

Caractérisation fonctionnelle de BamB, protéine impliquée dans la biogenèse de la membrane externe et la virulence de Salmonella

Fatémeh Namdari

▶ **To cite this version:**

Fatémeh Namdari. Caractérisation fonctionnelle de BamB, protéine impliquée dans la biogenèse de la membrane externe et la virulence de Salmonella. Microbiologie et Parasitologie. Université François Rabelais (Tours), 2013. Français. NNT : . tel-02810628

HAL Id: tel-02810628
https://hal.inrae.fr/tel-02810628

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE « Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant»

INRA Centre Val de Loire, UMR1282 ISP-311, équipe « Signalisation, Portage et Virulence Bactérienne»

THÈSE présentée par :

Fatémeh NAMDARI

soutenue le : **26 mars 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Caractérisation fonctionnelle de BamB, protéine impliquée dans la biogénèse de la membrane externe et la virulence de *Salmonella*

THÈSE dirigée par :

Mme Isabelle Virlogeux-Payant	Directrice de Recherche, INRA, Tours

RAPPORTEURS :

Mme Françoise Norel	Chargée de Recherche, HDR, Institut Pasteur, Paris
M. Romé Voulhoux	Chargé de Recherche, HDR, CNRS, Marseille

JURY :

M. Christophe Grangeasse	Directeur de Recherche, CNRS, Lyon
M. Jean-Yves Madec	Directeur de Recherche, ANSES, Lyon
Mme Françoise Norel	Chargée de Recherche, HDR, Institut Pasteur, Paris
Mme Agnès Rosenau	Professeur Emérite, Université François Rabelais, Tours
Mme Isabelle Virlogeux-Payant	Directrice de Recherche, INRA, Tours
M. Romé Voulhoux	Chargé de Recherche, HDR, CNRS, Marseille

A mes chers parents,

تقدیم به مادرو پدر عزیزم

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Mme Françoise Norel et M. Romé Voulhoux d'avoir accepté d'étudier mon travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie Mme Agnès Rosenau, M. Christophe Grangeasse et M. Jean-Yves Madec d'avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse.

Ce travail de thèse a été financé par la Région Centre et a été prolongé grâce aux financements accordés par les Départements MICA (Microbiologie et Chaîne Alimentaire) et SA (Santé Animale).

Je remercie Mme Emmanuelle Maguin et M. Thierry Pineau, chefs de ces départements, de m'avoir accordé cette prolongation et de m'avoir ainsi permis d'aboutir mes travaux de thèse.

Je remercie également Mme Dominique Buzoni-Gatel et Mme Nathalie Winter, directrice et co-directrice de l'unité ISP (Infectiologie et Santé Publique) de l'INRA de Tours-Nouzilly.

Un grand merci à M. Philippe Velge de m'avoir accueillie au sein de son équipe SPVB (Signalisation, Portage et Virulence Bactérienne).

Je tiens à adresser toute ma gratitude envers ma directrice de thèse, Mme Isabelle Virlogeux-Payant. Merci pour ta disponibilité et nos discussions scientifiques.

Je remercie Mme Ana Paula Teixeira-Gomes, Mme Isabelle Monchaux, M. Etienne Giraud et M. Pierre Germon pour leur aide scientifique et technique lors de mes différentes expériences.

Je tiens à remercier chaleureusement chacun des membres de l'équipe SPVB: M. Olivier Grépinet, M. Jérôme Trotereau, Mme Anne-Marie Chaussé, Mme Agnès Wiedemann, Mme Elisabeth Bottreau, Mme Sylvie Roche et Mme Pierrette Menanteau.

Je remercie mes amis et collègues thésards/post-doctorants rencontrés à l'INRA: Zineb, Aurore, Manon, Salim, Galliano, Julie, Denis, Mario, Perrine, Gaelle, Nicolas, Louis, Louise, Robin, Laura, Simon, Genaro, Pierre, Emilie et Nadia.

Je remercie également Dorian et Lisa, les étudiants que j'ai eu la chance de co-encadrer.

Un grand merci à ma famille, mes proches et amis qui m'ont soutenue tout au long de ce travail.

Résumé

La protéine BamB est une lipoprotéine de membrane externe appartenant au complexe BAM (β-Barrel Assembly Machinery) et impliquée dans l'assemblage des protéines de membrane externe (PME), la sensibilité aux antibiotiques, le contrôle de l'expression des trois systèmes de sécrétion de type III (T3SS) et la virulence de *Salmonella*. Chez *E. coli,* au sein du complexe BAM, elle interagit directement avec la protéine BamA. De plus, chez cette bactérie, BamB présente une activité sérine-thréonine kinase. Afin de mieux caractériser le rôle de BamB, nos objectifs ont été d'étudier (1) l'impact de l'altération de l'interaction de BamB avec le complexe BAM ou de sa séquestration dans le cytoplasme sur l'ensemble des rôles décrits de BamB et (2) l'activité kinase putative de BamB chez *Salmonella*. Nos résultats montrent que certains rôles de BamB sont dissociables entre eux et que l'interaction BamA/BamB n'est pas requise pour le rôle de BamB dans le contrôle de l'expression des T3SS, la virulence de *Salmonella* et l'assemblage des PME à la membrane externe. Aucune activité kinase ni aucune activité cytoplasmique de la protéine n'a pu être formellement démontrée.

