

Séquençage du génome complet – WGS (Whole Genome Sequencing)

L'obtention de la totalité de l'information génomique d'un isolat fournit théoriquement une méthode de typage offrant la meilleure résolution (Ruppitsch, 2016). Avec le développement des technologies de séquençage haut débit dans les années 2000, il devient de plus en plus abordable et rapide de recourir au séquençage du génome complet pour le typage des souches de *Salmonella* (Ruppitsch, 2016). L'emploi du WGS comme méthode de routine pour l'analyse des souches isolées permet une augmentation constante du nombre de génomes de *Salmonella* disponibles dans les bases des données en libre accès. Disposer d'un grand nombre de génomes permet une meilleure utilisation des données issues du séquençage pour la source-attribution (Dunn, 2016). Les méthodes d'analyse génomique basées sur le WGS ont été rendues possible par le développement des techniques de séquençage à haut débit dites « short reads » de 3^{ème} génération telles que celles proposées par la technologie Illumina. La **figure 10** détaille le fonctionnement de cette technologie.

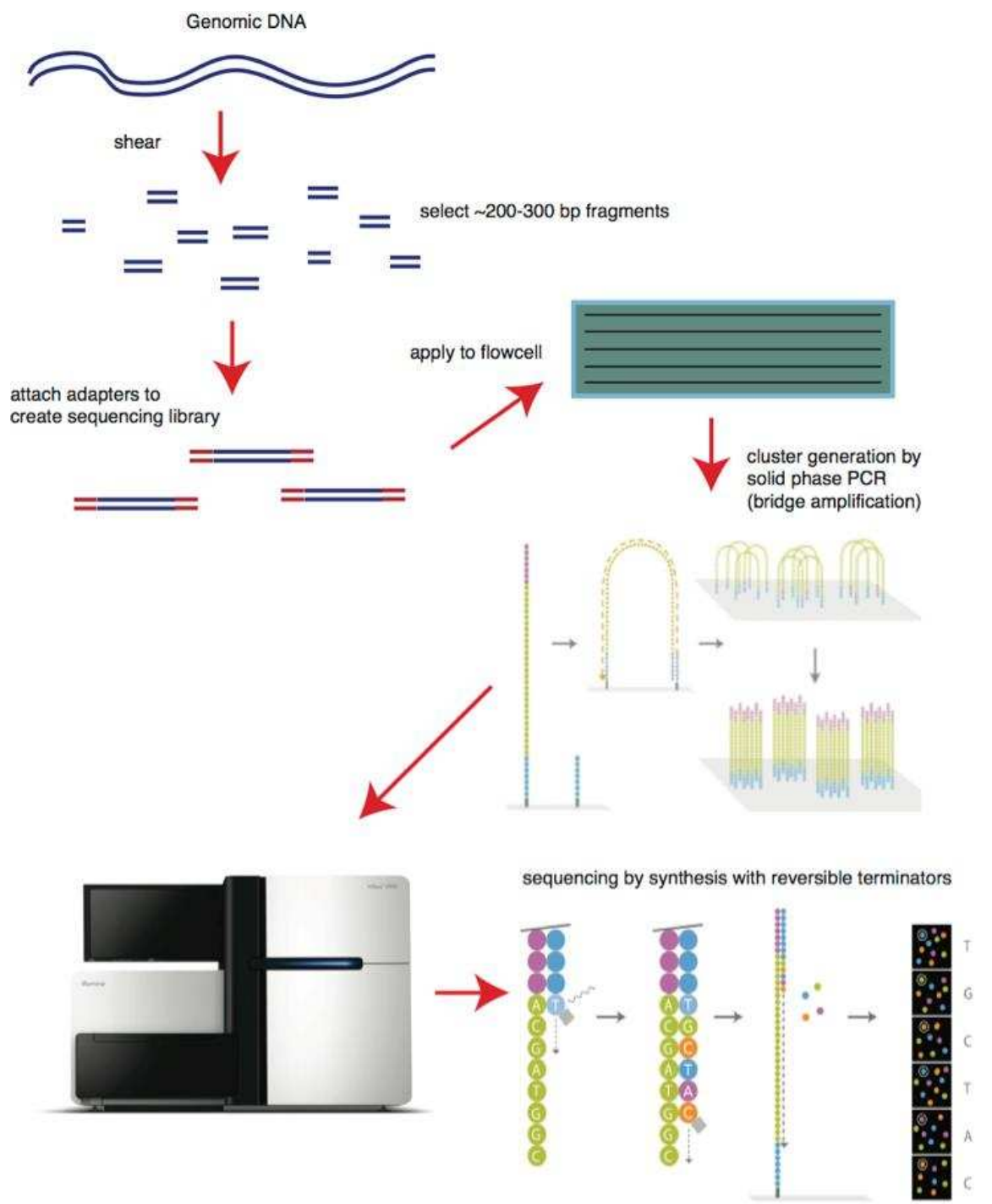


Figure 10 : Principe du séquençage Illumina (Brown, 2016).

L'ADN génomique est découpé en fragments courts sur lesquels des adaptateurs sont fixés afin d'être amplifiés par PCR et créer une librairie de séquences. Les séquences de chaque librairie sont ensuite fixées via d'autres adaptateurs sur une phase solide puis séquencées à l'aide de bases marquées émettant des signaux lors de leur incorporation à l'ADN.

Une fois les séquences génomiques obtenues, de nombreux types d'analyses sont envisageables. L'étude de la diversité génétique d'une collection de souches repose le plus souvent sur des techniques de *variant calling* qui consistent à détecter le polymorphisme mono-nucléotidique ou *single nucleotide polymorphism* (SNP) entre les différentes souches

analysées (Timme et al., 2013). La recherche des variants (*variant calling*) permet d'étudier les relations entre des souches éloignées et proches génétiquement et a été utilisée avec succès dans l'investigation des TIAC (Timme et al., 2013; Allard et al., 2016; Dunn, 2016; Ruppitsch, 2016). Le séquençage de l'ADN génomique donne également accès à des informations telles que le profil MLST d'une souche, son résistome (ensemble des gènes de résistance d'une souche donnée), mobilome (l'ensemble des éléments mobiles tel que les plasmides ou les transposons d'un génome) ou encore le profil de facteurs de virulence (Taboada et al., 2017).

Différents outils permettent la prédiction d'informations d'intérêt tel que le profil MLST d'une souche, le sérotype d'une souche à partir de son génome (application SISTR/SeqSero) (Yoshida et al., 2016), la prédiction de la présence de gènes de résistance à certaines classes d'antibiotiques (Zankari et al., 2012) mais également une annotation fonctionnelle rapide et la prédiction de caractéristiques phénotypiques (Page et al., 2015) et des études d'association basées sur le génome complet (*Genome Wide Association Study* ou GWAS) (Brynildsrud et al., 2016).

De nombreux laboratoires de référence ont entamé la transition du sérotypage traditionnel de *Salmonella* vers : un sérotypage basé sur les données WGS en routine, c'est le cas notamment de l'Institut Pasteur en France et de *Public Health England* (Ashton et al., 2016).

En Europe, 18 pays utilisent le WGS pour l'investigation de TIAC et l'ECDC encourage la transition vers une surveillance basée sur le WGS dans l'espoir de garantir une meilleure couverture des souches collectées qui dépassent actuellement la capacité européenne de typage par PFGE ou MLVA (ECDC, 2016).

Toutefois le séquençage du génome complet possède quelques inconvénients : cette approche impose des dépenses nouvelles pour assurer le séquençage et demande une expertise en bio-informatique dans les laboratoires de référence. De même, une puissance de calcul importante doit être dédiée à l'analyse de jeux de données et au stockage des données issues du séquençage. Il est également nécessaire de standardiser les méthodes de traitement des données et d'analyse de la diversité génétique afin de pouvoir la comparer aux méthodes traditionnelles (Ellington et al., 2017; Ferrari et al., 2017). Le groupe de travail 25 (ISO/TC 34/SC 9/WG 25) de l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO) travaille actuellement sur une norme sur la génération de données WGS et sur les techniques d'analyses à appliquer sur ces données.

1.4 Les facteurs moléculaires permettant l'infection entérique et systémique par *Salmonella*

Après l'ingestion, la virulence d'une souche de *Salmonella* varie beaucoup d'un sérovar à l'autre. Toutes les salmonelles doivent cependant surmonter les mêmes obstacles : elles doivent traverser l'estomac et trouver le moyen de persister dans le milieu hautement compétitif de l'intestin pour traverser l'épithélium intestinal et infecter l'hôte.

La virulence d'une souche de *Salmonella* dépend de nombreux facteurs. Elle est déterminée par sa capacité à adhérer aux cellules, à les envahir, à survivre et à se multiplier à l'intérieur des cellules épithéliales et des macrophages. Pour le succès de ces trois étapes clés (adhésion, invasion, multiplication intracellulaire) de nombreux gènes vont intervenir. Une grande partie de ces gènes de virulence est regroupée dans des régions génomiques spécifiques, acquises par transfert horizontal, appelées « Ilots de pathogénicité de *Salmonella* » (SPI) (Marcus et al., 2000; de Jong et al., 2012; Hurley et al., 2014). L'ensemble de ces gènes de virulence va permettre la colonisation de l'hôte et l'invasion systémique de *Salmonella*.

1.4.1 Colonisation de la lumière intestinale

La colonisation de la lumière intestinale est un défi pour un éventuel agent pathogène. En effet, la flore commensale de l'intestin limite l'apport en nutriments pour un envahisseur potentiel et assure une résistance face à cette première étape d'infection (Ilyas et al., 2017). Il a pourtant été démontré que la majorité de la charge bactérienne des souches non-systémiques de *Salmonella* se retrouvent à ce niveau. Seule une faible proportion des bactéries va être impliquée dans l'invasion de l'épithélium (Winter et al., 2010; Winter and Baumler, 2011).

Pour y parvenir, *Salmonella* va provoquer une réaction inflammatoire chez son hôte ce qui va lui procurer un avantage sélectif (Winter et al., 2010). L'activation de la réaction inflammatoire va provoquer un rapide influx de neutrophiles et un stress oxydatif et nitrosatif avec la formation d'oxyde nitrique que *Salmonella* sera plus à même d'exploiter que la plupart des microorganismes de la flore intestinale. *Salmonella* est en effet capable de métaboliser les nitrates et le tétrathionate comme source d'énergie alternative, ce qui lui donne un avantage métabolique (Winter et al., 2010; Ilyas et al., 2017). La **figure 11** illustre les mécanismes mis en œuvre lors de cette étape.

