PagN et un milieu enrichi en NaCl mimant le contenu intestinal pour InvF.

Pour la fusion *Prck-lux*, nous avons déposé des disques imbibés d'AHLs à différentes concentrations sur une gélose inondée avec la souche *S. Typhimurium* 14028 portant la fusion *Prck-lux* et surexprimant SdiA. Après une incubation de 4 h à 37°C, un halo de luminescence proportionnel à la concentration d'AHLs est observé pour des concentrations de 1  $\mu$ M à 1 mM. En revanche, pour une concentration de 0,1  $\mu$ M d'AHLs, nous n'observons pas de luminescence, tout comme pour le témoin négatif imbibé d'eau (**Figure 11A**). Ce résultat est cohérent avec la concentration d'AHLs de 2  $\mu$ M qui est nécessaire pour activer en culture liquide la transcription de l'opéron *pefI-srgC* portant l'ORF *rck* (33). La fusion possédant le promoteur *PinvF* (T3SS-1) a été testée sur boîte en présence de concentrations de NaCl comprises entre 500 mM et 5 M. Le test a nécessité l'utilisation d'une gélose LB agar contenant 50 mM de NaCl, car sur une gélose de TSA le bruit de fond était trop important. Après 4 h d'incubation, une luminescence proportionnelle à la concentration de NaCl a été observée pour des concentrations de 1 M à 5 M (**Figure 11B**). Pour observer l'activité transcriptionnelle de la fusion *PpagN-lux*, nous avons utilisé le milieu LPM qui est un milieu à faible concentration en ions phosphate et magnésium qui mime les conditions rencontrées par *Salmonella* dans la vacuole d'endocytose. Cela nous a permis d'observer après 4 h de culture, une luminescence supérieure en milieu LPM par rapport au milieu TSB qui correspond au milieu de culture standard de *S. Typhimurium* (**Figure 11C**). L'ensemble de



ces résultats montre que les 3 fusions transcriptionnelles sont bien fonctionnelles et peuvent donc être utilisées pour la suite de nos travaux.



**Figure 11 : Validation par test *in vitro* des différentes fusions transcriptionnelles plasmidiques luminescentes dans *S. Typhimurium* 14028**

A) Fusion Prck : des disques imbibés de 8 μL d'AHLs à différentes concentrations ont été déposés sur un tapis bactérien d'une souche portant la fusion Prck-*lux* et surexprimant SdiA (le disque noté H<sub>2</sub>O correspond au témoin négatif). Le temps d'exposition est de 5 min. B) Fusion PinvF : des puits contenant 25 μL de concentrations croissantes de NaCl ont été creusés dans une gélose tapissée de la souche portant la fusion PinvF-*lux*. Le puits noté H<sub>2</sub>O correspond au témoin négatif et le temps d'exposition est de 5 min. C) Fusion PpagN : la souche portant la fusion PpagN-*lux* a été cultivée pendant 4 h dans du milieu TSB ou du milieu LPM, puis 1 mL de culture a été déposé sur une plaque de 24 puits. Le temps d'exposition est de 15 min.

## II. Criblages de molécules biologiques

A l'aide du lecteur Spark, nous avons mesuré l'effet de 14 molécules (**Tableau II**) sur les fusions transcriptionnelles plasmidiques des facteurs d'entrée PagN, Rck ou InvF. Ces différentes molécules sont retrouvées dans le milieu intestinal et sont produites par le microbiote ou les cellules épithéliales. La littérature a montré que ces molécules étaient capables de réguler des gènes de virulence chez *Salmonella* ou chez d'autres entérobactéries. Douze des produits testés n'ont eu aucun effet activateur ou répresseur sur l'activité transcriptionnelle des fusions Prck-*lux*, PinvF-*lux* et PpagN-*lux*. En revanche, l'ajout de succinate ou de thiosulfate à une concentration finale de 10 mM nous a permis d'observer une légère augmentation de la luminescence pour la fusion PinvF-*lux* (résultats non montrés). Néanmoins, la souche portant la fusion PinvF-*lux* plasmidique possède un niveau de luminescence de base plus élevé dans du milieu TSB que les deux autres fusions et ces résultats préliminaires obtenus avec le succinate et le thiosulfate doivent être confirmés.

## III. Expression *in vivo* des facteurs d'entrée

Afin de déterminer les sites d'expression des différents facteurs d'entrée de *S. Typhimurium* *in vivo*, nous avons réalisé une manipulation préliminaire où nous avons testé nos 3 fusions PinvF-*lux*, PpagN-*lux*, Prck-*lux* d'intérêt et une fusion constitutive, Psig70\_c35-*lux* chez la souris BALB/c sensible à *Salmonella*, sur une durée de 4 jours, avec 3 souris par lot. L'objectif de cette manipulation était d'avoir une première idée des temps et des organes pour lesquels les facteurs d'entrée d'intérêt étaient exprimés. Après avoir imagé les souris à l'aide de l'IVIS® Spectrum, la lumière émise à la surface de chaque souris est exprimée en photons/seconde/cm<sup>2</sup>/steradian (radiance). Pour chaque image, l'indication « counts » correspond au nombre total de photons transformés en signal électrique et émis lors de l'acquisition et, ils sont renseignés à chaque temps sur la **Figure 12**. La radiance est exprimée sous forme d'échelle à indicateurs colorés allant du rouge pour les signaux les plus forts au bleu pour les signaux les plus faibles. Le temps d'acquisition varie sur les premières 24 h pour ensuite être uniformisé à 5 min.

Nous allons présenter les résultats obtenus à l'IVIS® Spectrum exceptés pour les souris inoculées avec la souche portant la fusion *Prck-lux* pour laquelle nous n'avons détecté aucune luminescence aux différents temps d'observation.

### 3-1 Fusion constitutive *Psig70\_c35-lux*

Sur la **Figure 12A**, nous pouvons observer la luminescence au niveau de la région abdominale sur l'ensemble des souris inoculées avec la fusion constitutive entre 1 h et 5 h p.i avec une échelle de radiance à  $10^7$  excepté avec la souris témoin négatif. A partir de 24 h, aucun signal ne semble être détecté à cette grandeur d'échelle. Néanmoins, après étude des images de manière individuelle et quantification par le logiciel Living Image 4.5.5 (logiciel de pilotage et d'analyse de l'IVIS Spectrum) sur la région d'intérêt (ROI : Region Of Interest), des signaux positifs ont été détectés entre 24 h et J4 p.i avec une échelle de radiance à  $10^3$  (non représentée sur la figure). L'autopsie d'une souris a été réalisée à 27 h p.i. Après imagerie, le signal obtenu semble provenir de la peau de la souris. Pour confirmer, nous avons réalisé de l'imagerie et quantifié le nombre de bactéries sur l'ensemble des organes prélevés tels que le caecum, l'estomac, le duodenum, le jejunum, l'iléon, les plaques de Peyer, la rate, les ganglions mésentériques, le foie et les reins.

Finalement, aucun organe n'émettait de signal et seul le caecum était colonisé par *S. Typhimurium* à hauteur de  $7,15 \times 10^4$  UFC/organe. Ces résultats confirment que la luminescence observée sur la souris entière était due à un signal émis par la peau de souris. A J4, une deuxième souris a été autopsiée de la même manière que précédemment (images et quantification non présentées). Nous avons observé cette fois-ci des signaux au niveau du caecum, de la rate, des ganglions mésentériques, des poumons, du foie et des reins supérieurs au témoin négatif, soit supérieur à  $5,63 \times 10^2$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr. La quantification bactérienne a montré que la totalité des organes prélevés étaient colonisés allant de  $1,0 \times 10^2$  UFC/organe pour les plaques de Peyer à  $1,0 \times 10^5$  UFC/organe pour la rate et le foie après quantification des salmonelles sur boîtes contenant du chloramphénicol, marqueur de la présence de la fusion *Psig70\_c35-lux* (données non présentées). Au cours de cette expérimentation, nous avons été surpris d'observer aussi peu de signaux alors que les souris étaient inoculées avec la souche de *S. Typhimurium* constitutivement luminescente et que, dans ce modèle, les salmonelles se multiplient fortement au cours de l'infection. Parallèlement, nous avons donc réalisé un

dénombrement supplémentaire sur boîte SS sans antibiotique ; nous avons obtenu pour le foie une colonisation égale à  $1,22 \times 10^7$  UFC/organe, soit environ 100 fois plus de *Salmonella* que pour le milieu avec antibiotique. Ce résultat indique très clairement que le plasmide est instable dans nos souches chez la souris en absence de pression de sélection et que, à J4 p.i, la majorité des salmonelles isolées des différents organes ne possèdent plus le plasmide portant la fusion transcriptionnelle.

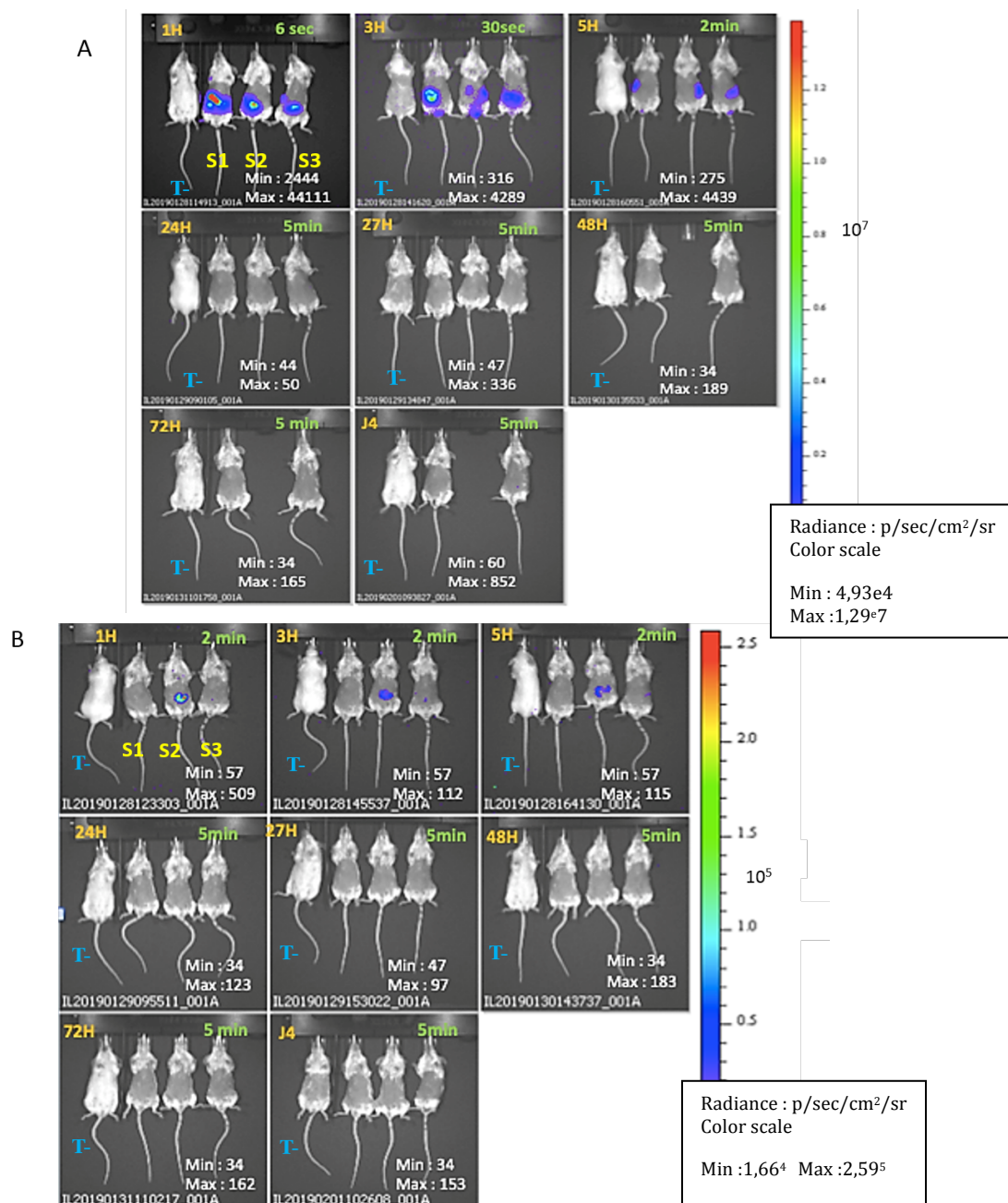
### 3-2 Expression de InvF (T3SS-1)