Mots-clés: *Salmonella*, BamB, complexe BAM, biogénèse de la membrane externe, protéines de membrane externe (PME), appareils de sécrétion de type III (T3SS), virulence.

Résumé en anglais

BamB is an outer-membrane lipoprotein belonging to the BAM complex (β-Barrel Assembly Machinery). In *Salmonella*, it is involved in the assembly of outer membrane proteins (OMP), in antibiotic susceptibility, in the transcriptional control of the three Type-Three-Secretion-Systems (T3SS) related genes and also in virulence. In *E. coli*, BamB interacts directly with the BamA protein. Moreover, BamB has been shown to have a serine-threonin kinase activity in this bacterium. In order to better characterize the roles of the BamB protein, our purposes were to study (1) the impact of the alteration of the interaction of BamB with the BAM complex or of its cytoplasmic sequestration and (2) its putative kinase activity in *Salmonella*. Our results show that some of the BamB roles are dissociable and that the BamA/BamB interaction is not required for T3SS expression, *Salmonella* virulence or OMP assembly in the outer membrane. Currently, neither a kinase activity nor a cytoplasmic activity has been clearly demonstrated for this protein.

Keywords: *Salmonella*, BamB, BAM complex, outer-membrane biogenesis, outer membrane proteins (OMP), Type III-secretion systems (T3SS), virulence.

Liste des tableaux

Table 1A et 1B. Souches bactériennes et plasmides utilisés 50-51

Table 2. Liste des amorces utilisées 57

Table 3. Impact de la délétion de *bamB* sur la sensibilité aux antibiotiques de *S*. Enteritidis 71

Table 4. Impact de l'addition d'arabinose dans le milieu de culture sur la sensibilité aux antibiotiques de *S*. Enteritidis 72

Table 5. Impact des substitutions d'acides aminés de BamB sur la sensibilité aux antibiotiques de *S.* Enteritidis 72

Table 6. Comparaison deux à deux du niveau de colonisation de la rate par les différentes souches de *S.* Enteritidis 76

Table 7. Impact de la délétion du peptide signal de BamB sur la perméabilité membranaire de *S.* Enteritidis 77

Table 8. Impact de la substitution K82A de BamB sur la sensibilité aux antibiotiques du mutant Δ*bamB* de *S.* Enteritidis 85

Table 9. Impact de la complémentation du mutant LA5Δ*bamB* par le plasmide recombinant pAC*bamD* et des mutants LA5Δ$bamD_{172}$ et LA5Δ$bamD_{227}$ par le plasmide recombinant pAC*bamB* sur la perméabilité aux antibiotiques de *S.* Enteritidis 87

Table 10. Récapitulatif des caractères phénotypiques des mutants *S.* Enteritidis LA5Δ*bamB* exprimant les différents variants de BamB 89

Liste des figures

Figure 1. Les différents rôles de BamB décrits à ce jour dans la littérature 13

Figure 2. Structure du flagelle de *Salmonella* 21

Figure 3. Séquences d'assemblage du T3SS-1 de *Salmonella* suite à la mise en place du corps basal 23

Figure 4. Régulation transcriptionnelle et environnementale des gènes de SPI-1 24

Figure 5. Modèle de structure du T3SS-2 de *Salmonella* 27

Figure 6. Modèle de la vie intracellulaire de *Salmonella* dépendante du T3SS-2 28

Figure 7. Organisation de la membrane d'une bactérie à Gram négatif 30

Figure 8. Structure du LPS 31

Figure 9. Modèles de transfert du LPS à la membrane externe 34

Figure 10. Modèle représentant les voies Mla et PldA 35

Figure 11. Les peptides signaux bactériens 36

Figure 12. Maturation des lipoprotéines et leur transport chez les bactéries à Gram négatif 38

Figure 13. Schéma du complexe BAM et de l'assemblage de PME (OMP) chez *E. coli* 39

Figure 14. Région périplasmique de BamA composée des domaines POTRA 39

Figure 15. Alignement de séquences partielles des protéines de la famille Omp85 de procaryotes et d'eucaryotes 40

Figure 16. Structure de BamB 41

Figure 17. Implication de chaque lipoprotéine du complexe BAM dans l'assemblage des PME à la membrane externe et la sensibilité aux antibiotiques 43

Figure 18. Modèle du rôle des chaperonnes périplasmiques dans la biogénèse de la membrane externe 44

Figure 19. Modèles d'assemblage des PME par le complexe BAM 45

Figure 20. Frise présentant les différentes étapes de l'infection expérimentale des souris Balb/C par voie orale 54

Figure 21. Alignement des séquences en acides-aminés de la protéine BamB chez *E. coli* et *S.* Enteritidis 69

Figure 22 : Vérification des séquences nucléotidiques des plasmides pBAD24*bamB* fournis par le Dr R. Misra 69

Figure 23. Effet des substitutions d'acides aminés dans la protéine BamB sur son interaction avec BamA 70

Figure 24. Impact des substitutions d'acides aminés dans la protéine BamB sur les protéines de membranes chez *S.* Enteritidis 73

Figure 25. Impact des substitutions d'acides aminés de BamB sur l'expression du T3SS-1 et des flagelles et la fonctionnalité du T3SS-1 chez *S.* Enteritidis 74

Figure 26. Impact des substitutions en acides aminés de BamB sur la virulence de *Salmonella* chez la souris 75