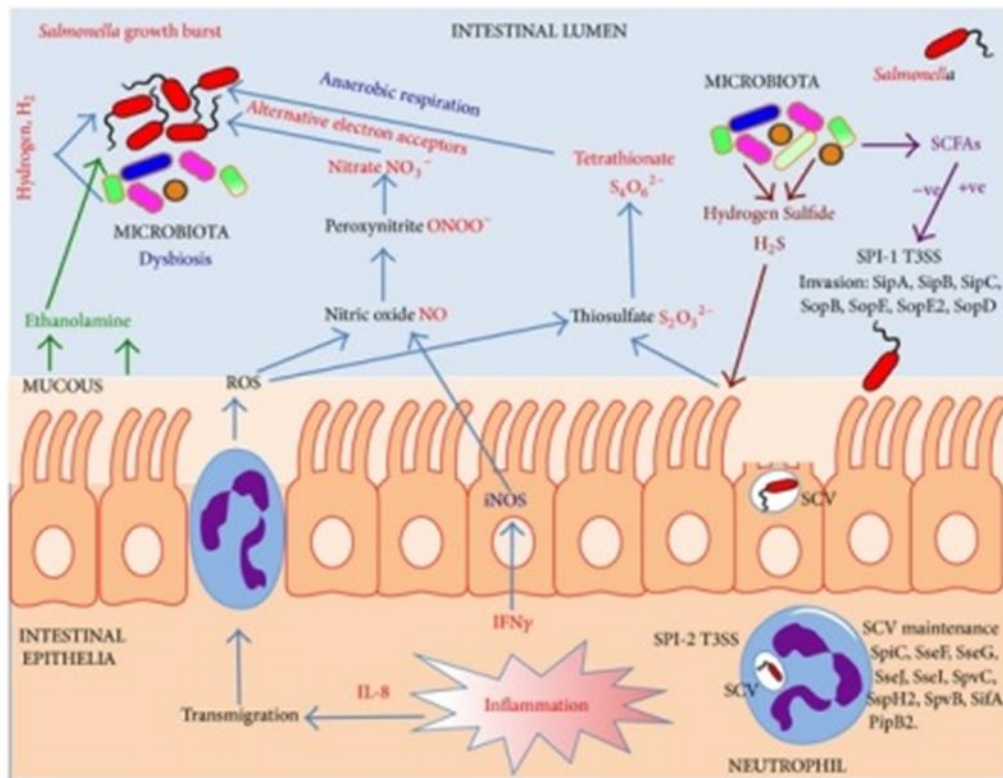


Figure 11 : Stratégies employées par *Salmonella* pour entrer en compétition avec le microbiote intestinal (Khan, 2014).

Salmonella utilise différentes stratégies pour entrer en compétition avec la flore intestinale. Aux premiers stades, elle est capable d'utiliser l'hydrogène comme source d'énergie. Le contact avec le microbiote va activer l'expression du SPI-1 et 2. L'utilisation des SPI-1 et 2 va permettre à la bactérie d'envahir et de survivre dans les cellules épithéliales mais également de déclencher une réaction inflammatoire bénéfique pour le pathogène. Une réponse inflammatoire entraîne la production d'oxygène hautement réactif qui provoque la production de nitrates et de tétrathionates; des composés que *Salmonella* va pouvoir exploiter pour accélérer sa croissance au détriment du microbiote.

Une réaction inflammatoire à *Salmonella* est induite par la reconnaissance de molécules de surface (l'antigène O et les flagellines) par le système immunitaire de l'hôte. Certains effecteurs du système de sécrétion de type 3 (T3SS) codé par le SPI-1 (T3SS-1 qui sera détaillé dans la partie 1.4.3.1.) *sipA*, *sopA*, *sopB*, *sopD* et *sopE* jouent également un rôle dans la promotion de réactions inflammatoires de l'épithélium (Zhang et al., 2003).

La protéine SipA agit sur la sécrétion apicale d'hepoxiline A3, un promoteur de la transmigration des neutrophiles à travers la barrière épithéliale. L'effecteur SopA, agit comme une ligase ubiquitine-HECT3 (Zhang et al., 2006) qui induit la migration des neutrophiles polynucléaires. Les protéines SopB et SopE agissent en activant les GTPase Cdc42 et Rac1, ce qui provoque l'induction des régulateurs AP-1 et NF- κ B : des régulateurs clés de l'inflammation par la sécrétion d'IL-8. Ces régulateurs provoquent donc également la migration des neutrophiles polynucléaires vers la lumière intestinale (Haraga et al., 2008; Srikanth et al., 2011).

Salmonella fait partie des agents pathogènes altérant la structure de l'épithélium en provoquant une perte d'étanchéité au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales (Ramos-Morales, 2012). Comme illustré dans la **figure 12**, les effecteurs SipA, SopB, SopE et SopE2 jouent un rôle important dans la désorganisation des jonctions entre cellules épithéliales et favorisent la migration des neutrophiles polynucléaires (PMN) vers la lumière intestinale. Cette perte d'étanchéité provoque un afflux de liquide du sang directement vers l'intestin, un des symptômes rencontrés lors d'une gastroentérite à *Salmonella* (Zhang et al., 2003; Gordon, 2008).

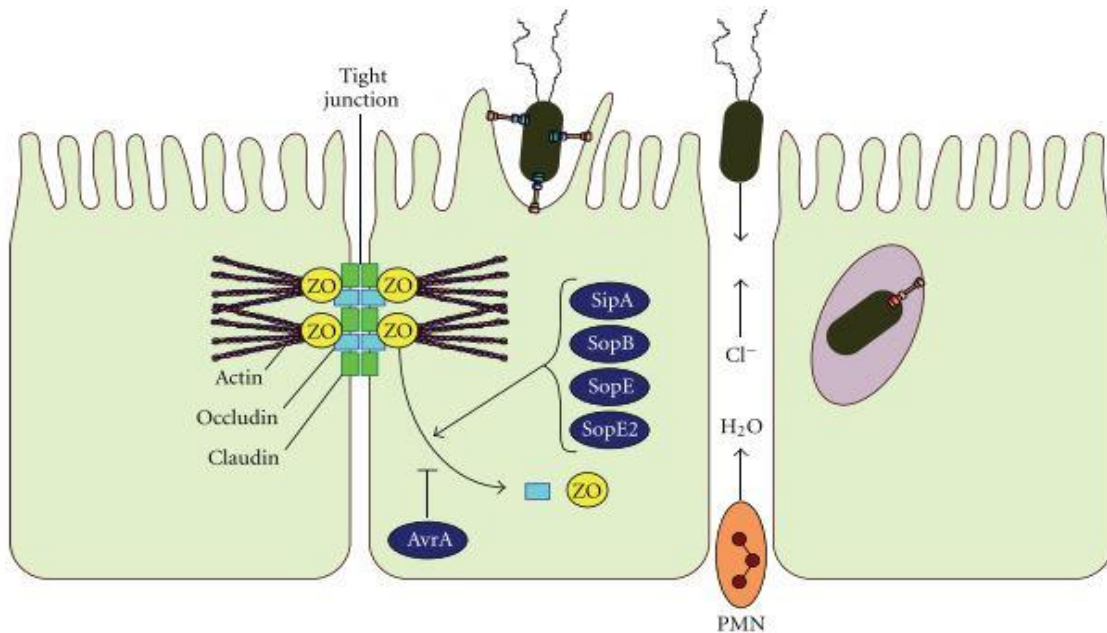


Figure 12 : Principaux effecteurs du T3SS-1 de *Salmonella* impliqués dans l'induction de l'inflammation chez l'hôte (Ramos-Morales, 2012).

Outre leur rôle de promoteur de l'inflammation les effecteurs SipA, SopB, SopE et SopE2 du T3SS-1 provoquent le relâchement des jonctions entre les cellules épithéliales résultant en des symptômes de diarrhée et favorisant une réponse immunitaire inflammatoire.

Les cellules épithéliales et les cellules immunitaires, présentes dans l'intestin, sécrètent un grand nombre de peptides antimicrobiens qui vont déranger l'intégrité de la membrane bactérienne. *Salmonella* dispose d'un arsenal de gènes lui permettant de modifier la structure de sa membrane pour se protéger de l'action de ces peptides. Cet arsenal de défense est régulé par les systèmes de régulation à deux composants PhoPQ et PmrAB représentés sur la **figure 13** (Gunn, 2008). Ces couples de régulateurs jouent un rôle important dans l'activation du T3SS-2 et la réorganisation de la membrane extérieure de la bactérie. Ces régulateurs sont également responsables de l'activation du T3SS-2 après l'invasion des cellules de l'hôte (Gunn, 2008; Dalebroux and Miller, 2014; Ilyas et al., 2017).

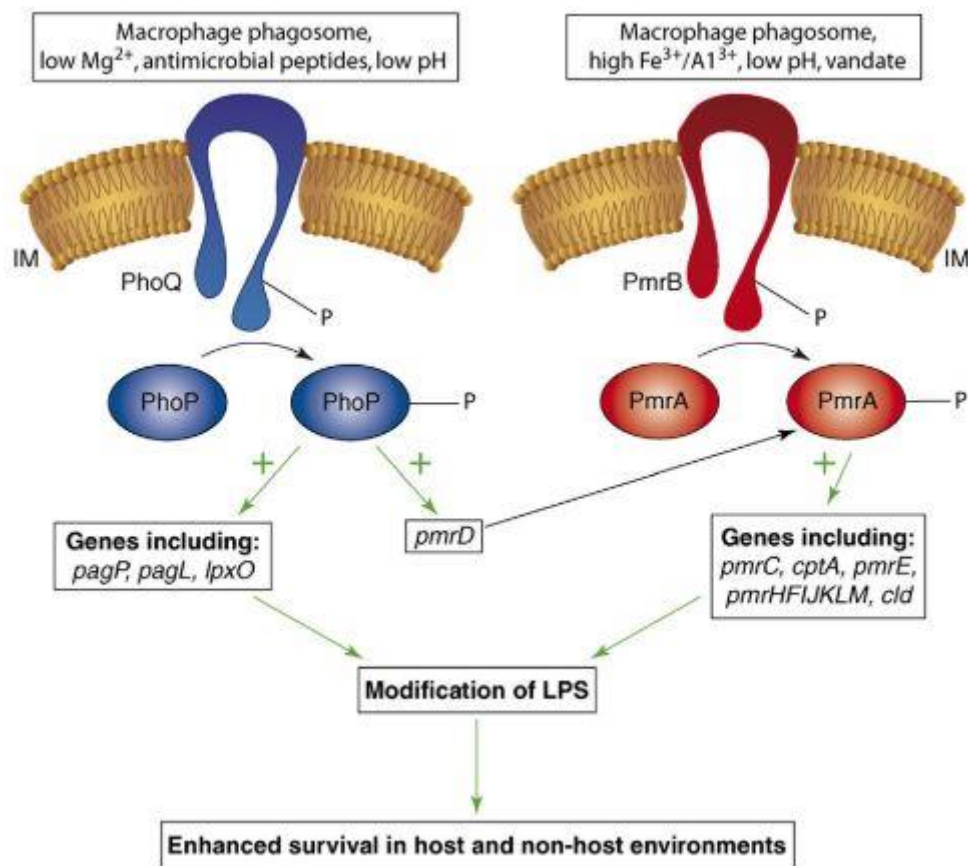


Figure 13 : Activation et interaction des systèmes de régulation à deux composants PhoQ et PmrAB (Gunn, 2008).