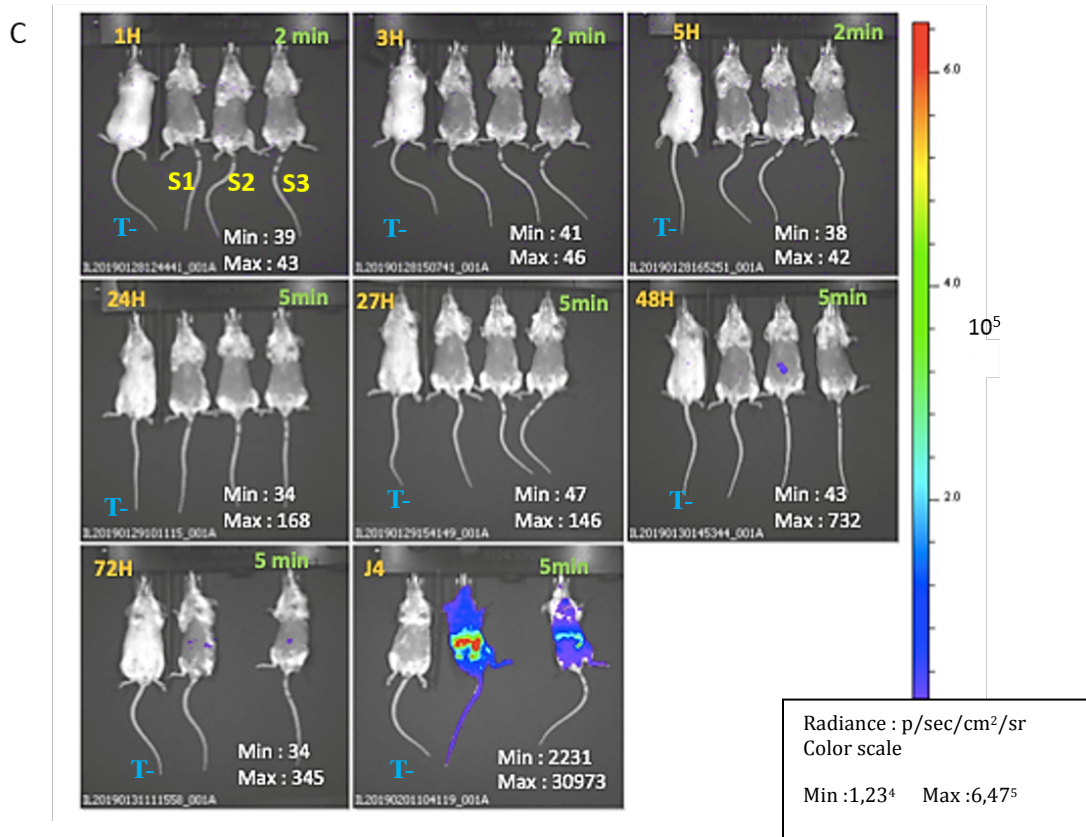
Nous avons pu détecter des signaux de luminescence sur 2 des 3 souris inoculées avec la souche *S. Typhimurium* 14028 portant la fusion *PinvF-lux* aux temps 1 h, 3 h, et 5 h p.i au niveau de la région abdominale (**Figure 12B**). En revanche, à partir de 24 h p.i, aucun signal supérieur à la souris témoin n'a pu être détecté. Nous n'avons pas réalisé de manipulation *ex vivo* sur les souris inoculées avec cette souche car nous pensions initialement que nous détecterions des signaux au-delà de 5 h p.i.

### 3-3 Expression de l'invasine PagN

Les bactéries portant la fusion *PpagN-lux* ont émis de la luminescence visible sur la région abdominale des souris à partir de 48 h p.i avec une radiance à  $10^5$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr. (**Figure 12C**). Au point 48 h p.i, la nécropsie a été réalisée sur la souris (S2) qui émettait un signal. La souris entière ouverte a été imagée, puis l'intégralité de l'intestin a été retirée et imagée sur boîte, nous permettant de visualiser la luminescence au niveau du caecum (**Figure 13A**). Les autres organes (estomac, duodenum, jejunum, iléon, plaques de Peyer, rate, ganglions mésentériques, foie, poumon, cœur, reins et cerveau) ont aussi été extraits et imagés afin de quantifier la luminescence (**Figure 13A**, graphique rouge). Puis une numération bactérienne par organe a été réalisée et représentée sur le graphique bleu de la **Figure 13A**. Sur les organes extraits et colonisés par *S. Typhimurium*, seuls le caecum et les ganglions mésentériques avaient un signal luminescent supérieur à la souris témoin de  $5,65 \times 10^2$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr. Le fait que l'iléon soit plus colonisé que les ganglions mésentériques et qu'il ne présente pas pour autant de luminescence, montre que le promoteur de *pagN* n'est pas activé

dans l'iléon. Entre 72 h p.i et J4 p.i, nous avons observé un signal généralisé sur l'ensemble du corps des souris avec une échelle de radiance entre  $10^4$  et  $10^5$ . Une seconde nécropsie a été réalisée à J4 p.i de la même manière que précédemment. Cette fois, nous avons pu observer de la luminescence sur la totalité des organes prélevés exceptés au niveau du jejunum et de l'iléon. Après numération bactérienne, l'ensemble des organes sauf le jejunum était colonisé (**Figure 13B**). De la même façon, on ne retrouve pas de luminescence dans l'iléon à J4 malgré qu'il soit l'organe le plus colonisé, cela confirme l'absence d'activité du promoteur *pagN* dans cet organe. Comme pour la fusion *Psig70\_c35-lux*, nous avons réalisé un dénombrement des bactéries sur boîte en présence et en absence d'antibiotiques pour le foie des 2 souris nécropsiées. De la même manière que pour la fusion *Psig70\_c35-lux*, les taux de colonisation montrent une perte très importante du plasmide dans les salmonelles isolées du foie.



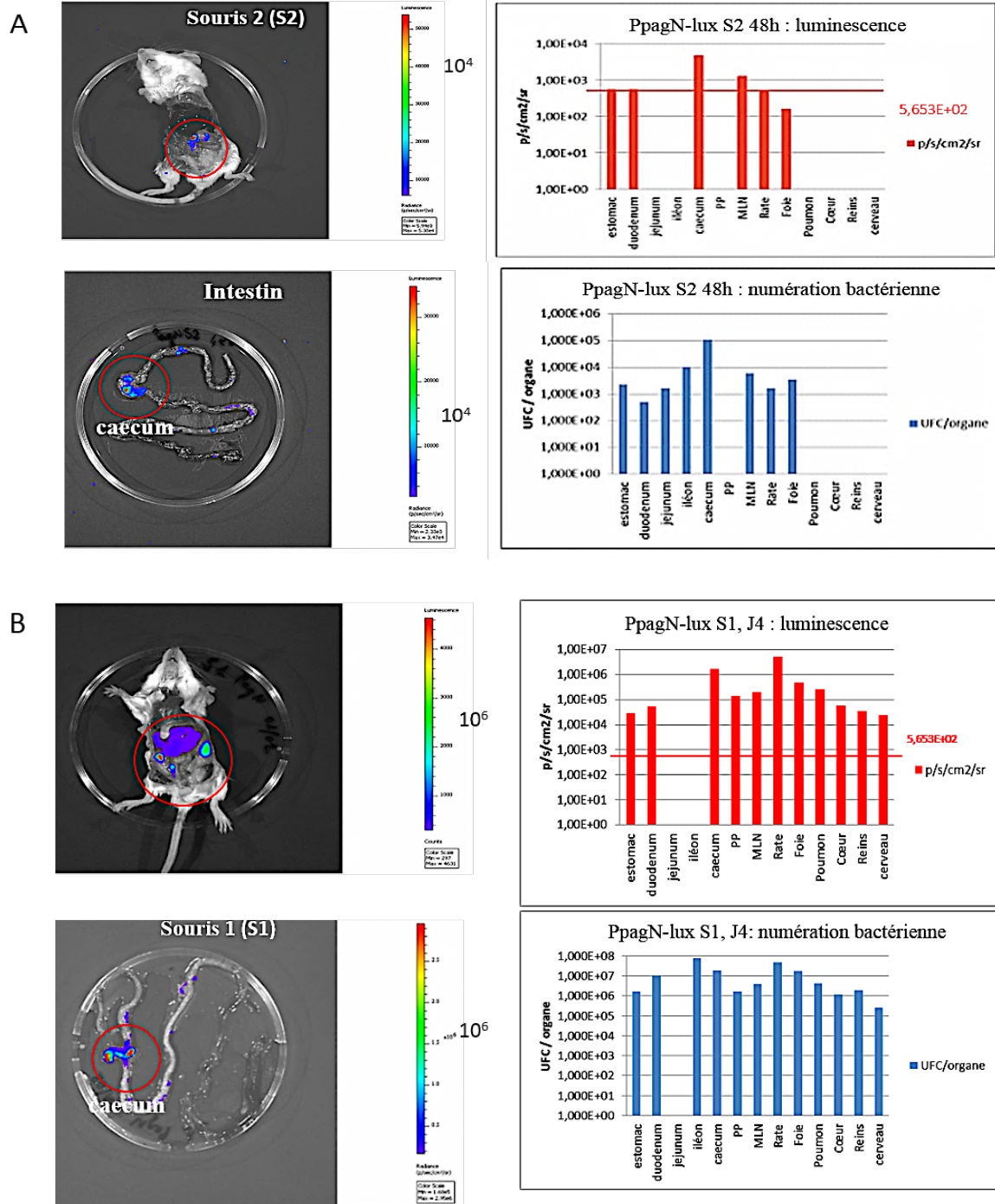


**Figure 12 : Imagerie *in vivo* de souris infectées par *S. Typhimurium* 14028 portant les différentes fusions transcriptionnelles plasmidiques**

Sur l'ensemble des images, le temps post-inoculation est indiqué en orange, le temps d'exposition en vert, le nombre de « counts » ou nombre de photons en blanc (maximum et minimum) et enfin la valeur de l'échelle de radiance en noir à droite de l'image. Les images en position ventrale ont été choisies pour la présentation et, à chaque temps, trois souris inoculées (S1, S2 et S3) et une souris témoin non inoculée (témoin négatif ou T- sur la gauche de chaque image) ont été imagées.