Figure 27. Schéma des domaines protéiques de BamB de *S.* Enteritidis 77

Figure 28. Antibiogrammes réalisés sur le mutant Δ*bamB* exprimant BamB séquestrée dans le cytoplasme suite à la délétion du peptide signal de BamB 78

Figure 29. Antibiogrammes sur deux clones *ΔbamB+bamBΔps* présents dans la zone d'inhibition de la rifampicine ou de la vancomycine 78

Figure 30. PCR de vérification des clones Δ*bamB+bamB*Δ*ps* 79

Figure 31. Impact de la délétion du peptide signal de BamB sur l'expression du T3SS-1 et du flagelle ainsi que sur la fonctionnalité du T3SS-1 79

Figure 32. Fractionnement cellulaire pour les différentes souches étudiéeS 80

Figure 33. Etude des 2 formes de BamB identifiées par western-blot anti-BamB dans la fraction cytoplasmique de la souche LA5Δ*bamB+bamB*Δ*ps* 82

Figure 34. Etude de l'activité d'auto-phosphorylation de 6His-BamB de *Salmonella* 82

Figure 35. Recherche de protéines de *S.* Enteritidis phosphorylées sur un résidu sérine par western-blot sur les protéines du culot 83

Figure 36. Stratégie de construction du plasmide recombinant exprimant BamBK82A 84

Figure 37. Impact de la substitution K82A de BamB sur l'expression du T3SS-1 et des flagelles et la fonctionnalité du T3SS-1 86

Table des matières

Remerciements 1
Résumé 4
Résumé en anglais 5
Liste des tableaux 6
Liste des figures 7
Objectifs 13

INTRODUCTION 14

***I.* Salmonella *et les salmonelloses* 15**
I.1. Caractéristiques de Salmonella 15
I.1.1 Taxonomie 15
I.1.2. Caractéristiques antigéniques et biochimiques 15
I.1.3. Habitât et spectre d'hôtes 16
I.2. Les salmonelloses animales 16
I.2.1 Le portage asymptomatique 16
I.2.2. Les gastro-entérites 17
I.2.3. Les infections systémiques ou fièvres typhoïde et paratyphoïde 18
I.3. Le cycle infectieux de Salmonella 19
***II. Les systèmes de sécrétion de type III chez* Salmonella 21**
II.1. Le flagelle 21
II.1.1. La structure du flagelle 21
II.1.2. La régulation de l'expression des protéines flagellaires 22
II.1.3. Le flagelle et la mobilité de *Salmonella* 22
II.2. Le T3SS-1 23
II.2.1. La structure du T3SS-1 de *Salmonella* 23
II.2.2. La régulation de l'expression du T3SS-1 24
II.2.3. Le T3SS-1 et l'invasion cellulaire de *Salmonella* 25
II.2.4. Suite à l'entrée médiée par le T3SS-1 26
II.2.5. Le rôle *in vivo* du T3SS-1 26
II.3. Le T3SS-2 27

II.3.1. La structure du T3SS-2 de *Salmonella* 27
II.3.2. La régulation de l'expression du T3SS-2 27
II.3.3. Le T3SS-2 et la survie et multiplication intracellulaire *de Salmonella* 28
II.3.4. Le rôle *in vivo* du T3SS-2 29
III. La membrane externe des bactéries à Gram négatif **30**
III.1. Composition 30
III.1.1. Les lipides de la membrane externe 30
III.1.1.1. Le LPS 30
III.1.1.2. Les phospholipides 31
III.1.2. Les protéines au sein de la membrane externe 31
III.1.2.1. Les protéines intégrales de membrane externe 32
III.1.2.2. Les lipoprotéines de membrane externe 32
III.2. Biogénèse de la membrane externe 33
III.2.1. Biogénèse du LPS 33
III.2.2. Trafic des phospholipides de la membrane externe 34
III.2.3. Biogénèse des lipoprotéines et des protéines de membrane externe 35
III.2.2.1. Franchissement de la membrane interne 35
III.2.3.1.1. Le système Sec 36
III.2.3.1.2. Le système Tat 37
III.2.3.2. Maturation et assemblage des lipoprotéines à la membrane externe 37
III.2.3.3. Assemblage des protéines intégrales de la membrane externe 38
IV. Le complexe BAM **39**
IV.1. Les membres du complexe BAM 39
IV.1.1. La protéine BamA 39
IV.1.2. La lipoprotéine BamB 40
IV.1.3. Les lipoprotéines BamC, BamD, BamE 41
IV.2. Rôle du complexe BAM 43
IV.2.1. Les partenaires du complexe BAM dans la biogénèse des PME 43
IV.2.2. Modèles d'insertion des PME par le complexe BAM 44
IV.2. Rôle du complexe BAM dans la virulence bactérienne 46

MATERIEL ET METHODES **49**

I. Bactériologie **50**

I.1. Souches, vecteurs et milieux de culture 50

I.2. Transformation bactérienne 50

I.3. Transduction bactérienne 51

I.4. Antibiogramme 52

I.5. Expériences in vivo 53

I.5.1. Infection expérimentale des souris 53

I.5.2. Préparation du sérum polyclonal anti-BamB 55

II. Biologie moléculaire **55**

II.1. Extraction d'ADN 55

II.1.1. ADN chromosomique 55

II.1.2. ADN plasmidique 55

II.2. Quantification d'ADN 56

II.3. Restriction enzymatique 56

II.4. Ligation 56

II.5. PCR 56

II.5.1. Milieu de réaction et programme 56

II.5.2. Amorces utilisées 57

II.6. Purification d'ADN à partir d'un gel d'agarose et purification d'amplicons et de produits de digestion 57