La présence d'un pH acide, de peptides antimicrobiens cationiques et d'un environnement à faible teneur en ion Mg^{2+} stimule l'activité de kinase de PhoQ et provoque la phosphorylation de PhoP. Une fois PhoP phosphorylé, il se fixe au promoteur de nombreux gènes de virulences. PmrAB peut être activé par des facteurs extérieurs et/ou par la phosphorylation de PhoP. Les deux couples de régulateurs provoquent la réorganisation de la membrane extérieure de la bactérie en réduisant notamment la longueur des chaînes de polysaccharides de l'antigène O, cela permet à la bactérie de se protéger des peptides antimicrobiens et de rendre sa détection plus difficile pour le système immunitaire de l'hôte.

L'intestin est également le siège d'une lutte entre micro-organismes. La plupart des bactéries à coloration de gram négative, dont *Salmonella*, disposent d'un système de sécrétion de type 6 (T6SS), capable d'injecter des effecteurs ou des toxines dans d'autres bactéries ou des cellules eucaryotes (Sana et al., 2016; Ilyas et al., 2017). La structure du T6SS est détaillée sur la **figure 14**. Le T6SS ressemble à une queue de phage intégrée à la membrane bactérienne par un complexe membranaire. Une structure semblable à un fourreau s'y ancre et propulse un tube intérieur terminé par un poinçon protéique à travers la membrane de la cellule cible. L'extrémité du poinçon se désassemble alors, libérant des effecteurs dans la cellule cible (Cianfanelli et al., 2016; Gallique et al., 2017). *Salmonella* utilise son système de sécrétion de type 6 portée par le SPI-6 comme instrument de lutte contre les autres bactéries.

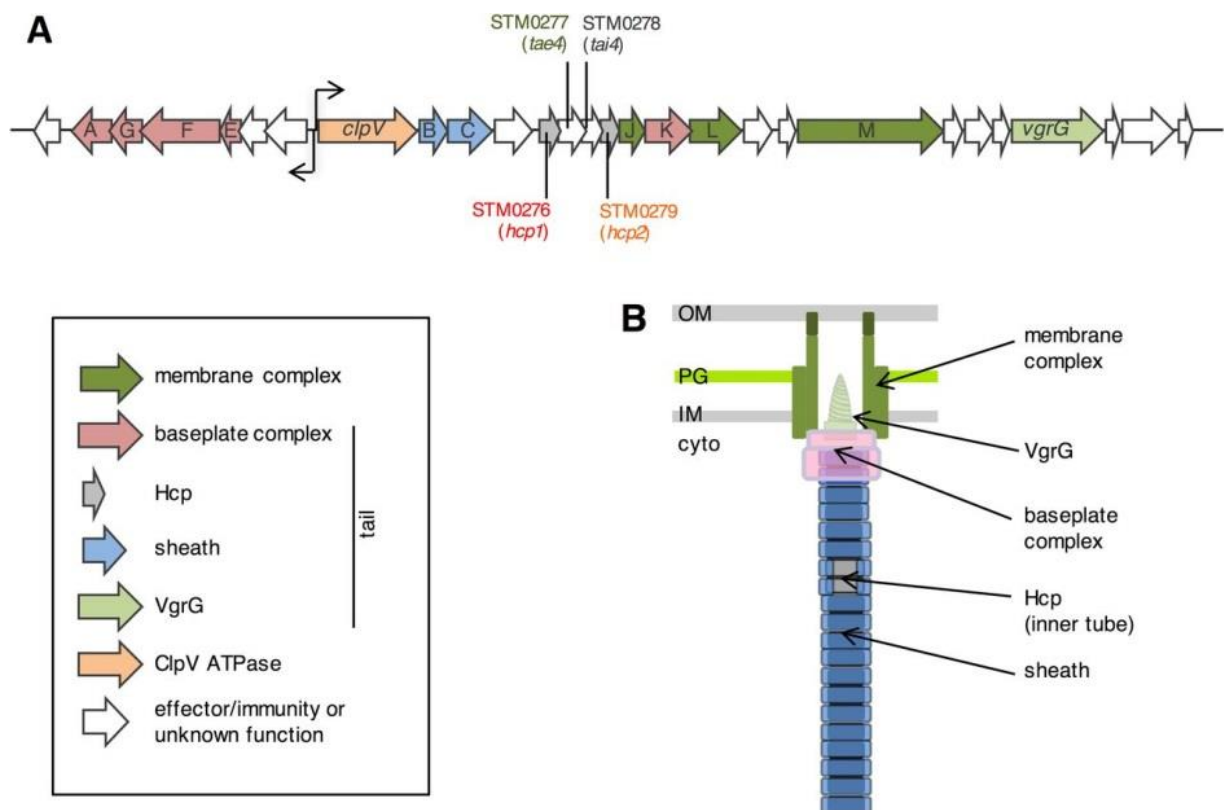


Figure 14 : Représentation du T6SS encodé par le SPI-6 (Sana et al., 2016).

(A) Locus codant pour le système de sécrétion (situé entre STM0266 et STM0292 chez *S. Typhimurium* LT2) ; (B) représentation schématique du T6SS, en bleu les composants du fourreau (TssB/TssC) ; en orange l'ATPase ClpV ; en vert clair la protéine poinçon ClpV ; en vert foncé le complexe membranaire ; les protéines Hcp en gris. Les protéines Hcp servent de promoteur à l'excrétion des effecteurs tels que la toxine antibactérienne *Tae4*.

1.4.2 Adhésion cellulaire

L'adhésion aux cellules de l'hôte est un processus crucial pour la pathogénicité de la bactérie. *Salmonella* est connue pour être capable de déployer jusqu'à 13 adhésines fimbriales et 7 adhésines non fimbriales selon les sérovars (**figure 15**) (Wagner and Hensel, 2011; Hansmeier et al., 2017).

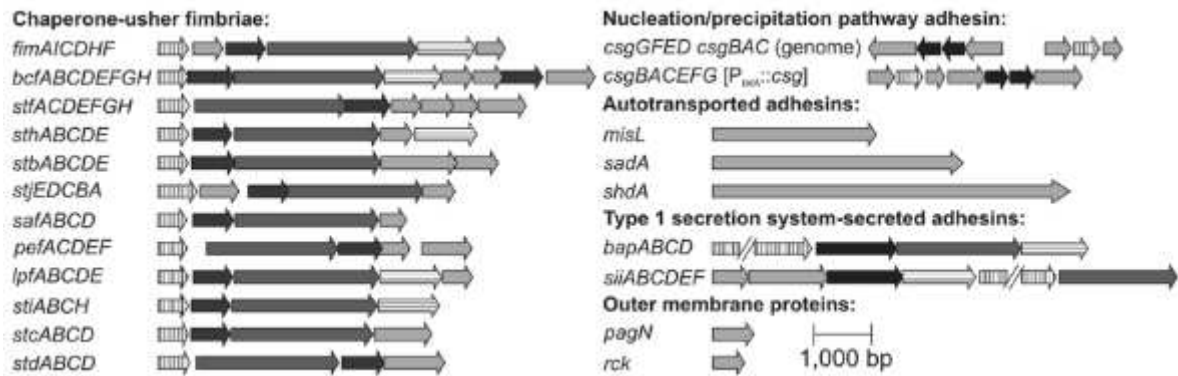


Figure 15 : Organisation génétique des opérons et des gènes susceptibles d'encoder pour des adhésines chez *S. Typhimurium* (Hansmeier et al., 2017).

1.4.2.1 Fimbriae

Les fimbriae sont des structures retrouvées à la surface des bactéries qui prennent la forme de filaments de 2-8 nm de large pour 1 à 10 µm de longs composés d'un assemblage de protéines appelées pilines qui sont organisées sous forme hélicoïdales.

Les fimbriae permettent l'adhésion aux cellules hôtes par reconnaissance d'un récepteur cellulaire, elles interviennent également dans la formation de biofilm et sur l'agrégation bactérienne (Blumer et al., 2005). Les fimbriae les plus fréquemment rencontrées correspondent aux fimbriae de type 1, les fimbriae polaires longues, et les fimbriae agrégatives minces (Wagner and Hensel, 2011).

- Fimbriae de type I: Les fimbriae de type I font partie des fimbriae les plus communément rencontrées, elles sont codées par les gènes *fim* (*fimACDHF*). La **figure 16** détaille la structure de ces fimbriae. La base du *pilus* est constituée d'un assemblage de protéine structurelle FimA. Elle est terminée par l'adhésine FimH qui se fixe spécifiquement au α-D-mannose porté par les cellules eucaryotes (Grzymajlo et al., 2013) facilitant ainsi l'adhésion des bactéries à la cellule hôte. La structure de la protéine FimH est suspectée de jouer un rôle important dans la spécificité à l'hôte des différents sérovars de *Salmonella* (voir la partie 1.5.2) (Grzymajlo et al., 2013; Yue et al., 2015; Grzymajlo et al., 2017)

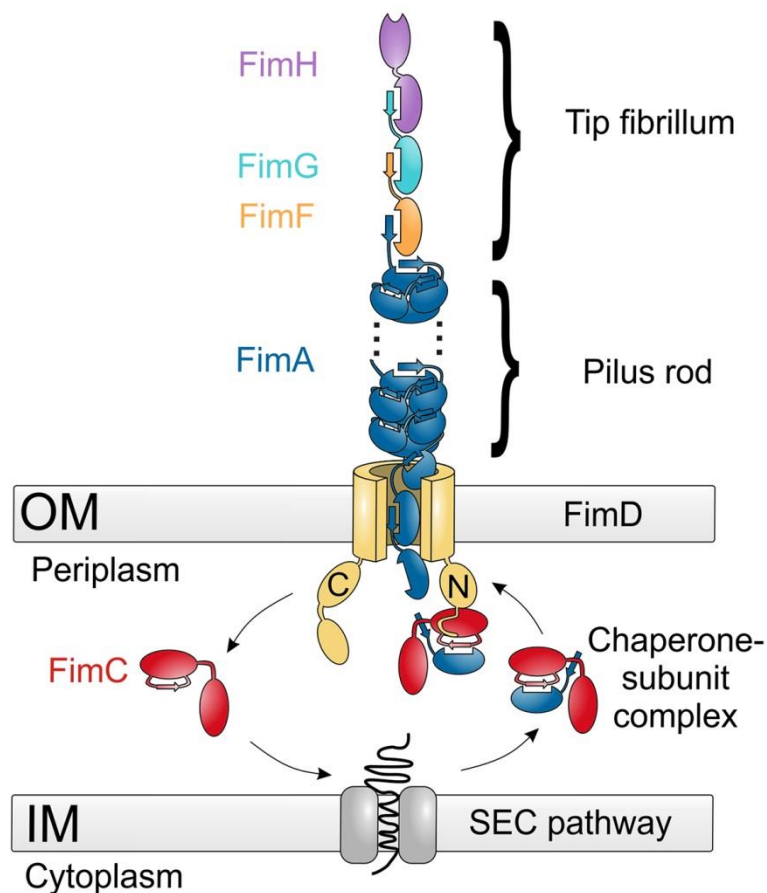


Figure 16 : Structure des fimbriae de type 1 (anonymous, 2018).