A) Observation de la luminescence à une échelle de radiance de  $10^7$  sur les souris infectées par la souche portant la fusion Psig70\_c35-*lux* avec le promoteur constitutif. B) Observation de signaux de luminescence chez les souris inoculées par la souche contenant la fusion PinvF-*lux* avec une échelle de radiance égale à  $10^5$ . C) Observation de la luminescence pour les souris infectées par la souche portant la fusion PpagN-*lux* à une échelle de radiance de  $10^5$ .





**Figure 13 : Imagerie des organes *ex vivo* de souris inoculées avec la souche portant la fusion PpagN-lux**

A) Autopsie et imagerie de la souris S2 pour laquelle un signal a été détecté au temps 48 h post-inoculation (voir Fig. 12C). Après ouverture abdominale, le signal semble se situer au niveau de l'intestin et plus précisément au niveau du caecum. L'ensemble des organes ont été prélevés afin de visualiser la luminescence par organe et de la quantifier par rapport à la luminescence émise par la souris témoin présenté par la ligne rouge (graphique rouge), pour ensuite comparer les résultats à une quantification bactérienne montrée sur le graphique bleu. B) La manipulation a été reproduite à J4

post-inoculation sur la souris S1. Les temps d'exposition étaient de 5 min pour les images d'organes sur boîtes et de 50 secondes pour les souris autopsiées sur boîtes.

### 3-4 Bilan de la manipulation préliminaire *in vivo*

Cette manipulation *in vivo* nous a permis de mettre en évidence une instabilité du plasmide utilisé chez *Salmonella* en modèle murin. Cependant, les premiers résultats obtenus montrent une transcription du gène *pagN* dans le caecum à 48 h p.i. puis dans l'ensemble des organes que nous avons étudiés. Pour *invF*, nos résultats suggèrent une transcription au niveau intestinal et précoce au cours de l'infection. Enfin, aucun signal n'a été détecté pour la fusion *Prck-lux*.

## IV. Intégration chromosomique des fusions transcriptionnelles

Suite aux résultats de la manipulation *in vivo* préliminaire et à l'observation de la perte du plasmide dans les souches de *Salmonella*, nous avons décidé d'intégrer la fusion PpagN-lux et la fusion Psig70\_c35-lux au sein du chromosome de *S. Typhimurium* à l'aide de la transposition Tn7 (43). Nous avons également construit une autre fusion chromosomique sans promoteur dans le but d'être utilisée comme témoin négatif lors d'une prochaine manipulation *in vivo*.

L'intégration chromosomique des différentes fusions transcriptionnelles au site attTn7 se fait en 2 étapes (**Figure 8**). Dans un premier temps, le fragment de restriction PacI des constructions faites dans le pCS26luxCDABE-Cm est sous-cloné dans le vecteur suicide pUC18R6K-miniTn7T-PacI. Deux sens d'insertion sont possibles lors de ce sous-clonage : le sens Forward et le sens Reverse. La dernière étape de l'intégration chromosomique dans le site attTn7 est unidirectionnelle et elle s'effectue au niveau de la région intergénique comprise entre les gènes *glmS* et *phoS* de *S. Typhimurium*. Cette étape nécessite d'avoir au préalable introduit dans la souche de *S. Typhimurium* le plasmide helper pHSG415-tnsABCD à répllication thermosensible. Les différentes constructions réalisées dans le vecteur pUC18R6K-miniTn7T-PacI sont ensuite électroporées dans cette souche et les clones sont sélectionnés à 37 °C en présence de chloramphenicol. Les clones Cm<sup>R</sup> ont normalement



intégré la fusion transcriptionnelle aux sites attTn7 car les vecteurs recombinants pUC18R6K-miniTn7T-PacI ne se répliquent que dans une souche  $\lambda$ pir. Ces clones ont également perdu le plasmide pHSG415-tnsABCD car celui-ci est incapable de se répliquer à 37 °C. Le sens d'intégration des différentes fusions a été vérifié en utilisant les couples d'amorces glmS-For/Cm-verif et Lux-verif/glmS-Rev (résultats non montrés) et nous avons obtenu une insertion de nos 3 fusions dans les 2 sens d'insertion possibles.

## V. Analyse de l'activité des fusions Psig70\_c35-lux et PpagN-lux

### 5-1 Comparaison des activités des fusions en fonction du sens d'intégration

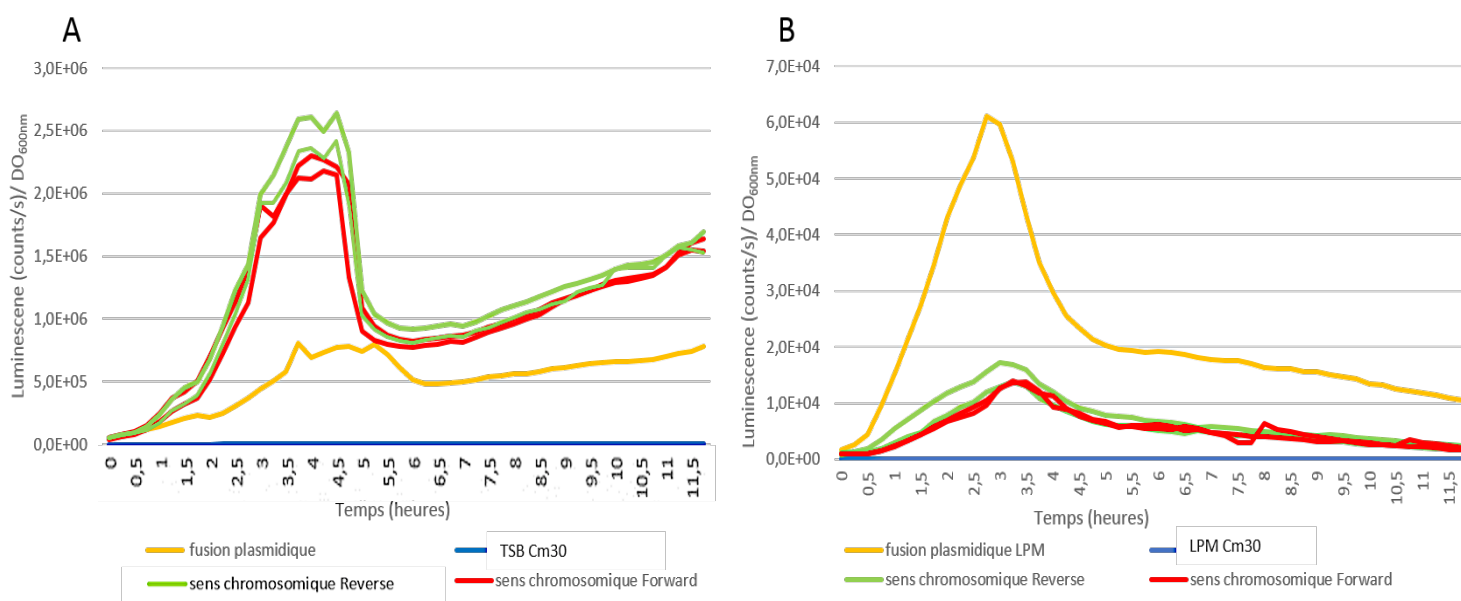
Nous avons comparé la luminescence émise par les souches hébergeant les fusions chromosomiques Psig70\_c35-lux et PpagN-lux en fonction du sens d'orientation. Deux clones de chaque sens (Reverse et Forward) ont été testés. Les valeurs maximales de luminescence sont obtenues après 3 à 4 heures de culture, soit à la fin de la phase exponentielle de la croissance bactérienne, puis l'activité diminue à partir de 4,5 heures de culture. Cette chute correspond à l'entrée en phase stationnaire de croissance de nos bactéries (non présentées). Ces résultats sont en accord avec des travaux de Koga et al qui avaient montré une décroissance brusque de l'activité luciférase lors de la phase stationnaire chez *E. coli* (45). Nous observons également que l'activité transcriptionnelle des fusions Psig70\_c35-lux est beaucoup plus élevée que celle des fusions PpagN-lux (**Figure 14**). La comparaison des activités des fusions chromosomiques en fonction du sens d'orientation, Reverse ou Forward, n'a pas mis en évidence de différence d'émission de luminescence entre les clones. En effet, les valeurs maximales de luminescence sont comprises entre  $2,2 \times 10^6$  et  $2,6 \times 10^6$  counts/s pour les deux sens d'intégration de la fusion Psig70\_c35-lux et entre  $1,3 \times 10^4$  et  $1,7 \times 10^4$  counts/s pour la fusion PpagN-lux (**Figure 14**). Ce résultat suggère que le sens d'intégration des fusions dans le site attTn7 de *S. Typhimurium* n'a pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle des promoteurs d'intérêt. Nous avons donc choisi pour la suite, de travailler avec l'ensemble des constructions orientées dans le sens Forward comme représenté sur la **Figure 15**.

## 5-2 Comparaison des activités des fusions en fonction du support génétique

L'activité *in vitro* des fusions transcriptionnelles plasmidiques et chromosomiques Psig70\_c35-*lux* et PpagN-*lux* a également été comparée (**Figure 14**).

Pour les fusions plasmidiques, la valeur maximale de luminescence pour la fusion Psig70\_c35-*lux* est d'environ  $8,0 \times 10^5$  counts/ml, soit environ trois fois moins que pour la fusion chromosomique. A l'inverse, pour la fusion plasmidique PpagN-*lux*, une valeur maximale de luminescence d'environ  $6,0 \times 10^4$  counts/s a été atteinte, soit quatre fois plus que pour la fusion chromosomique.

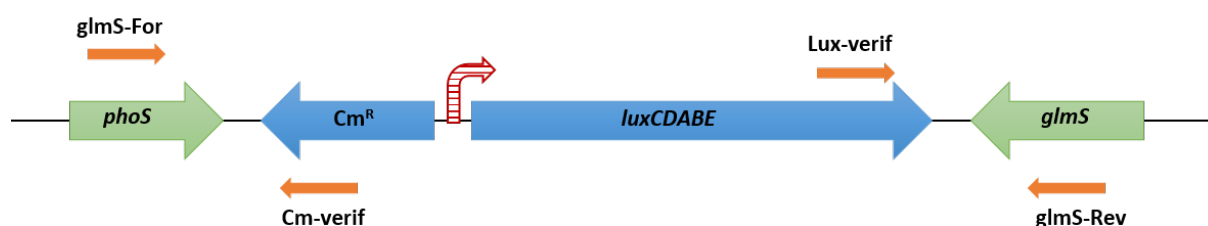
En parallèle, la fusion PØ-*lux* chromosomique a été testée et validée afin de s'assurer de l'absence d'émission de luminescence sur une cinétique de 12 h (données non représentées), pour l'utiliser comme témoin négatif.