II.7. Séquençage 58

II.8. Mutagénèse par délétion 58

II.9. Electrophorèse en gel d'agarose 59

III. Biochimie **59**

III.1. Co-immunoprécipitation 59

III.2. Extraction de protéines en condition d'expression du T3SS-1 60

III.2.1. Protéines secrétées 60

III.2.2. Protéines du culot bactérien 61

III.3. Extraction des protéines membranaires totales 61

III.4. Fractionnement cellulaire 62

III.5. Purification protéique en conditions natives 62

III.6. Electrophorèse SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate

polyacrylamide gel electrophoresis) 63
III.6.1. Electrophorèse monodimensionnelle 63
III.6.2. Electrophorèse bidimensionnelle 64
III.7. Coloration de gel SDS-PAGE 64
III.7.1. Bleu de Coomassie 64
III.7.2. Nitrate d'argent 64
III.8. Western-blot 65
III.9. Test de phosphorylation 66
RESULTATS **68**
***I. Impact des substitutions d'acides aminés dans la protéine BamB sur ses différents rôles chez* Salmonella** **69**
I.1. Impact sur l'interaction BamA/BamB 70
I.2. Impact sur la perméabilité membranaire 71
I.3. Impact sur l'assemblage des protéines de membrane externe 72
I.4. Impact sur le contrôle de l'expression des gènes des T3SS 73
I.5. Impact sur la virulence de Salmonella 75
II. Recherche d'un rôle cytoplasmique de BamB chez Salmonella **77**
II.1. Impact de la séquestration cytoplasmique de BamB sur la perméabilité membranaire de S. *Enteritidis* 77
II.2. Impact de la séquestration cytoplasmique de BamB sur l'expression et la fonctionnalité du T3SS-1 et l'expression des protéines flagellaires de S. *Enteritidis* 79
II.3. Localisation de BamB sans son peptide signal chez S. *Enteritidis* 80
***III. Recherche d'une activité kinase de BamB de* Salmonella** **82**
III.1. BamB est-elle capable de s'autophosphoryler? 82
III.2. Implication du résidu K82 de BamB dans la perméabilité membranaire, l'expression flagellaire et la fonctionnalité du T3SS-1 chez S. *Enteritidis* 84
IV. Autres expériences **85**
DISCUSSION **88**
Bibliographie **97**
Publications et communications scientifiques 114

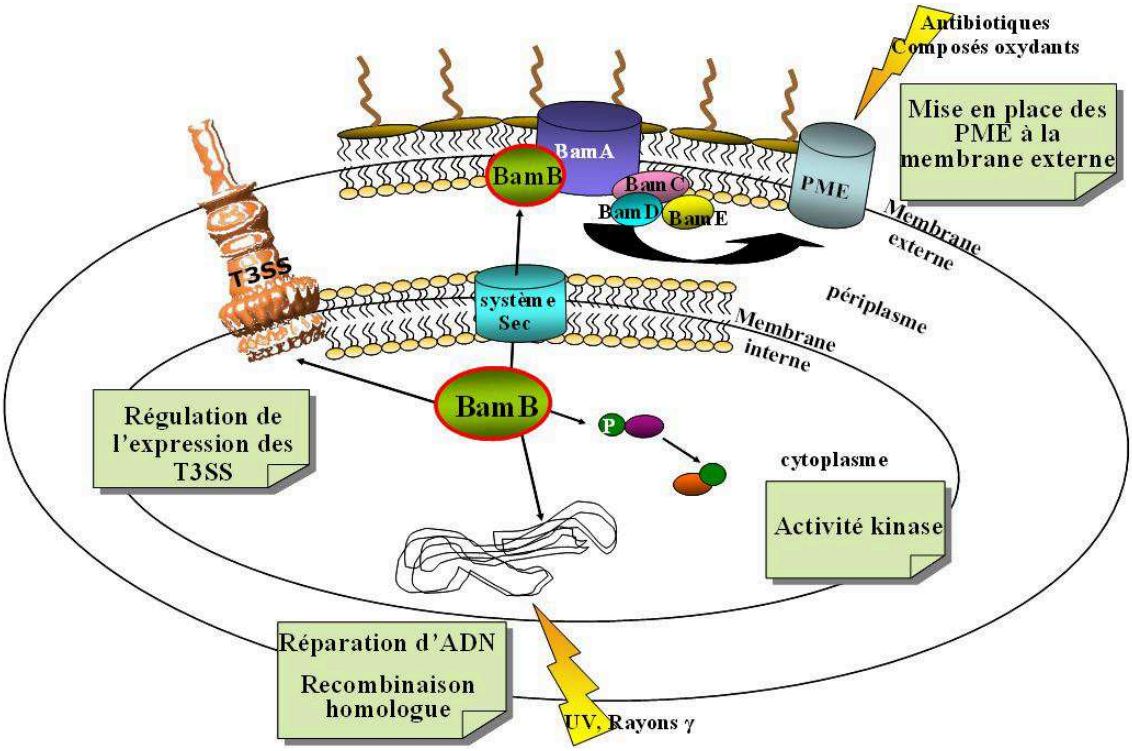


Figure 1. Les différents rôles de BamB décrits à ce jour dans la littérature.