- Fimbriae polaires longues : codées par les gènes *lpfABCDE*, leur expression dépend des mécanismes de variation de phase qui permettent à *Salmonella* d'échapper au système immunitaire (Kingsley et al., 2002b). Elles sont impliquées dans la colonisation spécifique de la muqueuse intestinale via des follicules lymphoïdes présents dans le tube digestif : les plaques de Peyer. Les fimbriae polaires longues ont une spécificité pour les cellules de type M qui séparent les follicules lymphoïdes de la lumière intestinale (Bäumler et al., 1996). L'absence de l'opéron *lpf* conduit à une diminution significative de la colonisation à long terme de l'intestin des souris par *S. Typhimurium* (Weening et al., 2005). Ces fimbriae jouent également un rôle dans les premières étapes de la formation de biofilm à la surface des cellules épithéliales de l'hôte (Laniewski et al., 2017).
- Les fimbriae agrégatives minces : codées par les gènes *agfABCDEFGF* ces fimbriae sont les promotrices de l'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine. Elles jouent également un rôle important dans la formation de biofilm (Laniewski et al., 2017).

Le rôle des autres complexes de formation des adhésines fimbriales détaillés sur la **figure 15** est encore mal élucidé. Ces fimbriae ne sont pas aussi fréquents que celles décrites

précédemment (Laniewski et al., 2017). Cependant, le rôle de certaines de ces fimbriae dans la colonisation à long terme de l'hôte a été démontré (Weening et al., 2005).

Ces différents fimbriae jouent vraisemblablement un rôle important dans la spécificité à l'hôte des différents sérovars de *Salmonella*. Ainsi les sérovars les plus « généralistes » disposent souvent d'un plus grand nombre d'opérons fimbriaux leur donnant la faculté à persister chez une gamme plus importante d'hôtes (Weening et al., 2005) et permettent l'adhésion de *Salmonella* à différents organes ou tissus en cas de bactériémie (Laniewski et al., 2017).

1.4.2.2 Facteurs d'adhésion non fimbriale

- Adhésine non fimbriale géante SiiE : les gènes *siiCDF* portés par le SPI-4 codent pour un système de sécrétion de type I (T1SS) régulé par le complexe SiiA/B (Wille et al., 2014) permettant l'excrétion de l'adhésine non fimbriale SiiE (Sabbagh et al., 2010). L'adhésine SiiE est la protéine la plus grande du protéome de *Salmonella* avec une taille de 595 KDa (Barlag and Hensel, 2015). Elle est constituée de nombreuses répétitions semblables aux sous unités constituant la structure des fimbriae (Gerlach et al., 2007). SiiE est nécessaire pour une adhésion efficace aux microvillosités des cellules épithéliales qui permet ensuite l'invasion des cellules de l'hôte provoquée par le T3SS du SPI-1 (Gerlach et al., 2007; Wille et al., 2014).
- Adhésine MisL : portée par le SPI-3 l'adhésine MisL est une protéine dotée de deux domaines : un domaine auto-transporteur qui se fixe dans la membrane cellulaire de la bactérie pour permettre au « domaine passager » de la protéine de se propulser à l'extérieur de la membrane où il pourra interagir avec l'environnement (Dorsey et al., 2005). Cette adhésine permet une fixation sélective de la *Salmonella* au collagène de type 4 et à la fibronectine présente à la surface des cellules hôtes. La protéine MisL joue un rôle significatif dans la virulence de *Salmonella* en favorisant l'invasion des cellules épithéliales humaines (Dorsey et al., 2005).
- ShdA : le gène *shdA* codant pour l'adhésine ShdA correspond à une protéine dotée d'un domaine auto-transporteur. Ce gène est porté sur le CS54, un îlot génomique de *Salmonella* qui distingue *S. enterica subsp. enterica* des autres groupes de salmonelles (Kingsley et al., 2002a). Cette adhésine est un facteur déterminant dans la persistance de *S. Typhimurium* dans le caecum murin. Elle se fixe spécifiquement au site de liaison des fibronectines à l'héparine (Kingsley et al., 2004). Le SPI-9, présent chez *S. enterica* et *S. bongori*, code pour un opéron similaire à un T1SS dont l'effecteur partage une structure similaire à ShdA et qui contribue à l'adhésion de *S. Typhi* (Velasquez et al., 2016).

1.4.3 Invasion cellulaire

Salmonella dispose de deux mécanismes permettant son entrée dans les cellules épithéliales et les macrophages de l'hôte :

- Le mécanisme *trigger* médié par le T3SS-1 du SPI-1 ;
- le mécanisme *zipper* via la protéine de surface membranaire Rck.

1.4.3.1 Rôle du SPI-1

Le SPI-1 est un îlot génomique de 40 Kb contenant 29 gènes codant pour un système de sécrétion de type 3 : le T3SS-1, pour ses gènes de régulation et pour certains de ses effecteurs (Marcus et al., 2000). La structure du SPI-1 sont résumés dans la **figure 17**.

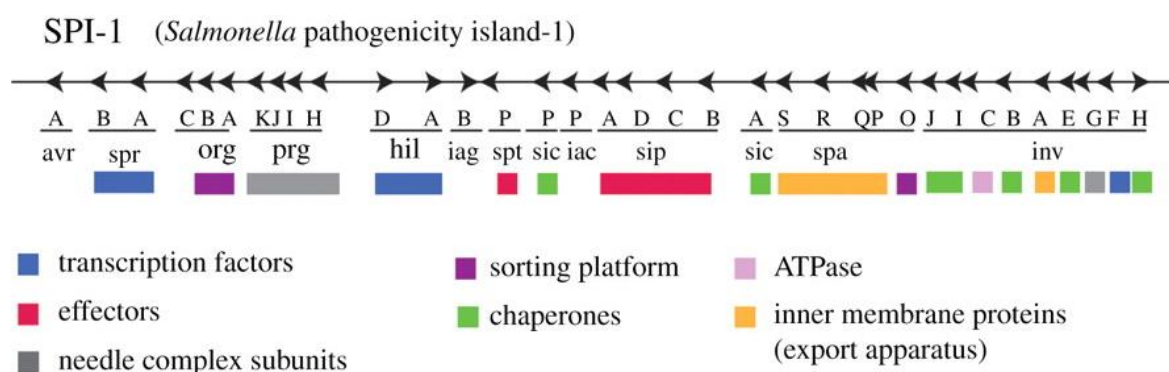


Figure 17. Détail des gènes portés par le SPI-1 et de leurs fonctions (Kosarewicz et al., 2012).

Le T3SS-1 correspond à un mécanisme de seringue moléculaire (**figure 18**) qui traverse l'enveloppe bactérienne pour entrer en contact avec la membrane cellulaire de l'hôte. Il s'agit d'un complexe d'approximativement 25 protéines organisées en deux sous-unités principales : une base s'ancrant dans la membrane bactérienne et un filament semblable à une seringue, qui permet l'injection d'effecteurs protéiques directement dans la cellule hôte (Costa et al., 2015; Deng et al., 2017a). L'injection des effecteurs dépend de l'interaction avec le translocon (SipB) et le cholestérol de la membrane des cellules eucaryotes. Les effecteurs sont ensuite excrétés de manière sélective à travers la seringue jusque dans le cytoplasme de la cellule eucaryote (Costa et al., 2015; Hume et al., 2017).

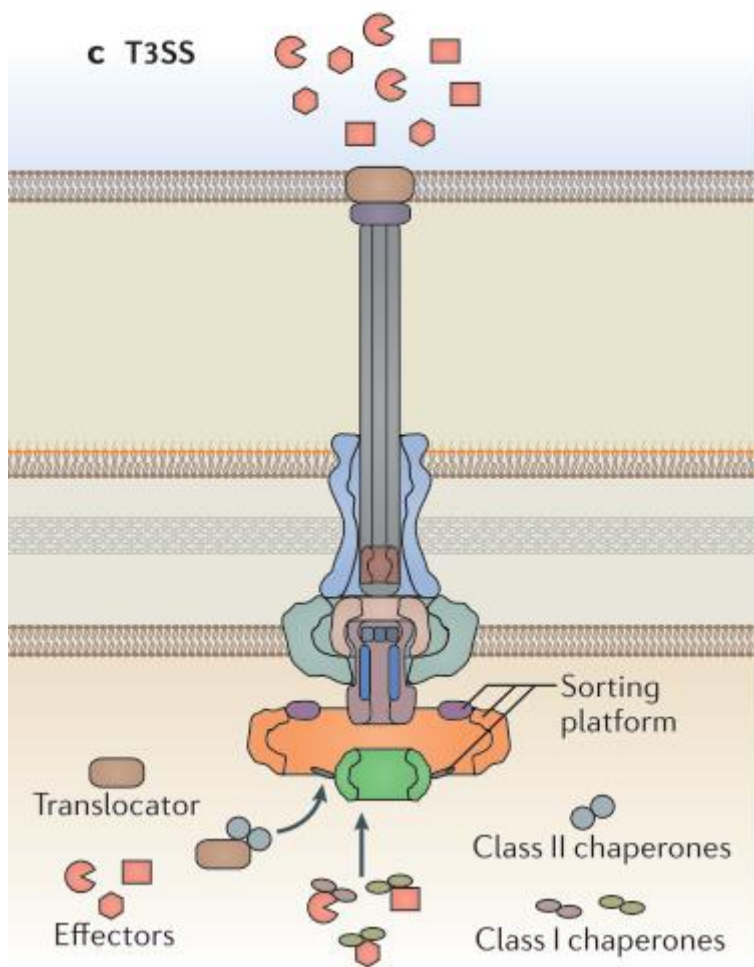


Figure 18. Structure et mécanisme d'action du T3SS-1 (Costa et al., 2015).

Le domaine cytoplasmique inclut l'ATPase InvC et une plateforme de tri constituée des protéines SpaO, OrgA et OrgB. InvG s'étend entre les membranes bactériennes et soutient la base du complexe (PrgK, PrgH, SpaP, SpaQ, SpaR, SpaS et InvA) qui soutient la seringue (PrgI). Le translocateur InvB permet la formation de pores dans la membrane cellulaire de l'hôte pour y injecter des effecteurs.

Une fois dans le cytoplasme d'une cellule eucaryote, les effecteurs interagissent avec différents composants de la cellule-hôte. Ces effecteurs sont strictement régulés et provoquent des effets divers sur la cellule hôte (**figure 19**).