**Figure 14 : Comparaison de l'activité des constructions plasmidiques et chromosomiques des fusions Psig70\_c35-*lux* et PpagN-*lux***

Le graphique représente la luminescence émise par différents clones possédant la fusion Psig70\_c35-*lux* en A et les clones avec la fusion PpagN-*lux* en B, en fonction de leur DO<sub>600nm</sub>. Les résultats ont été obtenus après une cinétique de 12 h sur le lecteur Spark en plaque 96 puits avec 200 µL de suspension bactérienne diluée au 1/100<sup>ème</sup> dans du TSB en A et dans du LPM en B. Les témoins négatifs

correspondent à la courbe bleue avec le TSB Cm30 pour le graphique A et le milieu LPM pour le graphique B. Les courbes vertes représentent les souches possédant les fusions chromosomiques dans le sens Reverse, les courbes rouges indiquent la luminescence émise par les souches avec la fusion chromosomique orientée dans le sens Forward. Les courbes représentées en jaune correspondent à la luminescence détectée pour les fusions plasmidiques. Ces résultats proviennent d'une expérience réalisée en triplicate.



**Figure 15 : Représentation schématique de l'intégration chromosomique des fusions transcriptionnelles dans *S. Typhimurium* 14028 (sens Forward)**

Les flèches vertes représentent les gènes au niveau du chromosome de *S. Typhimurium* qui délimitent le site d'intégration de la transposition Tn7. Les flèches bleues correspondent à l'intégration des fusions transcriptionnelles, composées du gène de résistance au chloramphénicol ( $Cm^R$ ) et de l'opéron *lux*, entre le gène *phoS* et le gène *glmS*. La flèche brisée rouge représente le promoteur d'intérêt cloné en amont de l'opéron *lux*. Les flèches oranges correspondent aux amorces utilisées pour la vérification par PCR une fois la transposition réalisée.

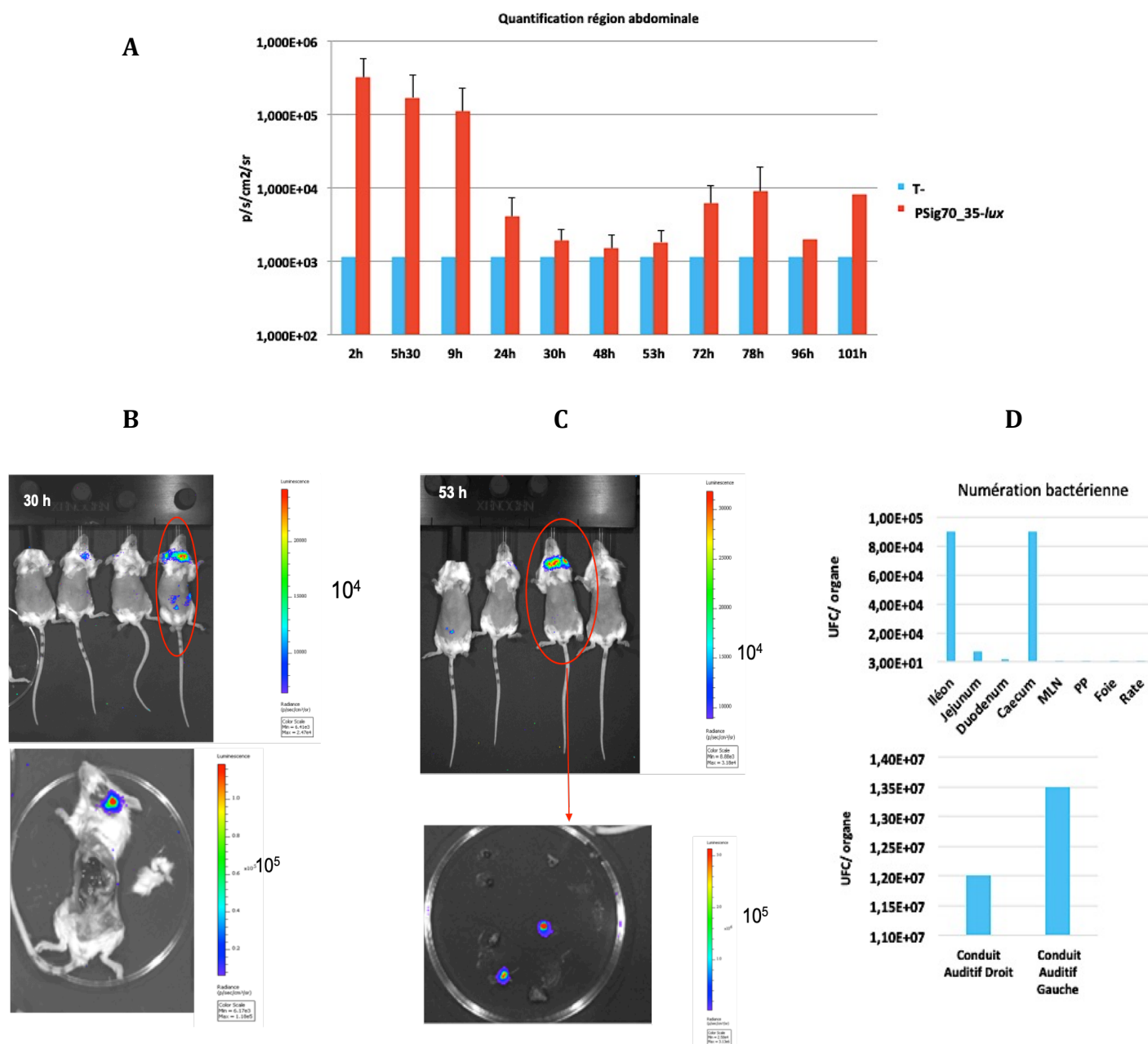
## VI. Seconde manipulation *in vivo*

Après avoir analysé les résultats de la manipulation préliminaire, il a été montré une perte du plasmide au cours de l'infection, ainsi qu'une transcription du gène *pagN* dans le caecum et les ganglions mésentériques à 48 h p.i. puis dans l'ensemble des organes étudiés. Une seconde manipulation *in vivo* a été réalisée pour étudier plus spécifiquement la transcription du gène *pagN*, en utilisant 3 fusions : Psig70\_c35-*lux* (témoin positif), PpagN-*lux* et PØ-*lux* (témoin négatif) intégrées dans le chromosome de la souche de *S. Typhimurium* 14028 et inoculée chez 3 lots de souris. L'objectif de cette manipulation est de retrouver des signaux identiques

à la manipulation préliminaire afin de confirmer l'expression de PagN au sein du caecum et des ganglions mésentériques. Pour cela, les souris ont été imagées à l'aide de l'IVIS® Spectrum aux temps d'observation définis (**Figure 10**). Après chaque temps d'observation, les souris ont été autopsiées et imagées sur boîtes avec les organes d'intérêt, avec le même protocole que lors de la première manipulation *in vivo*. De la même manière que lors de la manipulation préliminaire, nous allons présenter les résultats obtenus pour les souris inoculées par les souches portant la fusion PpagN-*lux* chromosomique et Psig70\_c35-*lux* chromosomique et les comparer aux résultats obtenus avec les souris contrôles, inoculées par la souche portant la fusion sans promoteur PØ-*lux* chromosomique.

### 6-1 Fusion Psig70\_c35-*lux* chromosomique

Des signaux de luminescence supérieurs à la souris contrôle ont pu être détectés chez les souris portant la fusion Psig70\_c35-*lux* chromosomique tout au long de la manipulation. Les signaux les plus élevés ont pu être observés avec une échelle de radiance à  $10^6$  entre 2 h p.i. et 24 h p.i. et entre 72 h p.i. et 101 h p.i. avec une échelle de radiance à  $10^4$ . Cependant, entre 30 h et 53 h p.i., ce sont des signaux plus faibles qui ont été détectés montrant une certaine cinétique de luminescence (**Figure 16 A**). A partir de 30 h p.i., nous avons pu détecter des signaux supérieurs à la souris contrôle au niveau de la sphère ORL chez une première souris (**Figure 16 B**), puis chez une seconde souris à 53 h p.i. entraînant l'autopsie et le prélèvement des différents organes d'intérêt ainsi que les conduits auditifs droit et gauche de cette dernière (**Figure 16 C**). La numération bactérienne nous a permis de montrer la colonisation des bactéries au niveau de l'iléum, du caecum et des conduits auditifs droit et gauche (**Figure 16 D**), ces derniers ayant aussi permis d'observer une luminescence avec une échelle de radiance à  $10^5$ .