BamB interagit avec BamA au sein du complexe BAM et intervient dans la mise en place des PME (Kim *et al.*, 2007; Vuong *et al.*, 2008). Elle présente également une activité kinase pouvant être liée aux systèmes de réparation d'ADN et de recombinaison homologue chez *E. coli* (Khairnar *et al.*, 2007). Chez *S.* Enteritidis, elle contrôle positivement l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des T3SS (Fardini *et al.*, 2009).

Objectifs

Les entérobactéries du genre *Salmonella* sont responsables chez l'homme, de pathologies telles que la gastro-entérite et la fièvre typhoïde qui sont provoquées suite à une ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. En raison d'une émergence de souches de plus en plus résistantes aux antibiotiques, il devient aujourd'hui indispensable de trouver des alternatives à l'antibiothérapie afin de mettre fin à ce problème majeur de santé publique.

Le complexe BAM est situé à la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il est composé de la protéine essentielle BamA et des lipoprotéines BamB, BamC, BamD et BamE. Ce complexe a été décrit comme étant impliqué dans la biogénèse des protéines de membrane externe (PME). Au sein de ce complexe, il a été montré chez *E. coli* et *Salmonella* que la lipoprotéine BamB est impliquée dans l'assemblage des PME à la membrane externe et la perméabilité membranaire aux antibiotiques. Par ailleurs, BamB présente une activité sérine-thréonine kinase et est impliquée dans les systèmes de réparation de l'ADN et de recombinaison homologue chez *E. coli* (Figure 1). De plus, BamB est impliquée dans la virulence de *Salmonella* et un mutant Δ*bamB* présente une diminution de transcription des gènes impliqués dans la biogénèse des 3 appareils de sécrétion de type III de *Salmonella* qui jouent un rôle essentiel dans la virulence de cette bactérie. En conséquence, le mutant Δ*bamB* est altéré dans son interaction avec les cellules eucaryotes. Compte tenu de la localisation membranaire de la protéine et de l'ensemble des rôles décrits pour cette protéine en lien avec la virulence et avec des fonctions essentielles à la bactérie que sont la biogenèse de la membrane, la recombinaison homologue et la réparation de l'ADN, BamB peut être considérée comme une cible thérapeutique.

Avant mon arrivée au laboratoire, certains éléments suggéraient que la protéine BamB puisse être fonctionnelle en dehors du complexe BAM. En effet, les travaux de Vuong *et al.* ont montré que chez *E. coli,* le variant BamB D229A n'interagit plus avec BamA mais que cette absence d'interaction n'empêchait pas la protéine BamB D229A de restaurer, chez le mutant Δ*bamB,* son défaut de perméabilité à la vancomycine et de synthèse de la PME LamB (Vuong *et al.*, 2008). De plus, l'activité kinase de BamB décrite chez *E. coli* laissait penser que BamB pourrait avoir une activité cytoplasmique (Khairnar *et al.*, 2007). Dans le cadre de ma thèse et afin de mieux caractériser le rôle de BamB, nous avons souhaité étudier l'impact de l'altération de l'interaction de BamB avec le complexe BAM ou de sa séquestration dans le cytoplasme sur l'ensemble des rôles décrits de BamB et nous avons également étudié l'activité kinase de BamB chez *Salmonella*.

INTRODUCTION

I. Salmonella *et les salmonelloses*

I.1. Caractéristiques de Salmonella

I.1.1 Taxonomie

Les salmonelles sont des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* et du genre *Salmonella*, nom qui honore le médecin vétérinaire Daniel Elmer Salmon même si, en réalité, c'est Théobald Smith qui travaillant sous sa direction, découvrit ce genre bactérien en 1885. Des techniques d'hybridation ADN-ADN ont permis de distinguer deux espèces parmi le genre *Salmonella* : *S. enterica* et *S. bongori* (Popoff *et al.*, 2004; Reeves *et al.*, 1989) *S. enterica* est elle-même divisée en six sous-espèces : *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *salamae*, *indica* et *houtenae* (Tindall *et al.*, 2005). Parmi chaque sous-espèce, on distingue des sérotypes qui se différencient par leur composition en antigènes somatiques O, flagellaires H et capsulaires (Vi). La classification de ces compositions en antigènes O et H porte le nom de Kauffmann-White. Actuellement, on compte 2610 sérotypes de *Salmonella* : Enteritidis, Typhi, Paratyphi, Hadar, Dublin, Infantis, Gallinarum, Senftenberg, *etc*… (Guibourdenche *et al.*, 2010). Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit, les sérotypes seront notés sous forme contractée (ex : *S.* Enteritidis pour *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sérotype Enteritidis).

I.1.2. Caractéristiques antigéniques et biochimiques

Les salmonelles sont des bacilles à Gram négatif de 2 à 3 µm de longueur et de 0,6 à 0,8 µm de large, capables généralement de mobilité grâce à une ciliature péritriche (sauf par exemple pour *S.* Gallinarum qui ne possède pas de flagelle). Ces bactéries sont aérobie-anaérobies facultatives et la plupart sont capables de croître sur milieu minimum. Elles peuvent se développer à des températures allant de 5 à 47°C et à des pH allant de 4,5 à 9 même si leur température optimale de croissance est de 37°C et leur pH optimal de croissance est neutre. Les salmonelles possèdent une nitrate réductase, sont oxydase négative et sont capables de fermenter le glucose.