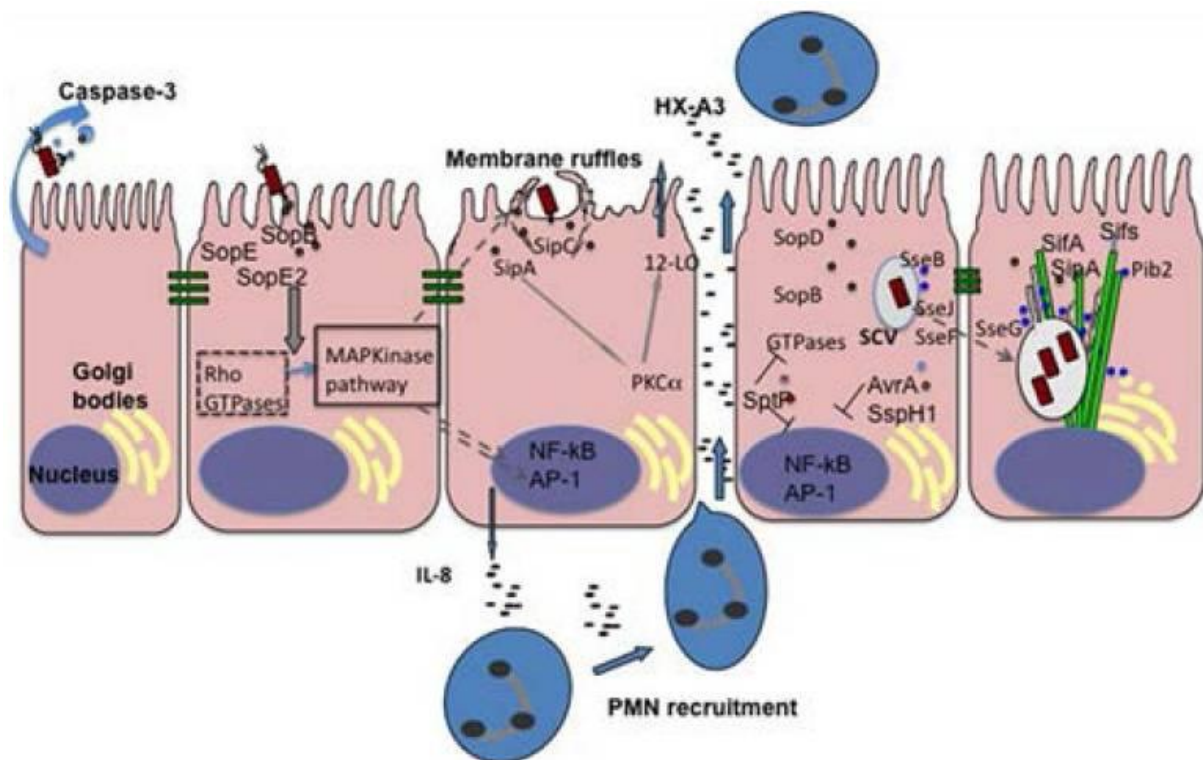


Figure 19 : Mécanisme d'invasion cellulaire provoqué par le SPI-1 (Srikanth et al., 2011).

Les protéines SopB (porté sur le SPI-5), SopE et SopE2 (protéines issues d'un bactériophage) provoquent l'activation des RhoGTPase Cdc42 et Rac1 de la cellule hôte ce qui induit une réorganisation du squelette d'actine ainsi que la cascade inflammatoire décrite précédemment dans la partie 1.4.1. Les effecteurs SipA et SipC portés par le SPI-1 agissent de manière similaire se liant à l'actine en diminuant la concentration nécessaire à sa polymérisation (SipA) et en assurant la stabilité des filaments existants (SipC) tout en induisant un réarrangement de ces filaments autour de la bactérie. Ce réarrangement des microtubules permet l'entrée de *Salmonella* dans la cellule hôte et la formation de la Vacuole Contenant les Salmonelles (VCS) (Marcus et al., 2000; Hapfelmeier et al., 2004; Haraga et al., 2008; Srikanth et al., 2011; Hume et al., 2017).

Une fois la bactérie implantée dans la cellule hôte, le T3SS-1 joue un rôle dans la réorganisation de la membrane cytoplasmique et du cytosquelette. Les effecteurs SptP et AvrA, portés sur le SPI-1, vont avoir l'effet opposé des effecteurs SopB, SopE et SopE2 et inhiber la réponse inflammatoire de la cellule hôte par restauration du cytosquelette d'actine et l'inactivation de la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), une voie de signalisation basée sur une cascade de phosphorylations médiées par des protéines kinases. La voie MAPK est impliquée dans la multiplication et la survie cellulaire. Son inhibition permet également de réduire la réponse inflammatoire de la cellule hôte (Srikanth et al., 2011; Que et al., 2013).

1.4.3.2 Mécanisme zipper

La protéine membranaire Rck est codée par le gène *rck* du plasmide de virulence de *Salmonella* porté par certains sérovar dont *Salmonella* Typhimurium, Enteritidis, Gallinarum

ou Choleraesuis (Barth and Bauerfeind, 2005). Cette protéine de la membrane externe a un effet anti-bactéricide via l'inhibition de la polymérisation du complément C9 sur la surface cellulaire évitant ainsi la formation du complexe d'attaque membranaire capable de percer des pores dans la membrane cellulaire des bactéries (Rosselin et al., 2010).

Elle joue également un rôle dans l'invasion de l'hôte par *Salmonella*. L'interaction de la protéine Rck et du récepteur EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) induit l'activation des GTPase Cdc42 et Rac qui provoquent un réarrangement du cytosquelette comme pour le mécanisme *trigger* (Wiedemann et al., 2016; Mambu et al., 2017). Si ce réarrangement est plus modeste que celui induit par le T3SS-1, il permet néanmoins l'invasion de l'hôte via le mécanisme dit *zipper* (Rosselin et al., 2010; Velge et al., 2012a; Pilla and Tang, 2018) détaillé dans la **figure 20**.

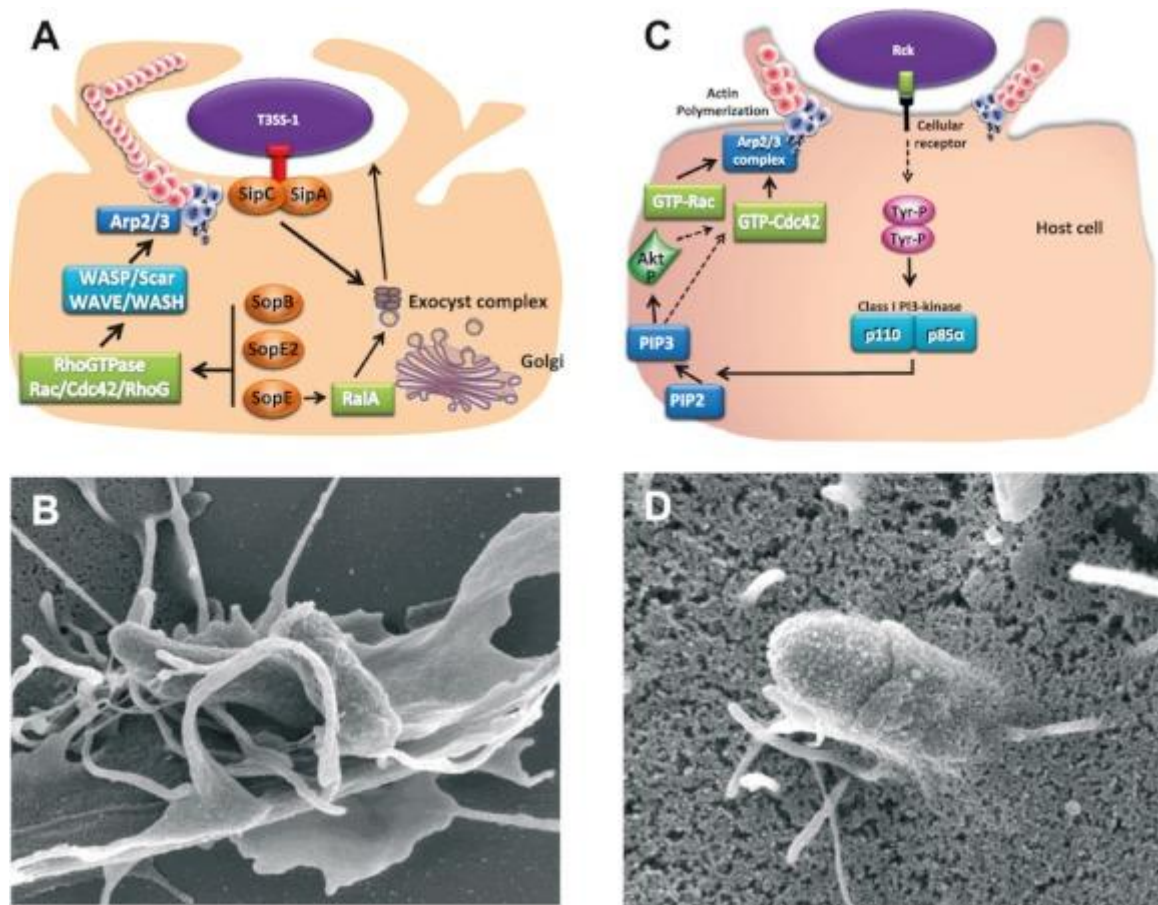


Figure 20 : Différence entre les mécanisme trigger et zipper chez *Salmonella* (Velge et al., 2012a).

Le mécanisme trigger (A, B) repose sur l'injection d'effecteurs provoquant une réponse inflammatoire et un réarrangement actif du cytosquelette tandis que le mécanisme zipper (C, D) provoque une interaction avec le récepteur EGFR. Cette interaction conduit à une cascade de réactions : la phosphorylation d'une tyrosine kinase qui induit l'activation des phosphoinositides 3 kinase de classe 1 participant à l'activation des protéines kinases Akt, Rac1 et Cdc42 qui vont induire le réarrangement du cytosquelette (D).

1.4.3.3 Invasine PagN.

En plus du T3SS-1 et de Rck, *Salmonella* dispose sur le SPI-6 du gène *pagN* codant pour la protéine PagN. La protéine PagN est une protéine auto-transporteur de la membrane extérieure ayant une structure similaire aux invasines Hek et Tia d'*E. coli*. Une délétion du gène *pagN* cause une dégradation significative des capacités d'invasion cellulaire de *Salmonella* sans réduire ses capacités d'adhésion (Lambert and Smith, 2008). Le mécanisme d'invasion médié par PagN est encore mal connu, mais nécessite l'interaction de la protéine PagN avec le sulfate d'héparane, un polysaccharide présent à la surface des cellules eucaryotes à la manière d'une hémagglutinine. Cela provoquerait une polymérisation des actines et l'entrée dans la cellule hôte (Lambert and Smith, 2009; Velge et al., 2012b; Yang et al., 2013; Goswami et al., 2018). L'expression de PagN est régulée par le couple PhoP/PhoQ qui est stimulé par des conditions proches de celles rencontrées dans la VCS. Cela permettrait une expression rapide de l'invasine PagN lors de la dissémination des salmonelles hors de la VCS facilitant ainsi l'invasion systémique (Wiedemann et al., 2015).

1.4.4 Survie et multiplication dans la cellule hôte.

Une fois que *Salmonella* a formé une VCS dans le cytoplasme de la cellule hôte et a inversé les changements physiologiques provoqués par l'invasion, elle doit s'adapter au milieu intracellulaire. La bactérie va diminuer l'expression du T3SS-1 et de ses effecteurs et mettre en place des mécanismes permettant la survie et la multiplication de la bactérie dans la VCS.