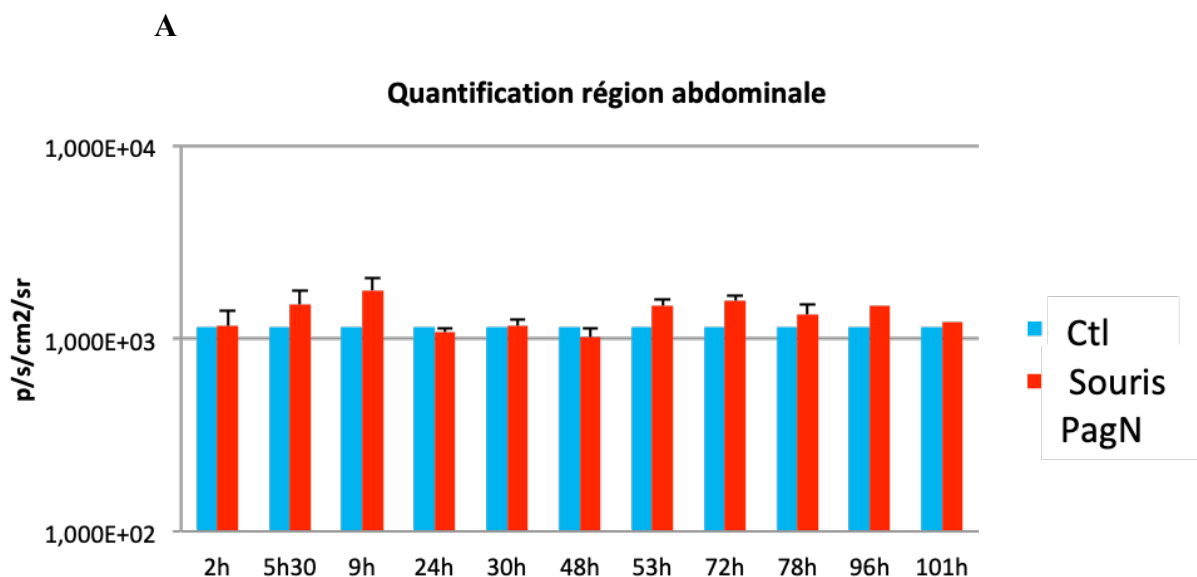


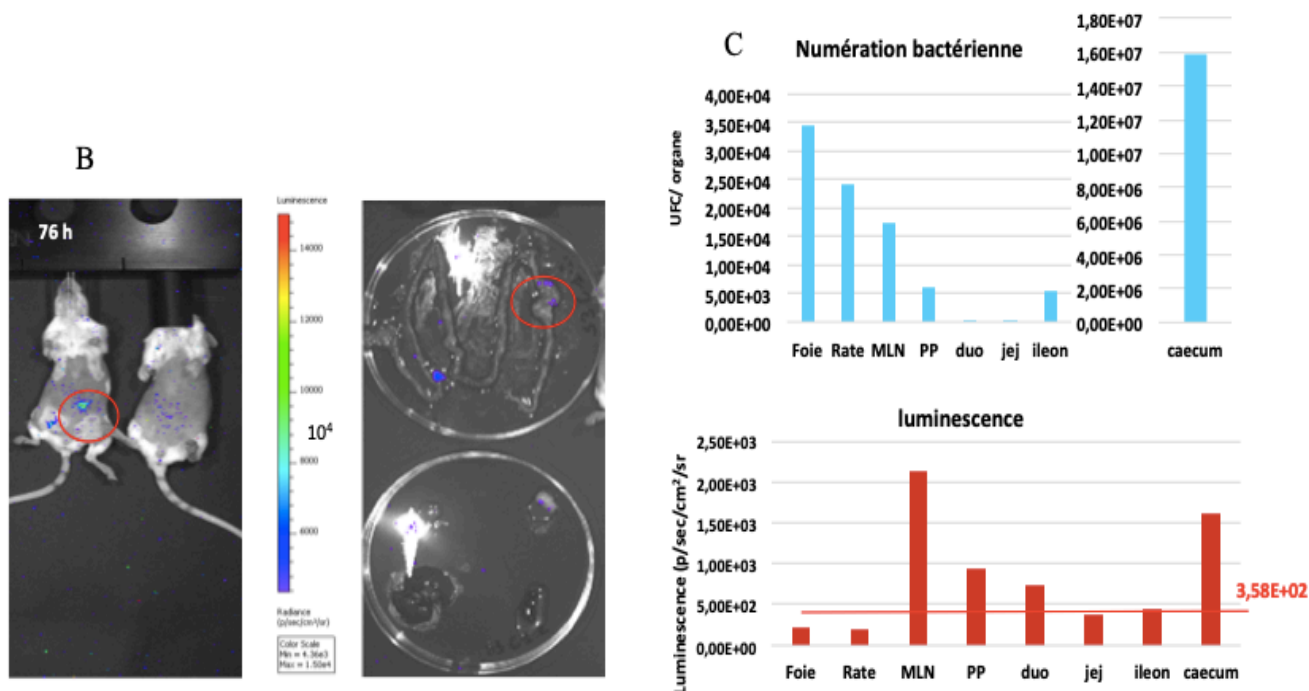
**Figure 16 : Imagerie *in vivo* et *ex vivo* de souris portant la souche avec la fusion Psig70\_c35-lux chromosomique**

A) Quantification de la luminescence sur les souris imagées *in vivo*. Les barres bleues représentent la luminescence quantifiée au niveau de la région abdominale pour les souris contrôles, les barres rouges pour les souris inoculées avec la fusion Psig70\_c35-lux chromosomique. B) Imagerie et autopsie d'une première souris à 30 h p.i. pour laquelle un signal a été détecté au niveau de la sphère ORL. Après ouverture, le signal semble se situer au niveau de l'appareil auditif gauche. C) Autopsie et imagerie d'une seconde souris à 53 h p.i. ayant le même signal qu'en B. Après ouverture et extraction des différents organes, le signal semble se situer au niveau des conduits auditifs gauche et droit. D) Comparaison de la numération bactérienne après extraction des différents organes d'intérêt sur la souris imagée en C, les conduits auditifs sont les plus colonisés.

## 6-2 Fusion PpagN-*lux* chromosomique

Des signaux de luminescence supérieurs à la souris contrôle ont pu être détectés chez les souris inoculées avec la souche PpagN-*lux* chromosomique entre 5 h 30 et 9 h p.i. et à partir de 53 h p.i. (**Figure 17 A**). Les signaux sont plus faibles que lors de la manipulation préliminaire *in vivo*. A partir de 76 h p.i. nous avons retrouvé des signaux au niveau de la région abdominale d'une des souris inoculées. Après autopsie et extraction des différents organes sur boîte, nous avons pu mettre en évidence des signaux de luminescence supérieurs à la souris contrôle au niveau des ganglions mésentériques et du caecum (**Figure 17 B**). Après numération bactérienne des différents organes extraits, nous avons pu montrer une colonisation bactérienne au niveau du foie, de la rate, des ganglions mésentériques, des plaques de Peyer, de l'iléon et plus fortement au niveau du caecum (**Figure 17 C**). Parmi les organes colonisés, seuls les ganglions mésentériques, le caecum et, à un degré moindre, les plaques de Peyer ont émis des signaux supérieurs à la souris contrôle. Ces résultats confirment ceux obtenus lors de la manipulation *in vivo* préliminaire, avec cependant une cinétique plus tardive.





**Figure 17 : Imagerie *in vivo* et *ex vivo* de souris portant la souche avec la fusion PpagN-*lux* chromosomique**

A) Quantification de la luminescence sur les souris imagées *in vivo*. Les barres bleues représentent la luminescence quantifiée au niveau de la région abdominale pour les souris contrôles, les barres rouges pour les souris inoculées avec la fusion PpagN-*lux* chromosomique. B) Imagerie à 76 h p.i. d'une souris ayant un signal au niveau de la région abdominale. Autopsie et imagerie des différents organes extraits sur boîte : le caecum et les ganglions mésentériques montrent un signal de luminescence. C) Confirmation de la colonisation bactérienne au niveau des ganglions mésentériques et du caecum avec une luminescence supérieure à la souris contrôle.

### 6-3 Bilan de la seconde manipulation *in vivo*

Malgré des signaux plus faibles que ceux obtenus lors de la première infection expérimentale, cette seconde manipulation *in vivo*, avec des souches portant les fusions transcriptionnelles sur le chromosome, nous a permis de confirmer la transcription du gène *pagN* au sein du caecum et des ganglions mésentériques dans ce modèle murin d'infection systémique létale. Cependant, nous avons aussi pu mettre en évidence une cinétique d'expression plus tardive avec un premier signal détecté au niveau du caecum à partir de 72 h p.i. contrairement à la

première manipulation où le signal avait été détecté à 48 h p.i. Par ailleurs, l'utilisation d'une fusion *lux* dépourvue de tout promoteur nous a permis de disposer d'un témoin négatif fiable et la cinétique d'infection a pu être facilement visualisée grâce au témoin positif (fusion Psig70\_c35-*lux*).



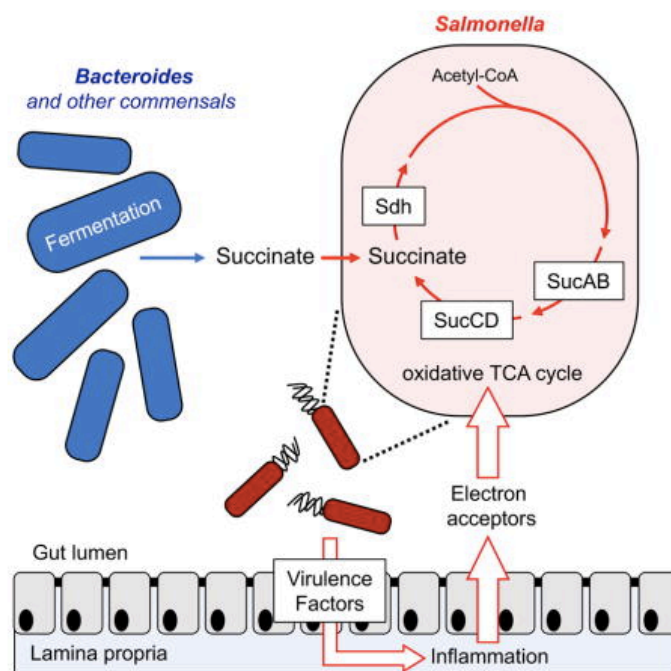
## Discussion

*S. Typhimurium* possède 3 facteurs d'entrée dans les cellules non phagocytaires clairement identifiés : le T3SS-1 et 2 invasines, Rck et PagN. Si le rôle *in vivo* du T3SS-1 est en partie connu, celui des 2 invasines est très peu documenté. Afin de mieux comprendre la fonction *in vivo* de ces facteurs d'entrée, les deux objectifs de cette thèse consistaient, d'une part, à étudier leurs conditions d'expression *in vitro* et, d'autre part, à déterminer les sites et la cinétique d'expression de ces 3 facteurs dans un modèle murin.

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé des fusions transcriptionnelles exprimant l'opéron *lux* sous le contrôle des promoteurs des facteurs d'entrée de *Salmonella* : Rck, PagN et InvF (T3SS-1), permettant de visualiser et de quantifier leur activité. La fonctionnalité de ces constructions a tout d'abord été vérifiée en mettant en évidence l'activité transcriptionnelle des promoteurs d'intérêt, dans des conditions de culture *in vitro* enrichies en agent activateurs connus. Cette validation des fusions transcriptionnelles nous a permis de continuer notre étude en étudiant l'activité de différents métabolites sur nos constructions. A partir d'une recherche bibliographique, nous avons testé 14 molécules présentes dans le milieu intestinal et connues pour avoir un effet activateur sur la virulence d'entérobactéries dont *S. Typhimurium*. Nos premiers essais ont montré que, parmi ces 14 métabolites, deux d'entre eux semblaient avoir un effet activateur sur la fusion PinvF-*lux* : le thiosulfate et le succinate.

Le thiosulfate présent dans la lumière intestinale est un dérivé du H<sub>2</sub>S produit par le microbiote ; il est ensuite oxydé durant la réaction inflammatoire déclenchée par la bactérie, à l'aide de ses appareils de sécrétion T3SS-1 et T3SS-2, pour former un nouvel accepteur d'électrons, le tétrathionate. En effet, *S. Typhimurium* provoque une inflammation aiguë de l'intestin via ces facteurs de virulence pour envahir l'épithélium et survivre dans les macrophages. Les neutrophiles infiltrés lors de l'inflammation subissent un stress oxydatif entraînant la libération de dérivés réactifs de l'oxygène, les ROS. L'oxydation du thiosulfate par les ROS produit du tétrathionate dans la lumière intestinale (46). Ce dernier va ensuite être utilisé par *S. Typhimurium* comme accepteur d'électrons pour la respiration via le cycle de Krebs, ce qui va lui permettre de rivaliser avec les bactéries du microbiote qui utilisent la fermentation et non l'oxygène pour se multiplier, expliquant ainsi la capacité et l'intérêt de ce pathogène à entraîner une inflammation.

De plus, pour actionner le cycle de Krebs, *S. Typhimurium* va utiliser des dérivés de la fermentation produits par le microbiote tel que le succinate comme nutriment (**Figure 18**) (47).



**Figure 18 : Utilisation des métabolites du microbiote pour le cycle de Krebs de *Salmonella* (47)**

Les bâtonnets bleus représentent les bactéries du microbiote libérant des métabolites issus de la fermentation tel que le succinate. *Salmonella* va pouvoir initier son cycle de Krebs en utilisant le succinate et les récepteurs d'électrons engendrés par l'inflammation au sein de la muqueuse intestinale grâce à ses facteurs de virulence (comme le T3SS-1).

Le succinate est un métabolite majoritairement produit par *Bacteroides thetaiotaomicron*, une bactérie commensale intestinale. Des auteurs ont montré une présence accrue du succinate lorsque les bactéries *Bacteroides thetaiotaomicron* sont présentes sur le site d'infection, ce qui favorise l'expression du T3SS d'*E. coli* entéro-hémorragique (48). Cela pourrait expliquer l'effet activateur *in vitro* du succinate sur la fusion PinvF-*lux* qui représente le T3SS-1 et donc le facteur de virulence indispensable à *Salmonella* pour provoquer l'inflammation. Cette

bactérie pathogène est donc capable d'adapter son métabolisme central à l'aide des métabolites environnants et de l'inflammation dans le but de coloniser et de concurrencer le microbiote.