I.1.3. Habitât et spectre d'hôtes

Les salmonelles peuvent être isolées de l'intestin de nombreuses espèces animales et peuvent disséminer dans l'environnement essentiellement par des contaminations fécales. Les salmonelles ont la capacité de survivre pendant de très longues périodes pouvant aller jusqu'à 9 mois dans le milieu extérieur (sols, boues, bois). *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* est généralement un pathogène isolé chez l'homme et les animaux à sang chaud. En revanche, les *Salmonella enterica* sous-espèces *salamae*, *arizonae* ou *diarizonae* peuvent faire partie de la flore commensale intestinale d'animaux à sang froid. La majorité des sérotypes de salmonelles sont ubiquistes (ex : *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *etc*…) ; néanmoins, il existe des sérotypes présentant des spécificités d'hôte. Ainsi, *S.* Typhi et *S.* Paratyphi sont strictement adaptés à l'homme, *S.* Abortusovis aux ovins, *S.* Abortusequi aux chevaux, *S.* Typhisuis aux porcs, *S.* Gallinarum aux volailles, *etc*... De plus, *Salmonella* est également capable d'infecter les végétaux en adhérant aux feuilles et également en rentrant dans l'apoplaste (Schikora *et al.*, 2011). Cela peut survenir à l'issue d'une irrigation par de l'eau contaminée ou par contact avec du fumier contaminé. Bien que la surface des feuilles ne soient pas un milieu favorable au développement des salmonelles, d'autres parties protégées de la plante peuvent constituer un milieu adéquat (Beuchat *et al.*, 2006).

I.2. Les salmonelloses animales

I.2.1 Le portage asymptomatique

Le portage asymptomatique est un phénomène pouvant survenir suite à une primo-infection et se traduisant par une excrétion de ces bactéries dans les fèces. Il s'agit, comme son nom l'indique, d'une infection sans symptôme. Pour les sérotypes de *Salmonella* adaptés à l'homme, une persistance peut être observée dans la vésicule biliaire. Chez les animaux, et notamment chez les volailles, le portage asymptomatique observé dans les élevages est dû à la persistance des salmonelles dans l'intestin. Cette persistance aboutit à une excrétion fécale pouvant contaminer les congénères et conduire à l'élimination des animaux ainsi qu'à la destruction de tous leurs produits dérivés, entraînant ainsi des pertes économiques importantes. A ce jour, les mécanismes expliquant le portage asymptomatique demeurent peu connus. Chez la volaille, la persistance se met en place dans les caeca après une phase d'infection systémique transitoire de 2 à 3 semaines de la rate et du foie. De plus, la notion

d'animaux super-excréteurs responsables de la colonisation des hôtes a été mise en évidence (Gopinath *et al.,* 2012).

Afin d'éluder le problème économique que constitue le portage asymptomatique, des études génétiques sont effectuées dans le but de sélectionner des lignées résistantes au portage à *Salmonella* chez le poulet (Calenge *et al.*, 2010). De plus, afin d'immuniser la volaille, des vaccins tués ou vivants et atténués ont été développés (Callaway *et al.*, 2008; Doyle et Erickson, 2006).

Par ailleurs, le développement de probiotiques (par exemple, *Lactobacillus casei*) permet d'inhiber la colonisation par *Salmonella* et de stimuler la réponse immunitaire innée chez la souris (Castillo *et al.*, 2011).

I.2.2. Les gastro-entérites

Etant donné qu'un large spectre d'animaux peut être porteur de *Salmonella*, de nombreux produits alimentaires peuvent être à l'origine d'une contamination humaine (notamment la volaille, les œufs, les produits laitiers, la viande porcine, *etc*…). Ainsi, chaque année, dans le monde, les salmonelles non typhiques sont responsables de 1,3 milliards de cas de gastroentérite chez l'homme, entraînant 3 millions de morts (http://www.phac-aspc.gc.ca). En Europe, les salmonelles constituent la deuxième plus importante cause de gastroentérite juste après *Campylobacter* et les sérotypes les plus fréquemment isolés lors de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) sont *S.* Enteritidis et *S.* Typhimurium. Cependant, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) décrit une diminution de près de la moitié des cas de salmonelloses humaines entre 2004 et 2010 et cette tendance devrait continuer pour les 6 prochaines années en Europe. Notons qu'en 2010, au total, 99020 cas on été rapportés dans l'Union Européenne (Anonymous, 2012).

En revanche, on assiste dans certains pays, à une émergence de certains sérotypes tels que *S.* Kentucky, *S.* Muenchen, *S.* Montevideo, *S.* Infantis et *S.* Virchow (Anonymous, 2012).

Les symptômes d'une gastro-entérite provoquée par les salmonelles sont les suivants : La durée d'incubation est d'environ 2 jours mais varie en fonction de la dose bactérienne ingérée et également du système immunitaire du l'hôte. On assiste à la mise en place d'une fièvre qui accompagne une diarrhée, des douleurs abdominales et des vomissements. Les symptômes disparaissent spontanément après 3 à 5 jours environ en cas de condition physique normale.