Salmonella dispose d'un second système de sécrétion de type 3 porté par le SPI-2 (T3SS-2). Le SPI-2 est un îlot génomique de 40 Kb divisé en deux segments. Le premier segment de 14.5 kb environ est commun à *S. enterica* et *S. bongori* et porte les gènes *ttr* impliqués dans la réduction du tétrathionate (Michael, 2000).

Le second segment de 25.3 kb, spécifique de *S. enterica*, porte les gènes codant pour le T3SS-2 (*ssaB-U*), pour son système de régulation (*ssrAB*), pour ses chaperons (*sscAB*) et pour certains de ses effecteurs (*sseABCDEF*) (Marcus et al., 2000; Michael, 2000). La **figure 21** détaille la structure génétique du SPI-2 et du T3SS-2.

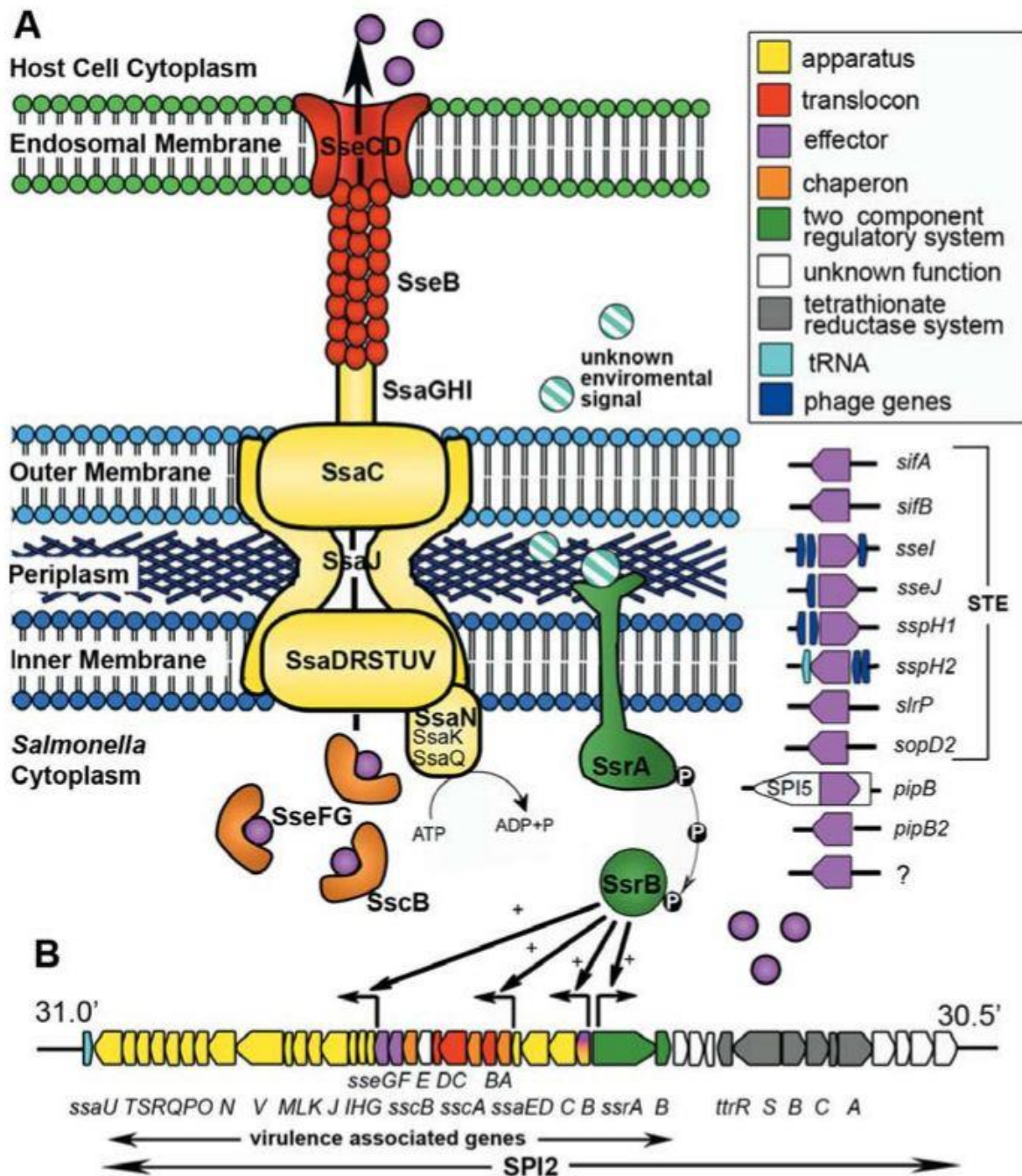


Figure 21 : Structure génétique du SPI-2 et organisation du T3SS-2 (Kuhle and Hensel, 2004).
A. Structure du T3SS-2 et origine de ses principaux effecteurs. Le locus STE (*Salmonella* translocated effector) correspond à des effecteurs liés à des bactériophages. B. Structure génétique du SPI-2.

L'expression du T3SS-2 est régulée par les gènes *ssrA* et *ssrB* et est provoquée par les conditions de la VCS : une concentration faible en ion Mg^{2+} ou Ca^{2+} , le manque de phosphate et un pH acide (proche de 5) (Michael, 2000; Srikanth et al., 2011). Le T3SS-2 permet à la bactérie d'injecter des effecteurs spécifiques au SPI-2 dans le cytoplasme de l'hôte via l'effet de SseB qui forme un translocon avec les effecteurs SseC et SseD. Ce translocon ouvre un pore dans la membrane de la VCS en direction du cytoplasme (Srikanth et al., 2011). La **figure 22** résume les principales actions des effecteurs connus.

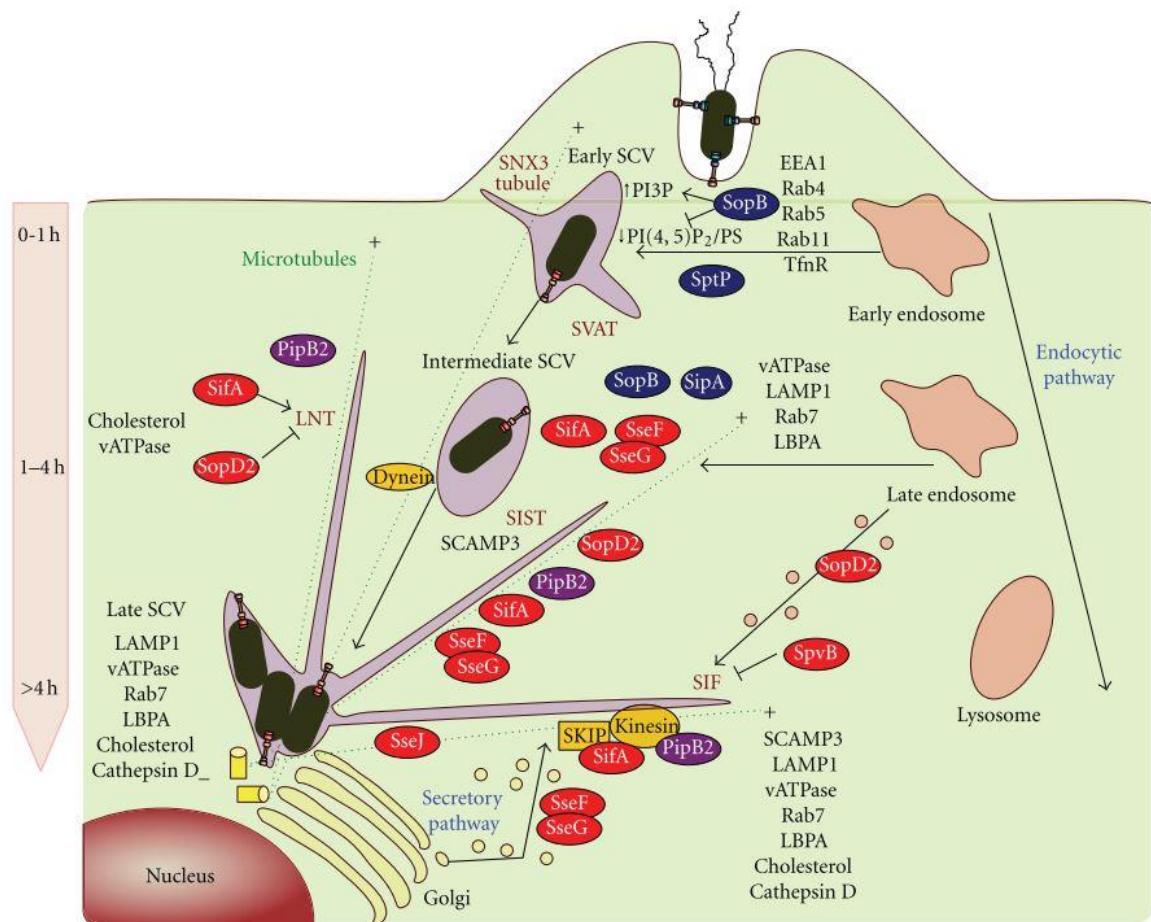


Figure 22. Formation et évolution de la Vacuole Contenant les *Salmonella* (Ramos-Morales, 2012).

Après l'internalisation, *Salmonella* s'établit dans la VCS. Les premières étapes sont gouvernées par les effecteurs SopB et SptP du T3SS-1 (en bleu). Cette étape est caractérisée par la formation de tubules SNX3 et SVAT. Le mouvement de la VCS vers le noyau à proximité des appareils de Golgi nécessite l'action des effecteurs SipA et SopB ainsi que des effecteurs du T3SS-2 (en rouge) SifA, SseF et SseG. Un grand nombre d'effecteurs sont impliqués dans les dernières étapes de maturation et la conservation de l'intégrité de la VCS. La réplication est initiée 4 à 6 H après l'invasion et est caractérisée par la formation de plusieurs sortes de tubules connues comme SIF, SIST et LNT. En violet, les effecteurs excrétés à la fois par le T3SS-1 et le T3SS-2.

La première étape consiste à relocaliser la VCS à proximité du noyau et de l'appareil de Golgi de la cellule hôte. La VCS subit donc des transformations via l'action de l'effecteur SopB qui possède une persistance supérieure à la plupart des effecteurs du T3SS-1. SopB active Atk et réduit le contenu en phosphoinositide PI(4,5)P₂ de la membrane de la vacuole. Cela provoque l'augmentation de son contenu en phosphoinositide PI3P. L'action de SopB permet la maintenance de la vacuole (Ramos-Morales, 2012). Ces changements dans la structure de la membrane de la vacuole empêchent en effet sa fusion avec les lysosomes et stabilise la vacuole via l'incorporation du marqueur Rab dans la membrane de la vacuole, lui donnant

l'apparence d'un phagosome aux yeux de la cellule (Srikanth et al., 2011; Ramos-Morales, 2012). Son action va permettre l'acidification de la vacuole et l'activation du T3SS-2 (Ilyas et al., 2017).