De la même façon que le tétrathionate, il semblerait que le nitrate soit utilisé comme accepteur d'électrons par *S. Typhimurium* (47). Cependant, lors de nos tests *in vitro* et contrairement au thiosulfate, ce dernier ne semblait pas activer notre fusion PinvF-*lux*. Il serait donc intéressant de tester de nouveau *in vitro* ce métabolite avec un protocole modifié. En effet, nos résultats préliminaires nécessitent d'envisager une nouvelle méthode face à une activité de base élevée de la fusion PinvF-*lux* qui possède des valeurs de luminescence supérieure aux autres fusions lorsqu'elle se retrouve dans des milieux comme le TSB ou du LB à 50 mM en NaCl. Sachant que la présence de NaCl a un effet activateur, il faudrait de nouveau tester la fusion PinvF-*lux* dans un milieu minimum afin de diminuer le bruit de fond de la luminescence à l'état basal.

Face à ces agents potentiellement activateurs, d'autres sont connus pour au contraire protéger l'hôte contre la colonisation par des bactéries pathogènes. En effet, au sein du microbiote, les commensaux intestinaux vont médier la résistance de manière directe, en occupant les niches vacantes, et de manière indirecte en synthétisant des métabolites et en activant des voies immunitaires anti-pathogènes (49). En 2018, dans une étude *in vivo* chez des souris non traitées par antibiothérapie, il a été observé une diminution de l'infection par *S. Typhimurium* grâce à la production d'acide gras à chaînes courtes tel que le propionate par les *Bacteroides* (49). Dans l'intestin, ces bactéries fermentent les sucres complexes et produisent ainsi des acides gras à chaînes courtes comme l'acétate, le propionate et le butyrate. Cependant, dans cette étude, seul le propionate semble limiter la croissance de *S. Typhimurium*, mettant ainsi en évidence un mécanisme de résistance et de protection de l'hôte face à une entérobactérie. De plus, il semblerait qu'en réponse à une perturbation et contre un pathogène rencontré, il y ait une variation en terme de nombre de certaines bactéries commensales. En effet, il a été montré que l'infection par *Salmonella* chez des souris humanisées a entraîné une augmentation des différentes *Entérobacteriaceae*, en comparaison à l'infection par un pathogène fongique opportuniste *Candida albicans* (50), avec deux métabolites identifiés : le disulfure de glutathion et le disulfure de glutathion cystéine, codant pour des protéines antioxydantes conférant une protection face au stress oxydatif déclenché par l'infection avec *S. Typhimurium*. Par ailleurs, un niveau élevé de butyrate intestinal a lui aussi montré une capacité à diminuer l'expansion de *Salmonella*. En effet, au cours d'autres travaux, il a été

prouvé que le traitement antibiotique par Streptomycine chez la souris entraîne une déplétion des *clostridies* commensales producteurs de butyrate, causant ainsi une augmentation de la colonisation par *S. Typhimurium*. Cette expansion du pathogène est due à une augmentation de l'oxygénation de l'épithélium intestinal. Les facteurs de virulence de *Salmonella*, responsables de l'inflammation intestinale, et un traitement antibiotique, provoquant une déplétion des *clostridies*, favorisent donc la croissance aérobie de la bactérie (51) expliquant parfois une rechute bactériologique lors de traitement par antibiothérapie non justifié.

Face à l'impact et l'importance du microbiote pour lutter contre les entérobactéries telles que *Salmonella*, l'utilisation de probiotiques semble être une aide précieuse pour renforcer nos défenses et diminuer la colonisation bactérienne. Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, confèrent un bénéfice en terme de santé pour son hôte. Ils peuvent être utilisés chez les sujets sains pour réduire le risque de développer certaines maladies, mais aussi chez les sujets présentant déjà des signes cliniques et symptômes pour les soulager notamment lors d'une diarrhée aiguë. En effet, les probiotiques sont connus pour réduire la survie et la colonisation des agents pathogènes entériques grâce à divers mécanismes. Les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les probiotiques les plus couramment utilisés et des études sur l'homme ont été menées pour connaître leurs effets bénéfiques en terme de prévention et de traitement. Une étude Cochrane a notamment recensé l'ensemble des recherches cliniques réalisées sur l'Homme (27). Cette méta-analyse a montré que l'utilisation de certains probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium spp*) permettait d'améliorer les symptômes diarrhéiques en les réduisant de plus de 24 h. D'autres micro-organismes tels que *Saccharomyces boulardii*, ou encore *Escherichia coli* Nissle 1917, font l'objet de travaux chez l'Homme pour des fins prophylactiques ou thérapeutiques. La levure probiotique *Saccharomyces boulardii* est prescrite et utilisée dans le monde entier en prophylaxie des diarrhées infectieuses, c'est une des seules levures qui s'est avérée efficace dans des études cliniques contrôlées (52). Plus récemment, l'utilisation de l'imagerie par bioluminescence a permis de montrer l'efficacité *in vivo* de cette levure chez des souris infectées par *S. Typhimurium* en favorisant son élimination dans les fèces et limitant sa diffusion vers les organes profonds tels que le foie et la rate (53). L'entérobactérie *Escherichia coli* Nissle 1917, quant à elle, est une des rares souches probiotiques qui ne provient pas de bactéries lactiques. Elle est connue pour réduire la colonisation par *S. Typhimurium* grâce à un mécanisme de compétition pour l'acquisition du fer. En effet, lors de l'inflammation, certains nutriments tel

que le fer vont avoir leur disponibilité modifiée au sein du microbiote dans le but de réduire la croissance microbienne. Pour surmonter cette restriction, *Salmonella* utilise des transporteurs spécialisés, les sidérophores, pour acquérir ce métal essentiel et prospérer dans l'intestin. L'ajout d'*Escherichia coli* Nissle 1917 va donc concurrencer l'agent pathogène en rendant le fer moins disponible (54).

Face aux nombreux candidats probiotiques, des critères spécifiques ont été fixés pour évaluer leur efficacité. Ceux-ci sont basés sur l'adhésion aux cellules de l'hôte dans le tractus intestinal, la capacité d'exclure ou de réduire l'adhésion des agents pathogènes, stimuler l'immunité, la capacité à persister et se multiplier dans l'intestin, tout en étant non invasifs, non cancérogènes et non pathogènes (13). Néanmoins, d'après la World Gastroenterology Organisation, il est difficile d'établir une réelle efficacité de l'ensemble des probiotiques retrouvés sur le marché. En effet, leur usage dans le domaine de la clinique nécessite qu'on établisse une relation entre souches spécifiques et bénéfices apportés. Cependant, la majorité des souches utilisées agissent par leurs activités probiotiques de manière similaire. De plus, la plupart des recherches étudient des mélanges de souches, il est donc difficile d'établir une causalité entre les différentes souches utilisées et les bénéfices apportés en terme de santé. La qualité des probiotiques repose sur le fabricant et n'est pas soumise aux normes pharmaceutiques ; il faut donc pouvoir s'assurer de certaines fonctions indispensables pour leur efficacité, notamment leur viabilité et la dose nécessaire à administrer ou encore la conservation du produit.

L'autre objectif de la thèse était de visualiser les sites et la cinétique d'expression des facteurs de virulence de *Salmonella* lors d'une infection *in vivo*. Pour cela, nous avons testé 4 premières fusions : PinvF-*lux*, Prck-*lux*, PpagN-*lux* et Psig70\_c35-*lux* dans *S. Typhimurium* 14028 qui ont été inoculées chez la souris, afin d'observer à l'aide de l'IVIS® Spectrum la bioluminescence à différents points d'observation. Il semblerait que la fusion avec le promoteur PinvF (T3SS-1) ait une activité précoce lors de l'infection, visible à 3 h et 5 h p.i, avec une perte du signal à partir de 24 h p.i. A l'inverse, la fusion avec le promoteur PpagN semble montrer une activité plutôt tardive, avec une luminescence très élevée à partir de 72 h p.i, soit quand la souris rentre en septicémie. Il est vrai que PagN est connu pour être activé dans des milieux à faible concentration en ions phosphate et magnésium qui miment les conditions retrouvées dans les macrophages (36) expliquant ainsi la forte luminescence observée dans l'ensemble du corps de la souris en bactériémie. De plus, le premier signal obtenu à 48 h p.i nous a particulièrement intéressé car il n'a encore jamais été montré une

expression de PagN dans un organe comme le caecum. Néanmoins, il faudrait lors d'une prochaine manipulation essayer de retrouver ce même signal afin de confirmer ce site d'expression. Après quantification de la colonisation bactérienne et de la luminescence émise par les organes prélevés chez les souris inoculées par la fusion PpagN-*lux*, nous avons observé une absence totale de luminescence dans l'iléon qui était pourtant un des organes les plus colonisés, montrant une absence d'activité du promoteur PpagN au niveau de cet organe. Pour la fusion Prck-*lux*, nous ne pouvons rien conclure car nous n'avons observé aucune luminescence. Cependant, l'absence de signaux aux différents temps d'observation ne veut pas dire que le promoteur Prck n'a pas été activé au cours de la manipulation *in vivo*. En effet, il est possible que le signal fût trop faible et non détecté par l'imageur car en-dessous du seuil de détection. De plus, n'ayant pas réalisé de manipulation *ex vivo* à chaque temps, nous n'avons pas pu confirmer l'absence totale de luminescence au sein de la souris sur les organes isolés.

Au vu de la perte du signal avec la fusion Psig70\_c35-*lux* utilisée comme témoin positif lors de cette expérience préliminaire, nous avons émis l'hypothèse de la perte du plasmide par les bactéries. Afin de confirmer cette perte, nous avons réalisé des dénombrements sur boîte SS sans antibiotique et sur boîte SS supplémentée en chloramphénicol et les résultats ont indiqué une colonisation 100 fois plus importante dans le milieu sans antibiotique. De la même manière, le dénombrement supplémentaire réalisé avec la fusion PpagN-*lux* a également montré une perte importante du plasmide. Cette perte à J3 et J4 p.i peut s'expliquer par l'instabilité du plasmide *in vivo* dû à l'absence de pression de sélection et à sa taille d'environ 10 kb qui est conséquente et coûteuse pour la bactérie lui demandant de l'énergie supplémentaire pour le conserver sans nécessité. Une expérimentation similaire réalisée avec ce même vecteur pCS26luxCDABE-Cm et *S. Typhimurium* chez la souris n'avait pas montré de perte du plasmide, mais la cinétique d'observation de la luminescence ne dépassait pas 24 h, contrairement à la nôtre qui a duré 96 h (55). De la même manière, l'utilisation de ce vecteur pour suivre l'expression de 2 fimbriae de *S. Infantis* chez la souris et le poulet n'a posé aucun problème de stabilité car les animaux ont été euthanasiés et imaged à 24 h p.i (56).