Dans un premier temps, le patient est traité par une importante réhydratation. Si les symptômes persistent, et notamment dans le cas des nourrissons, des personnes âgées et des

personnes immuno-déprimées, un traitement antibiotique est nécessaire, sinon, l'infection peut devenir sévère et parfois même s'avérer mortelle. Malheureusement, et comme il a été relaté lors du dernier congrès européen « European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases » (ECCMID), de nombreuses souches de *Salmonella* sont devenues multi-résistantes aux antibiotiques (Rabasseda, 2010).

La meilleure prévention contre le risque de salmonellose est de suivre les mesures d'hygiène qui consistent à : respecter la chaîne du froid lors du stockage des aliments, à conserver les œufs et les aliments à base d'œufs au froid et à les consommer le plus rapidement possible après leur fabrication. Il est également important de bien cuire les aliments, les viandes en particulier. Le réfrigérateur doit être nettoyé régulièrement avec de l'eau javellisée. Enfin, il est conseillé de se laver les mains après contact avec un animal (en particulier les reptiles qui sont souvent des porteurs asymptomatiques de salmonelles).

I.2.3. Les infections systémiques ou fièvres typhoïde et paratyphoïde

Les fièvres typhoïde et paratyphoïde peuvent toucher à la fois l'homme et les animaux (on parle alors de fièvres typhoïd-like) et sont généralement dues à des sérotypes adaptés à leur hôte. On peut citer, par exemple, *S.* Gallinarum qui a pour hôte strict les volailles ou *S.* Typhi et *S.* Paratyphi qui infectent uniquement l'homme. La contamination se fait par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. La transmission étant oro-fécale, ces infections ont souvent lieu dans les pays en voie de développement (notamment en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud) où l'hygiène est précaire. Le réservoir des sérotypes *S.* Typhi et *S.* Paratyphi est entretenu par des individus porteurs asymptomatiques ayant guéri d'une fièvre typhoïde préalable et qui excrètent ces bactéries dans leurs selles.

Dans le monde, notamment dans les pays en voie de développement, on compte plus de 20 millions de cas de fièvre typhoïde par an entraînant plus de 200000 morts (www.pasteur.fr). Cependant, la maladie n'a pas disparu des pays développés et elle est à déclaration obligatoire en France, tout comme les gastro-entérites.

Les symptômes de la fièvre typhoïde apparaissent entre une à 3 semaines après la contamination : on assiste alors à une fièvre accompagnée de céphalées, de douleurs abdominales, de vomissements, d'anorexie et d'une grande fatigue (du grec « typhos » signifiant torpeur) avec une diarrhée ou une constipation. Dans les cas bénins, l'état du patient reste constant pendant 2 semaines et la convalescence prend plusieurs semaines. En revanche, dans les cas plus graves, les troubles digestifs deviennent plus intenses

accompagnés d'une splénomégalie et d'une hépatomégalie. Sans traitement, les hémorragies suite aux perforations intestinales conduisent à la mort du malade dans 10% des cas. L'antibiothérapie se heurte de plus en plus au phénomène de multi-résistance des souches de *Salmonella*, notamment aux fluoroquinolones, qui sont utilisées pour le traitement de ces infections (Hendriksen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

La prévention consiste à éliminer la dissémination des bactéries en traitant les eaux usées et à toujours respecter les règles d'hygiène. Il existe un vaccin anti-typhoïdique administré en une unique injection aux personnes se rendant dans les zones à risque.
Ce vaccin protège pour une durée de 3 ans avec un taux de protection en régions endémiques de 60% et il existe également un vaccin vivant atténué dans les pays en voie de développement.

I.3. Le cycle infectieux de Salmonella

Les salmonelles infectent leurs hôtes par voie orale. Elles sont alors rapidement amenées à faire face au pH très acide de l'estomac (Ramos-Morales, 2012). Pour affronter cet environnement hostile, elles sont capables d'activer leurs systèmes de réponse au stress et possèdent également des pompes d'efflux qui vont leur permettre de survivre à cette acidité gastrique et de rejoindre l'intestin (Muller *et al.*, 2009). Au niveau intestinal, *Salmonella* va devoir se protéger de la forte osmolarité de ce milieu. Ses pompes à efflux ainsi que son lipopolysaccharide (LPS) lui permettront de résister à la présence des sels biliaires (Prouty *et al.*, 2004; Ramos-Morales *et al.*, 2003). De plus, lorsque *Salmonella* progresse dans l'intestin, l'environnement devient pauvre en oxygène et une compétition a lieu avec la flore intestinale existante, limitant ainsi la quantité de nutriments disponibles pour *Salmonella*. Au contact des cellules épithéliales, des peptides antimicrobiens sont libérés et *Salmonella* peut, en réponse à cela, modifier le lipide A de son LPS.

Suite à son attachement aux cellules épithéliales, *Salmonella* induit sa propre entrée dans ces cellules ainsi que dans les cellules M et peut également être capturée par les cellules dendritiques infiltrées dans l'épithélium intestinal. Il est important ici de préciser que les salmonelles vont envahir différents types cellulaires en fonction de leurs sérotypes mais aussi de l'hôte qu'elles infectent. Par exemple, *S.* Typhimurium est capable, chez les bovins, de franchir la barrière intestinale par ces 3 voies et induit une gastro-entérite alors que chez la souris, elle passe principalement par les cellules M et induit une infection systémique (Santos *et al.*, 2002).