Une fois la vacuole formée et camouflée, elle migre en position juxta-nucléaire via l'action des effecteurs SipA et SopB du T3SS-1 et des effecteurs SifA, SseF et SseG du T3SS-2 (Ramos-Morales, 2012). Ces effecteurs provoquent l'activation des dynéines sur les microtubules et la migration de la VCS vers le noyau, au niveau du Centre Organisateur des MicroTubules (COMT) à proximité de l'appareil de Golgi (Malik Kale et al., 2011; Ramos-Morales, 2012).

La dernière étape de la maturation de la VCS consiste en la formation des Filaments Induits par *Salmonella* (SIFs). La fonction des SIFs reste encore mal connue mais leur formation induit la multiplication de *Salmonella* à l'intérieur de la VCS. Les SIFs se forment le long des microtubules via l'action des effecteurs SifA et PipB2. SifA active les GTPases de l'hôte qui provoquent l'activation de l'effecteur SseJ qui entraîne une modification de la membrane de la VCS afin de favoriser la formation de tubules. Ces deux effecteurs forment avec l'effecteur PipB2 un complexe en se liant aux protéines SKIP et à la kinésine 1 de la cellule hôte ce qui induit la fixation des SIFs naissants aux microtubules de la cellule hôte et, par leur expansion, le déplacement de la VCS (Ramos-Morales, 2012).

L'effecteur SopD2 est associé à l'endosome tardif : il inhibe la formation de filaments par la VCS et limite la migration des vésicules vers la VCS (Ramos-Morales, 2012). SopD2 a un effet antagoniste vis-à-vis de l'effecteur SifA, leurs actions permettant la stabilisation de la VCS et la multiplication des salmonelles (Schroeder et al., 2010).

1.4.5 Induction de la mort cellulaire

Salmonella est capable d'induire la mort des cellules qu'elle a infectées par apoptose, une mort cellulaire programmée déclenchée par l'activation des caspases. Les caspases sont des protéases à cystéine : des enzymes capables d'hydrolyser les liaisons peptidiques. Des caspases initiateuses vont provoquer un clivage libérant le domaine catalytique des caspases effectrices. Les caspases effectrices vont alors déclencher l'apoptose via une chaîne de réactions qui conduit principalement à la condensation du noyau, la dégradation de l'ADN, la réduction du potentiel de la membrane mitochondriale et la dégradation de la cytokératine. La cellule se fragmente en différents corps apoptotiques contenant les salmonelles dont la modification de la membrane induite par l'apoptose va provoquer la phagocytose par les macrophages. Ce phénomène favorise l'infection des macrophages par *Salmonella*.

L'apoptose induite par *Salmonella* est déclenchée via différents mécanismes dépendants des effecteurs du SPI-1 et du SPI-2. *Salmonella* possède 3 mécanismes conduisant à

l'apoptose (Ramos-Morales, 2012). La **figure 23** illustre la différence entre l'apoptose induite par *Salmonella* et la pyroptose que *Salmonella* induit chez les macrophages.

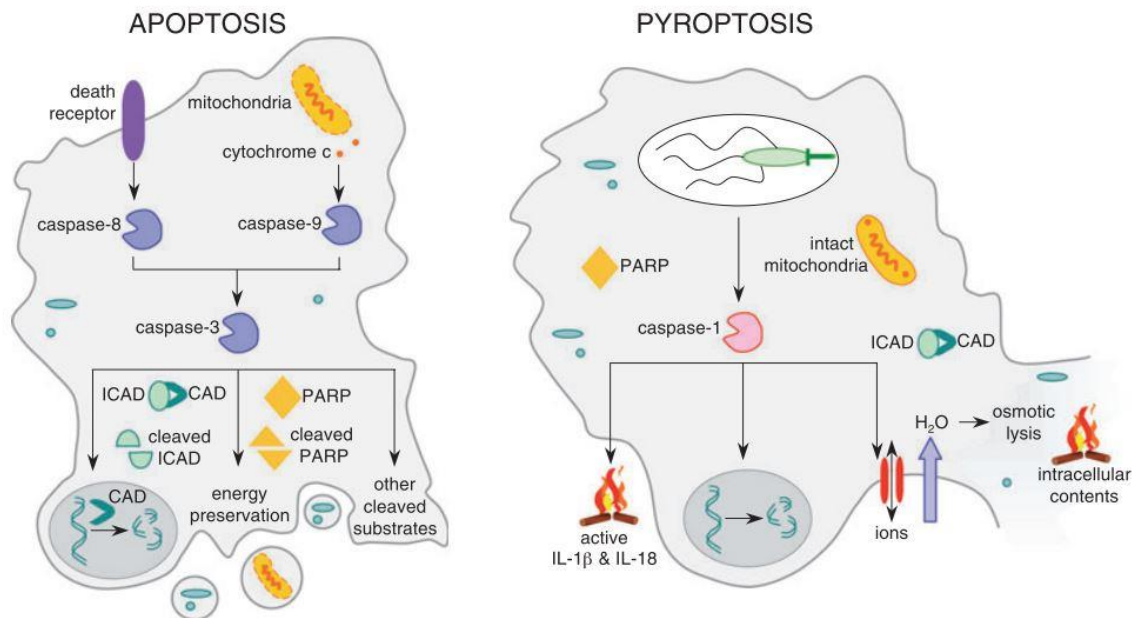


Figure 23. Mécanismes d'apoptose et de pyroptose induits par *Salmonella* (Fink and Cookson, 2007).

L'apoptose est principalement initiée par l'excision des récepteurs de mort cellulaire de la membrane cytoplasmique qui conduit à l'activation d'un initiateur : la caspase-8. La sécrétion de cytochrome c par les mitochondries peut également conduire à l'activation de la caspase initiateur 9. Les caspases-8 et 9 activent la caspase-3, un effecteur qui clive différents substrats intracellulaires pour produire l'apoptose, notamment la DNase activée par la caspase (CAD). Le facteur PARP (enzyme Poly-ADP-Ribose Polymérase) est activé et désactivé par les caspases lors de l'apoptose régulant l'épuisement des réserves de la cellule tout au long du processus. La pyroptose est médiée par la caspase-1 et provoque l'excrétion des cytokines inflammatoires IL-1β et IL-18 et l'activation des nucléases qui vont provoquer la dégradation de l'ADN. Enfin, la caspase 1 conduit à la formation de pores dans la membrane cytoplasmique qui conduisent à la lyse du macrophage.

Dans les cellules épithéliales *Salmonella* induit une apoptose 12 à 18 heures après son entrée dans la cellule hôte. Ce mécanisme d'induction de la mort cellulaire dépend de la présence des SPI-1 et 2. Le mécanisme est encore mal élucidé mais implique l'activation d'un ensemble d'initiateurs de l'apoptose qui conduisent à l'activation des caspases 3 et 8. L'effecteur du T3SS-2 SpvB joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose ainsi que l'effecteur SlprP, transloqué à la fois par les SPI-1 et 2.

Deux effecteurs du SPI-1 (AvrA et SopB) ont un effet inhibiteur de l'apoptose induite par *Salmonella* : AvrA agit directement contre l'apoptose via l'inhibition de la voie MAPK et SopB qui, par contre, favorise la survie de la cellule hôte, via l'activation de l'Akt (Ramos-Morales, 2012).

Chez les macrophages, le T3SS-1 est capable d'induire une pyroptose, c'est-à-dire une apoptose caractérisée par une inflammation importante. Deux mécanismes indépendants peuvent être mis en œuvre :

- La pyroptose rapide, qui se produit 1 à 2 heures après l'entrée de *Salmonella* dans le macrophage. Elle est dépendante du T3SS-1 et repose sur l'activation de la caspase-1 par interaction directe avec l'effecteur SipB et l'activation de l'inflammasome de l'hôte (Jarvelainen et al., 2003; Fink and Cookson, 2007; Ramos-Morales, 2012). L'activation de la caspase-1 induit la pyroptose comme décrit sur la **figure 22**.
- La pyroptose qui se déclenche 18 à 24 heures après l'infection, quand les conditions de la VCS inhibent l'expression du T3SS-1 et de ses effecteurs. Dans ce cas, ce sont les effecteurs SpvB et SseL du SPI-2 qui activent les récepteurs de l'inflammasome NLR4 et NLRP3 via la médiation de la flagelline. Comme précédemment, l'activation de la caspase-1 va provoquer la pyroptose de la cellule hôte et une inflammation des tissus environnants (Fink and Cookson, 2007; Ramos-Morales, 2012).

La pyroptose des macrophages cause la libération des cytokines IL-1 β et IL-18 responsables des fortes fièvres provoquées par la fièvre typhoïde (Fink and Cookson, 2007). Ce processus inflammatoire contribue à la survie du pathogène dans l'intestin, comme vu précédemment, en permettant une réinfection des cellules épithéliales et une meilleure colonisation de l'intestin (Jarvelainen et al., 2003; Winter et al., 2010; Winter and Baumler, 2011).

La pyroptose permet également aux salmonelles absorbées par les macrophages de se répandre dans l'organisme et de déclencher une infection systémique (Fink and Cookson, 2007; Ilyas et al., 2017).

1.5 Spécificité à l'hôte

1.5.1 Spéciation de *Salmonella*

D'après l'étude de leur taux de substitutions, les genres *Salmonella* et *E. coli* se sont différenciés depuis un ancêtre commun il y a entre 120 et 160 millions d'années (Ochman and Wilson, 1987; Doolittle et al., 1996; Ochman et al., 1999). La principale distinction entre *Salmonella* et *E. coli* repose sur la présence des îlots de pathogénicité de *Salmonella* (Fookes et al., 2011), en particulier du SPI-1, commun à toutes les Salmonelles et qui lui donne, comme vu précédemment, la capacité à mobiliser des facteurs d'inflammation et d'invasion des cellules épithéliales (Baumler et al., 1998; Hensel, 2004). Au sein du genre *Salmonella* un second événement de spéciation se serait produit entre 40 et 25 millions d'années et a conduit à la divergence entre *S. bongori* et *S. enterica*. Il se caractérise par l'acquisition par transfert horizontal du T3SS-2 par *S. enterica* et la capacité à envahir les tissus au-delà de la barrière intestinale (Hensel, 2004). Enfin l'espèce *S. enterica* s'est divisée en différentes sous espèces

parmi lesquelles *S. enterica subsp. enterica* se distingue par une adaptation aux vertébrés à sang chaud (mammifères et oiseaux) (Baumler et al., 1998) comme détaillé sur la **figure 24**.