Pour remédier à la perte du plasmide par les bactéries et afin de confirmer les résultats obtenus avec la fusion PpagN-*lux*, nous avons réalisé une seconde manipulation *in vivo* en utilisant 3 constructions plasmidiques intégrées au sein du chromosome de *S. Typhimurium* 14028 : la fusion PpagN-*lux*, la fusion Psig70\_c35-*lux* comme témoin positif et une nouvelle fusion sans promoteur PØ-*lux* qui correspond au témoin négatif. Pour cela, nous avons utilisé

le mécanisme de transposition Tn7 afin de sous-cloner les plasmides pCS26luxCDABE-Cm dans un vecteur suicide, le pUC18R6K-miniTn7T-PacI, qui va permettre l'intégration unidirectionnelle du plasmide dans le chromosome de *S. Typhimurium* au niveau du site *attTn7*, à l'aide d'un plasmide helper pHSG415-tnsABCD (43). Après avoir testé l'activité des fusions chromosomiques Psig70\_c35-*lux* et PpagN-*lux* en mesurant leur luminescence (**Figure 10**), nous n'avons pas observé de différence entre les deux sens d'intégration, confirmant les résultats précédemment obtenus par Shivak et al. (43). Lors du test des fusions chromosomiques au lecteur Spark, nous avons observé la baisse d'émission de luminescence par les bactéries à partir de 4 h de culture pour l'ensemble des souches. Cela peut s'expliquer avec la courbe de croissance bactérienne car *Salmonella* rentre en phase stationnaire à partir de 4 à 4,5 h de culture et, durant cette phase, la bactérie est considérée comme métaboliquement moins active. En effet, une diminution importante du transporteur d'électron NAD utilisé lors de la phosphorylation oxydative entraîne une baisse brutale de l'émission de lumière des cellules d'*E. coli* exprimant la luciférase bactérienne lors du passage à la phase stationnaire *in vitro* (45).

La suite de nos travaux a donc consisté à réaliser une seconde manipulation *in vivo* avec les souches de *Salmonella* portant les fusions transcriptionnelles chromosomiques afin de confirmer les sites d'expression de PagN identifiés précédemment. Pour cela, nous avons ajouté des temps de nécropsies après chaque temps d'observation des lots de souris à l'IVIS® Spectrum afin de s'assurer de la présence ou non d'un signal luminescent sur les souris imagées. Cette seconde manipulation nous a permis dans un premier d'obtenir des témoins positif et négatif fiables. En effet, la fusion Psig70\_c35-*lux* chromosomique a montré des signaux de luminescence tout au long de la manipulation nous permettant ainsi de visualiser une cinétique d'infection. Nous avons obtenu des signaux élevés entre 2 h et 24 h p.i avec une échelle de radiance supérieur à  $10^5$ , puis des signaux plus faibles entre 24 h et 53 h avec une échelle de radiance inférieure à  $10^4$ , tout comme lors de la manipulation *in vivo* préliminaire. Cette variation peut s'expliquer par l'élimination des bactéries dans les selles des souris en début d'infection ; nous avons donc confirmé une détection de signal faible et plus difficile entre 24 h et 53 h p.i. La luminescence a ensuite été détectée jusqu'à la fin de la manipulation avec une échelle de radiance proche de  $10^4$  (**Figure 16**). De plus, nous avons aussi détecté de la luminescence au niveau de la sphère ORL de 2 souris différentes à partir de 30 h p.i. Afin de comprendre d'où provenait le signal, les conduits auditifs droit et gauche d'une des souris ont été autopsiés et imagés montrant un signal à  $10^6$  d'échelle de radiance. Après avoir réalisé



la bactériologie, le niveau de colonisation était supérieur aux organes tels que le caecum et l'iléon où la colonisation était attendue. Il est possible que les souris se soient contaminées à ce niveau en se grattant avec leurs pattes contaminées par les bactéries provenant des fèces, car ce site de colonisation par *Salmonella* n'est pas connu dans la littérature et n'a pas été retrouvé chez l'ensemble des souris inoculées. A l'aide de la fusion PpagN-*lux* chromosomique, nous avons pu observer des signaux de luminescence au niveau de caecum et des ganglions mésentériques, nous permettant de confirmer la transcription du gène *pagN* au sein de ces organes. Nous démontrons aussi une expression plus tardive du facteur d'entrée avec des premiers signaux de luminescence détectés plus faiblement et plus tardivement que lors de la première manipulation *in vivo*. En effet, il a fallu attendre 72 h p.i pour obtenir un signal avec une échelle de radiance à  $10^3$  au lieu de 48 h p.i lors de la manipulation préliminaire. Nous expliquons cette différence par tout d'abord le nombre de copies du plasmide pCS26 lors de sa réplication qui est d'environ 5 contre 1 copie pour les fusions chromosomiques, augmentant ainsi le nombre de copies des fusions et impactant les résultats de luminescence. Cela a été montré en amont avec des tests *in vitro* (**Figure 14**) où l'on observe une luminescence nettement supérieure avec la fusion PpagN-*lux* plasmidique qu'avec la fusion PpagN-*lux* chromosomique. De plus, cette expression tardive s'explique aussi par la cinétique de colonisation. En effet, nous avons pu retrouver à 76 h p.i le même niveau de colonisation de chaque organe qu'à 48 h p.i lors de la manipulation préliminaire. Ce léger décalage dans la cinétique de colonisation explique pourquoi nous n'avons pas pu retrouver le stade d'infection systémique lors de la seconde manipulation *in vivo*. Ces résultats prometteurs nous ont donc permis d'identifier les sites et la cinétique d'expression de l'invasine PagN dans un modèle murin d'infection systémique létale. L'expression de PagN au niveau du caecum et des ganglions mésentériques suggère un rôle de l'invasine dans la colonisation intestinale des souris par *S. Typhimurium*. Un effet de PagN dans la pathogénicité de *Salmonella* avait déjà été montré dans la littérature où des souris inoculées avec des souches mutantes délétées du gène *pagN* survivaient plus longtemps et avec moins de signes cliniques que celles infectés par la souche sauvage (57). Par ailleurs, PagN est aussi connue pour son rôle dans l'adhésion/invasion à certaines cellules. Il serait donc intéressant d'identifier dans le caecum un type cellulaire précis où est exprimé l'invasine, car nous savons déjà que la protéine semble adhérer aux cellules épithéliales HT-29 (37,57). Cette étude pourrait être réalisée en utilisant des fusions transcriptionnelles fluorescentes et des techniques d'analyse par cytométrie en flux et microscopie confocale.



Par la suite, et de la même manière que pour PagN, il serait souhaitable de tester la transcription de l'opéron *lux* sous le contrôle des promoteurs Rck et T3SS-1 afin d'identifier et de confirmer des organes spécifiques de l'expression de ces facteurs de virulence.

## Conclusion

Grâce aux deux manipulations *in vivo* réalisées chez la souris, nous avons pu obtenir quelques données sur le rôle de la protéine PagN dans la virulence de *S. Typhimurium*. En effet, nous avons identifié deux organes où l'invasine est exprimée au cours de l'infection, le caecum et les ganglions mésentériques. Nous avons aussi pu montrer une cinétique d'expression *in vivo* précoce du T3SS-1 et une cinétique plus tardive pour l'invasine PagN. De plus, à l'aide des différents métabolites testés *in vitro*, nous avons montré un possible effet activateur, qui reste à confirmer, du thiosulfate et du succinate sur la fusion PinvF-*lux* utilisée pour étudier le T3SS-1. Ces deux métabolites sont retrouvés au sein de la lumière intestinale et sont produits par les bactéries du microbiote et pourraient donc être utilisés par *Salmonella* pour favoriser la colonisation de l'hôte. Enfin, à l'aide de la littérature, nous avons aussi pu établir l'impact du microbiote et l'usage de probiotiques sur la prise en charge des diarrhées aiguës d'origine infectieuse. Des effets bénéfiques ont été montrés dans certains cas, mais des études complémentaires seront nécessaires pour démontrer réellement l'efficacité de ces traitements.

## Bibliographie

1. Sánchez-Vargas FM, Abu-El-Haija MA, Gómez-Duarte OG. Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis*. 1 nov 2011;9(6):263–77.
2. Popoff MY, Bockemühl J, Gheesling LL. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. *Res Microbiol*. 1 sept 2004;155(7):568–70.
3. Velge P, Wiedemann A, Rosselin M, Abed N, Boumart Z, Chaussé AM, et al. Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis. *MicrobiologyOpen*. sept 2012;1(3):243–58.
4. Gal-Mor O. Persistent Infection and Long-Term Carriage of Typhoidal and Nontyphoidal Salmonellae. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 28 nov 2018 [cité 2 déc 2019];32(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6302356/>
5. Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections. *Clin Microbiol Rev*. oct 2015;28(4):901–37.
6. Wall PG, Chen J. Moving from risk communication to food information communication and consumer engagement. *NPJ Sci Food* [Internet]. 30 nov 2018 [cité 6 déc 2019];2. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6550139/>
7. WHO | Outbreak of *Salmonella* Agona infections linked to internationally distributed infant formula – France [Internet]. WHO. [cité 6 déc 2019]. Disponible sur: <http://www.who.int/csr/don/22-december-2017-salmonella-agona-infections-france/en/>
8. Harvey RR, Marshall KEH, Burnworth L, Hamel M, Tataryn J, Cutler J, et al. International outbreak of multiple Salmonella serotype infections linked to sprouted chia seed powder – USA and Canada, 2013–2014. *Epidemiol Infect*. juin 2017;145(8):1535–44.
9. Woodward DL, Khakhria R, Johnson WM. Human salmonellosis associated with exotic pets. *J Clin Microbiol*. nov 1997;35(11):2786–90.
10. Back D-S, Shin G-W, Wendt M, Heo G-J. Prevalence of Salmonella spp. in pet turtles and their environment. *Lab Anim Res*. sept 2016;32(3):166–70.
11. CDC - Eight Multistate Outbreaks of Human Salmonella Linked to Small Turtles - Salmonella [Internet]. 2019 [cité 6 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/salmonella/small-turtles-03-12/index.html>
12. Ao TT, Feasey NA, Gordon MA, Keddy KH, Angulo FJ, Crump JA. Global Burden of Invasive Nontyphoidal Salmonella Disease, 20101. *Emerg Infect Dis*. juin 2015;21(6):941–9.
13. Gut AM, Vasiljevic T, Yeager T, Donkor ON. Salmonella infection – prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology*,.

2018;164(11):1327–44.