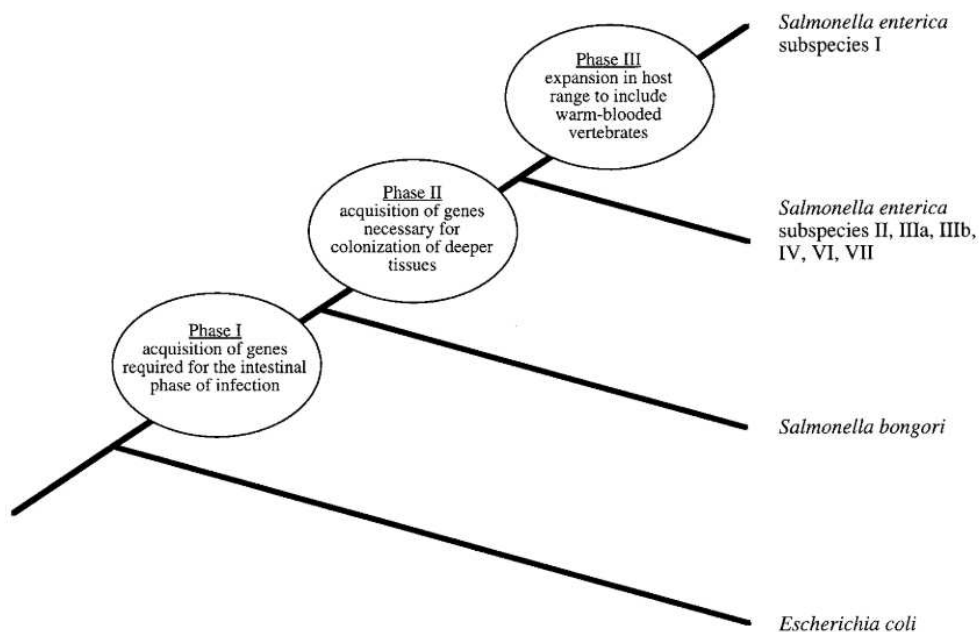


Figure 24 : Modèle pour l'évolution de la virulence du genre *Salmonella* (Baumler et al., 1998).

Trois étapes sont distinguées depuis la divergence d'avec *E. coli* : l'acquisition de la capacité à infecter les cellules épithéliales de l'hôte, la capacité à survivre dans les cellules et à infecter des tissus plus profonds et enfin la capacité à infecter des animaux à sang chaud.

Parmi les différents sérovars de *Salmonella enterica subsp. enterica* on observe des différences dans la gamme d'hôtes potentiels. La plupart des sérovars adoptent un comportement généraliste ce qui permet leur dissémination chez une gamme d'hôtes importante (reptiles, oiseaux, mammifères). Un plus petit nombre de sérovars n'a qu'une gamme d'hôtes plus restreinte, provoquant généralement des pathologies plus graves qu'une simple gastroentérite (Bäumler and Fang, 2013).

Les sérovars sont considérés comme adaptés à un hôte s'ils possèdent la capacité à persister dans la population de celui-ci par transmission directe comme c'est le cas pour *Salmonella Typhi* chez l'humain, *S. Dublin* chez le bovin ou encore *S. Choleraesuis* chez le porc (Kingsley and Baumler, 2000). Le mécanisme infectieux de ces sérovars adaptés à un hôte spécifique repose généralement sur le portage chronique via une infection systémique plutôt que sur la multiplication dans l'intestin (Bäumler and Fang, 2013). La **figure 25** illustre l'adaptation à l'hôte chez *Salmonella*.

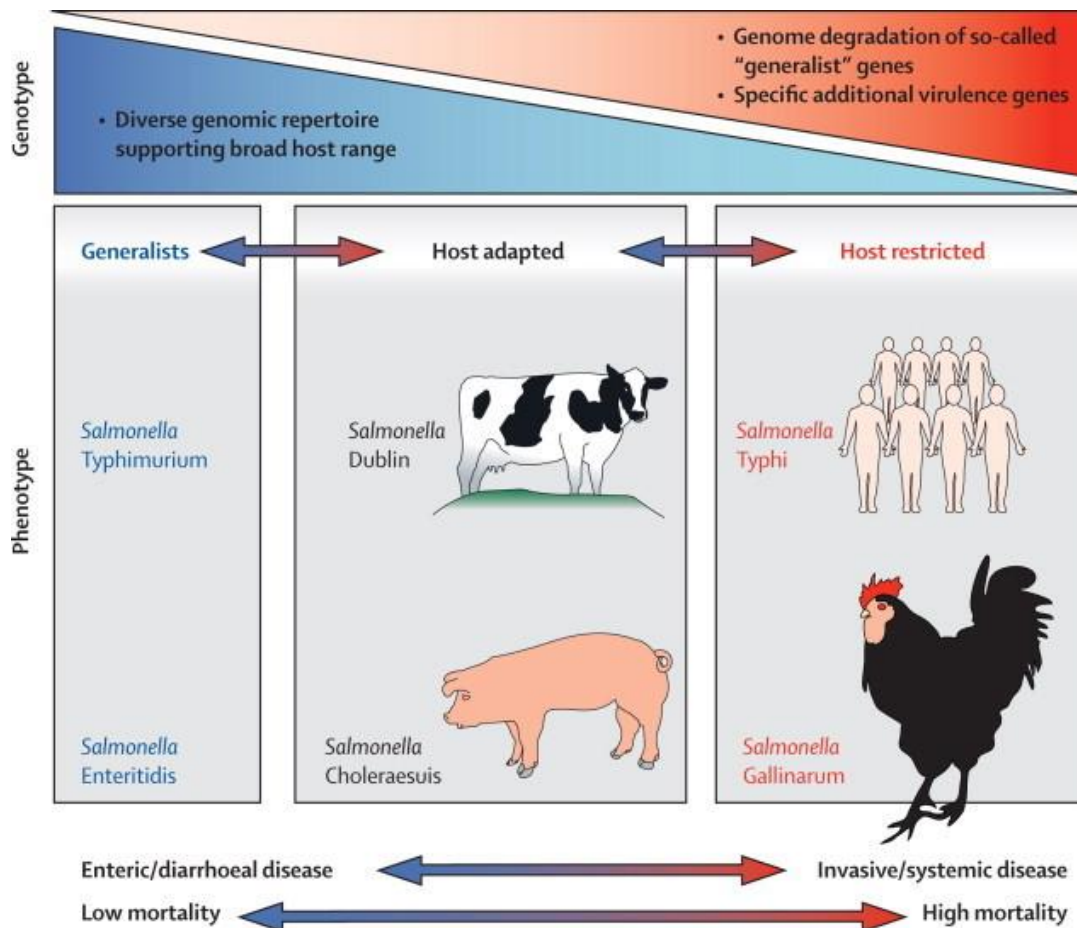


Figure 25 : Spécialisation chez *Salmonella* (Feasey et al., 2012).

1.5.2 Facteurs de spécificité à l'hôte.

L'adaptation à l'invasion systémique chez une espèce donnée est généralement accompagnée de l'acquisition de caractéristiques génétiques particulières. Ainsi *Salmonella Typhi* ne provoque pas les inflammations intestinales comme les sérovars généralistes mais une invasion systémique pendant laquelle la bactérie colonise différents organes (Winter et al., 2014) dont la vésicule biliaire. A ce niveau, la bactérie peut coloniser une niche et rejoindre l'intestin de façon intermittente via la bile pour se répandre dans l'environnement et potentiellement infecter d'autres hôtes (Kingsley and Baumber, 2000).

Ce mécanisme d'invasion particulier est dû à la capacité acquise par *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* et *S. Dublin* à réguler rapidement l'expression de ses gènes de virulence via la présence du SPI-7 dont les gènes codent pour la biosynthèse (*tviBCDE*) et l'export (*vexABCDE*) de l'antigène de virulence Vi. La synthèse de l'antigène Vi est régulée par le gène *tviA* qui inhibe l'expression de l'antigène flagellaire et du T3SS-1 qui permet à *S. Typhi* d'échapper au système immunitaire et favorise l'invasion systémique (Wangdi et al., 2012; Winter et al., 2014).

Cette capacité d'invasion systémique des sérovars adaptés à l'hôte se caractérise également par une baisse de la pression sélective sur les gènes permettant la colonisation intestinale.

Cela conduit à une baisse du nombre de gènes fonctionnels qui est observée chez la plupart des sérovars « spécialistes » (Bäumler and Fang, 2013). Ainsi, par exemple, si *S. Typhimurium* ne possède que 25 pseudogènes (des gènes ayant perdu leur fonction via une mutation ponctuelle) *S. Typhi* en possède 204, *S. Paratyphi A*, 174 (McClelland et al., 2004) et *S. Gallinarum*, 309 (McClelland et al., 2001; Thomson et al., 2008).

La spécificité à l'hôte peut donc s'évaluer par les caractéristiques génétiques des souches. Les opérons codant pour des facteurs d'adhésion cellulaire sont des éléments du génome ayant une forte propension à muter en pseudogènes lorsque leur fonction n'est plus requise. Dans les sérovars spécialistes comme *S. Typhi*, 7 à 8 des 12 opérons fimbriaux contiennent des pseudogènes (Hansmeier et al., 2017).

Cependant, ces pertes de fonction ne se limitent pas aux sérovars spécialistes et peuvent se retrouver chez certains sérovars généralistes (Hansmeier et al., 2017). La perte ou l'acquisition de facteurs d'adhésion permettrait ainsi d'expliquer la gamme d'hôtes d'un sérovar particulier. Par exemple les opérons fimbriaux *lpfABCDE*, *bcgABCDEFGH*, *stbABCDE*, *stdABCD* et *sthABCDE* sont nécessaires à la colonisation à long terme de l'intestin murin par *S. Typhimurium* (Weening et al., 2005). Ainsi la perte ou l'acquisition d'opérons fimbriaux et de facteurs d'adhésion peut être considérée comme des marqueurs de spécificité à l'hôte même si la contribution précise de chaque opéron à la gamme d'hôtes d'un sérovar donné est encore mal connue (Yue et al., 2012).

Au-delà de la présence/absence de gènes de virulence, les variations alléliques (variations nucléiques dans la séquence de certains gènes) peuvent avoir aussi un impact important sur la spécificité à l'hôte. Plusieurs études démontrent que des variations dans la structure protéique de l'adhésine FimH a un fort impact sur la spécificité à l'hôte (Yue et al., 2012; Yue et al., 2015). Les différents allèles de *fimH* codent pour des protéines présentant de subtiles modifications du site de liaison au mannose et peuvent induire des variations dans la gamme d'hôte de la bactérie. Ainsi le variant de FimH de *S. Gallinarum* n'a pas d'affinité pour le mannose et se fixe à un récepteur encore inconnu (Kisiela et al., 2005). Un grand nombre de sérovars restreints ou adaptés à un hôte présentent des variants de FimH possédant une affinité bien supérieure aux cellules épithéliales de leur hôte de prédilection que le sérovar *Typhimurium* plus généraliste (Yue et al., 2015).

Certains gènes de virulence ont un taux de mutation supérieur au reste du génome de *Salmonella* (Eswarappa et al., 2008). C'est le cas de certains gènes des SPIs :

- *sipD* : un translocon du T3SS-1 porté par le SPI-1 qui joue un rôle essentiel dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte ;
- *sptP* : effecteur du SPI-1 impliqué dans l'inhibition de la réponse inflammatoire ;
- *sseC* et *sseD* : deux composants du translocon du SPI-2 requis pour la survie intracellulaire de *Salmonella* ;