14. Medalla F, Gu W, Mahon BE, Judd M, Folster J, Griffin PM, et al. Estimated Incidence of Antimicrobial Drug–Resistant Nontyphoidal Salmonella Infections, United States, 2004–2012. *Emerg Infect Dis.* janv 2017;23(1):29–37.
15. Hahn S, Kim S, Garner P. Reduced osmolarity oral rehydration solution for treating dehydration caused by acute diarrhoea in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(1):CD002847.
16. Shane AL, Mody RK, Crump JA, Tarr PI, Steiner TS, Kotloff K, et al. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 déc 2017;65(12):e45–80.
17. Médicaments antiémétiques dans le traitement symptomatique des nausées et vomissements [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 6 déc 2019]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2966830/fr/medicaments-antiemetiques-dans-le-traitement-symptomatique-des-nausees-et-vomissements](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2966830/fr/medicaments-antiemetiques-dans-le-traitement-symptomatique-des-nausees-et-vomissements)
18. Salmonellose [Internet]. Institut Pasteur. 2016 [cité 16 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/salmonellose>
19. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 9 juin 2009;9(1):123.
20. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol WJG.* 7 août 2015;21(29):8787–803.
21. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis.* mai 2016;22(5):1137–50.
22. Vogt SL, Finlay BB. Gut microbiota-mediated protection against diarrheal infections. *J Travel Med.* 29 avr 2017;24(Suppl 1):S39–43.
23. Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, et al. Pretreatment of Mice with Streptomycin Provides a Salmonella enterica Serovar Typhimurium Colitis Model That Allows Analysis of Both Pathogen and Host. *Infect Immun.* mai 2003;71(5):2839–58.
24. Bengmark S, Martindale R. Prebiotics and synbiotics in clinical medicine. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* avr 2005;20(2):244–61.
25. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Ther Adv Gastroenterol.* janv 2013;6(1):39–51.
26. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on

Human Health. *Nutrients* [Internet]. 15 sept 2017 [cité 13 d c 2019];9(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5622781/>

27. Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2010 [cité 16 d c 2019];(11). Disponible sur: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD003048.pub3/full/fr>
28. Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol*. d c 2004;4(12):953–64.
29. Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*. janv 2008;6(1):53–66.
30. Boumart Z, Velge P, Wiedemann A. Multiple invasion mechanisms and different intracellular Behaviors: a new vision of *Salmonella*–host cell interaction. *FEMS Microbiol Lett*. 1 d c 2014;361(1):1–7.
31. Moest TP, M resse S. *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Curr Opin Microbiol*. 1 f vr 2013;16(1):38–44.
32. Cirillo DM, Heffernan EJ, Wu L, Harwood J, Fierer J, Guiney DG. Identification of a domain in Rck, a product of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid, required for both serum resistance and cell invasion. *Infect Immun*. juin 1996;64(6):2019–23.
33. Abed N, Grépinet O, Canepa S, Hurtado-Escobar GA, Guichard N, Wiedemann A, et al. Direct regulation of the *pefI-srgC* operon encoding the Rck invasin by the quorum-sensing regulator SdiA in *Salmonella Typhimurium*. *Mol Microbiol*. 2014;94(2):254–71.
34. Wiedemann A, Mijouin L, Ayoub MA, Barilleau E, Canepa S, Teixeira-Gomes AP, et al. Identification of the epidermal growth factor receptor as the receptor for *Salmonella* Rck–dependent invasion. *FASEB J*. 8 sept 2016;30(12):4180–91.
35. Dyszel JL, Smith JN, Lucas DE, Soares JA, Swearingen MC, Vross MA, et al. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Can Detect Acyl Homoserine Lactone Production by *Yersinia enterocolitica* in Mice. *J Bacteriol*. janv 2010;192(1):29–37.
36. Heithoff DM, Conner CP, Hanna PC, Julio SM, Hentschel U, Mahan MJ. Bacterial infection as assessed by in vivo gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 f vr 1997;94(3):934–9.
37. Lambert MA, Smith SG. The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol*. 8 sept 2008;8:142.
38. Lambert MA, Smith SGJ. The PagN protein mediates invasion via interaction with proteoglycan. *FEMS Microbiol Lett*. 1 ao t 2009;297(2):209–16.
39. Folkesson A, Advani A, Sukupolvi S, Pfeifer JD, Normark S, L fdahl S. Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. *Mol Microbiol*. 1999;33(3):612–22.
40. Ellermeier JR, Slauch JM. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1

type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol*. 1 févr 2007;10(1):24–9.

41. Mambu J, Virlogeux-Payant I, Holbert S, Grépinet O, Velge P, Wiedemann A. An Updated View on the Rck Invasin of *Salmonella*: Still Much to Discover. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 8 déc 2017 [cité 16 déc 2019];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5727353/>
42. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. nov 1990;172(11):6557–67.
43. Shivak DJ, MacKenzie KD, Watson NL, Pasternak JA, Jones BD, Wang Y, et al. A Modular, Tn7-Based System for Making Bioluminescent or Fluorescent *Salmonella* and *Escherichia coli* Strains. *Appl Environ Microbiol*. 29 juill 2016;82(16):4931–43.
44. Howe K, Karsi A, Germon P, Wills RW, Lawrence ML, Bailey RH. Development of stable reporter system cloning luxCDABE genes into chromosome of *Salmonella enterica* serotypes using Tn7 transposon. *BMC Microbiol*. 23 juill 2010;10:197.
45. Koga K, Harada T, Shimizu H, Tanaka K. Bacterial luciferase activity and the intracellular redox pool in *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics*. 1 sept 2005;274(2):180–8.
46. Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, Crawford RW, et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*. 23 sept 2010;467(7314):426–9.
47. Spiga L, Winter MG, de Carvalho TF, Zhu W, Hughes ER, Gillis CC, et al. An oxidative central metabolism enables *Salmonella* to utilize microbiota-derived succinate. *Cell Host Microbe*. 13 sept 2017;22(3):291–301.e6.
48. Curtis MM, Hu Z, Klimko C, Narayanan S, Deberardinis R, Sperandio V. The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. *Cell Host Microbe*. 10 déc 2014;16(6):759–69.
49. Jacobson A, Lam L, Rajendram M, Tamburini F, Honeycutt J, Pham T, et al. A gut commensal-produced metabolite mediates colonization resistance to *Salmonella* infection. *Cell Host Microbe*. 8 août 2018;24(2):296–307.e7.
50. Bratburd JR, Keller C, Vivas E, Gemperline E, Li L, Rey FE, et al. Gut Microbial and Metabolic Responses to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Candida albicans*. *mBio* [Internet]. 6 nov 2018 [cité 3 févr 2020];9(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6222126/>
51. Rivera-Chávez F, Zhang LF, Faber F, Lopez CA, Byndloss MX, Olsan EE, et al. Depletion of butyrate-producing *Clostridia* from the gut microbiota drives an aerobic luminal expansion of *Salmonella*. *Cell Host Microbe*. 13 avr 2016;19(4):443–54.
52. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J Gastroenterol WJG*. 14 mai 2010;16(18):2202–22.

53. Pontier-Bres R, Munro P, Boyer L, Anty R, Imbert V, Terciolo C, et al. *Saccharomyces boulardii* Modifies *Salmonella* Typhimurium Traffic and Host Immune Responses along the Intestinal Tract. *PLoS ONE* [Internet]. 13 août 2014 [cité 10 févr 2020];9(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4145484/>
54. Deriu E, Liu JZ, Pezeshki M, Edwards RA, Ochoa RJ, Contreras H, et al. Probiotic Bacteria Reduce *Salmonella* Typhimurium Intestinal Colonization by Competing for Iron. *Cell Host Microbe*. 17 juill 2013;14(1):26–37.
55. Azriel S, Goren A, Rahav G, Gal-Mor O. The Stringent Response Regulator DksA Is Required for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Growth in Minimal Medium, Motility, Biofilm Formation, and Intestinal Colonization. *Infect Immun*. 28 déc 2015;84(1):375–84.
56. Aviv G, Elpers L, Mikhlin S, Cohen H, Vitman Zilber S, Grassl GA, et al. The plasmid-encoded Ipf and Klf fimbriae display different expression and varying roles in the virulence of *Salmonella enterica* serovar Infantis in mouse vs. avian hosts. *PLoS Pathog* [Internet]. 17 août 2017 [cité 10 févr 2020];13(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5560535/>
57. Yang Y, Wan C, Xu H, Aguilar ZP, Tan Q, Xu F, et al. Identification of an outer membrane protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a potential vaccine candidate for Salmonellosis in mice. *Microbes Infect*. 1 mai 2013;15(5):388–98.

**ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT**

Je, soussigné (e) Morillon Marie

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'a



Signature :



**SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN**

N° Étudiant : 21202752

N° Thèse : 61

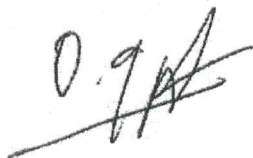
Nom et Prénom : MORILLON MARIE

Sujet : Influence des conditions environnementales retrouvées  
au sein du microbiote et des paramètres physiologiques  
de l'hôte sur l'expression des facteurs d'entrée de *Shigella Typhimurium*

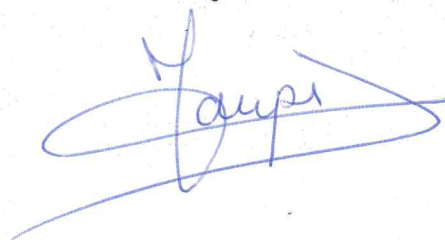
Tours, le : 01/10/2020

Le(s) Directeur(s) de Thèse :

Olivier GREPINET



Vu et Transmis :  
Le Doyen



Marie Morillon

N° 41

## TITRE DE LA THÈSE

**Influence des conditions environnementales retrouvées au sein du microbiote et des paramètres physiologiques de l'hôte sur l'expression des facteurs d'entrée de *Salmonella* Typhimurium**

## RÉSUMÉ DE LA THÈSE

La salmonellose est l'une des maladies d'origine alimentaire la plus répandue dans le monde. *Salmonella* Typhimurium est un des sérotypes les plus incriminés dans cette pathologie responsable de gastro-entérites aiguës sans aggravation mais pouvant devenir mortelles chez les sujets les plus fragiles. Dans le but de coloniser son hôte, l'entérobactérie doit pénétrer dans la muqueuse intestinale en utilisant des cellules phagocytaires ou en déclenchant sa propre internalisation à l'aide des 3 facteurs d'entrée actuellement identifiés : le système de sécrétion de type 3 n°1 (T3SS-1) et deux invasines, Rck et PagN. Face à l'impact de cet agent pathogène, nous avons cherché à mieux comprendre son mécanisme d'action *in vivo*, et plus particulièrement la cinétique d'expression de ces 3 facteurs d'entrée dans un modèle murin d'infection systémique létale, en utilisant l'imagerie par bioluminescence pour visualiser l'activité transcriptionnelle des fusions construites à cet effet. Ainsi, nous avons mis en évidence une cinétique d'expression précoce du T3SS-1 et la transcription du gène *pagN* au sein de 2 organes : le caecum et les ganglions mésentériques. Les conditions d'expression de ces facteurs d'entrée *in vitro* ont également été étudiées en utilisant des molécules rencontrées par la bactérie dans le tractus intestinal au cours de l'infection. Parmi les métabolites testés, le thiosulfate et le succinate semblent potentialiser l'activation du facteur d'entrée le plus connu dans la littérature, le T3SS-1, et donc favoriser la colonisation de l'hôte par *S. Typhimurium*. A l'heure actuelle, seuls les traitements symptomatiques sont utilisés chez les patients atteints de gastro-entérite aiguë d'origine infectieuse. Une nouvelle classe de médicaments sont néanmoins de plus en plus prescrits et utilisés : les probiotiques. Ces derniers peuvent être pris aussi bien dans un but prophylactique que thérapeutique. Des travaux indiquent que certains de ces potentiels probiotiques semblent réduire les symptômes et soulager les patients. Cependant, beaucoup d'études semblent remettre en cause leur efficacité et très peu justifient leur bénéfice en terme de santé.

*Salmonella* Typhimurium ; microbiote intestinale ; manipulation *in vivo* ; facteurs de virulence ; probiotiques

## JURY

Président : **DIMIER-POISSON Isabelle Professeur des Universités Faculté de pharmacie- Tours**

Membres :

**GREPINET Olivier Ingénieur INRA- Nouzilly**

**BRIANT Stéphanie Pharmacienne d'officine- Tours**

**BAUDOUIN Maxime Pharmacien d'officine- Tours**

Le 24 septembre 2020 à l'université de Tours