A l'issue de son internalisation dans les cellules, *Salmonella* est présente dans une vacuole d'endocytose où elle doit survivre et se multiplier. Cette invasion cellulaire va induire une réponse inflammatoire lors de laquelle de nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont libérées et des neutrophiles sont recrutés au site infectieux. On assiste également à la production de PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) par *Salmonella*. Les TLRs (Toll-Like Receptors) qui sont les récepteurs du système immunitaire inné, vont être activés par les PAMP (Gewirtz *et al.*, 2001). La production de molécules chémo-attractantes induit la migration des neutrophiles vers la lumière intestinale (McCormick, 2007). Lors d'une gastro-entérite, les salmonelles sont arrêtées à la barrière intestinale. La migration massive des neutrophiles et la destruction de l'épithélium intestinal se traduisent cliniquement par les symptômes.

Suite à leur survie et leur multiplication dans les phagocytes, les salmonelles atteignent, en passant par la lymphe, les nœuds lymphatiques et peuvent rejoindre la circulation sanguine. Les salmonelles colonisent les organes profonds tels que le foie et la rate et leur multiplication dans ces organes peut entraîner la mort. Il s'agit alors d'une infection systémique. Dans le cas d'une colonisation par *S.* Typhi, si le patient survit à son infection, la vésicule biliaire devient alors le site privilégié d'un portage asymptomatique à cette bactérie (Tischler et McKinney, 2010).

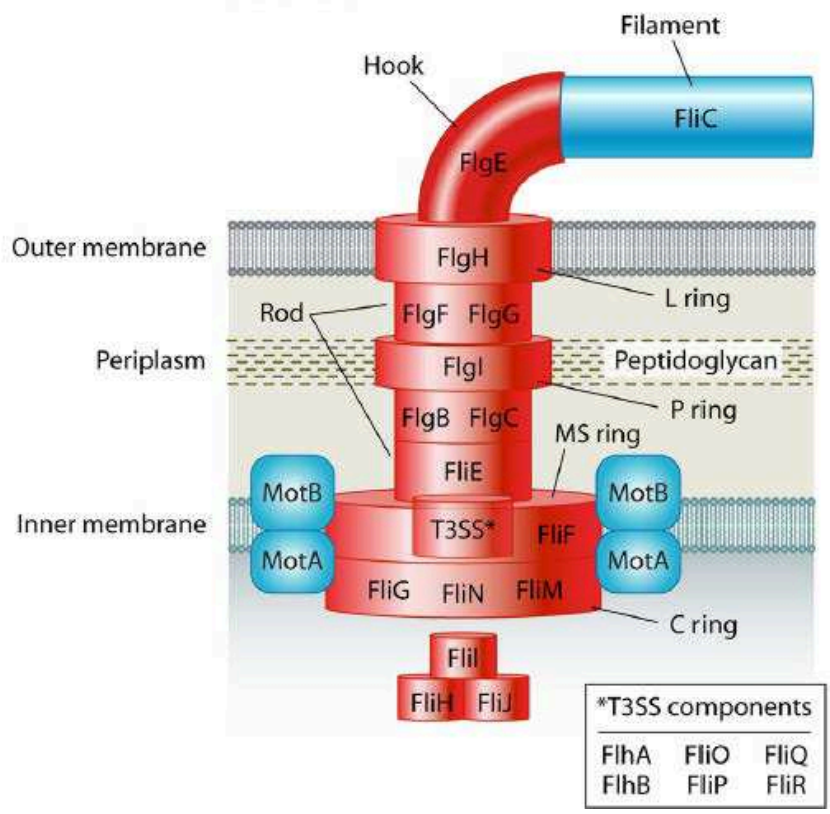


Figure 2. Structure du flagelle de *Salmonella*
(Gilbreath *et al.*, 2011)

L'ATPase cytoplasmique FliI, est chaperonnée par les protéines FliH et FliJ. Dans la membrane interne, le complexe Mot, formé des protéines MotA et MotB, est associé à l'anneau MS (composé de FliF) et à l'anneau C (formé de FliG, FliN et FliM). Dans le périplasme, la tige, formée de FliE, FlgB, FlgC, FlgF et FlgG est présente de part et d'autre du peptidoglycane. Au niveau du peptidoglycane se trouve l'anneau P (formé de FlgI). Dans le feuillet externe de la membrane externe, l'anneau L est formé par FlgH. Enfin, du côté extracellulaire, on retrouve le crochet, composé de FlgE, et le filament flagellaire formé par FliC.

II. Les systèmes de sécrétion de type III chez Salmonella

Afin d'accomplir son cycle infectieux, comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, *Salmonella* utilise ses nombreux facteurs de virulence. Il ne s'agit pas ici de présenter de manière exhaustive les facteurs de virulence que possède *Salmonella* mais plutôt de nous focaliser sur un des facteurs de virulence majeurs que constituent les appareils de sécrétion de type III (T3SS). Les T3SS sont des complexes multi-protéiques permettant à la bactérie d'injecter des effecteurs du cytoplasme bactérien directement vers le cytoplasme de la cellule hôte et de détourner ainsi la signalisation cellulaire de la cellule hôte infectée (Galan et Wolf-Watz, 2006). Ce sont des structures fortement conservées chez de nombreuses bactéries pathogènes (Marlovits et Stebbins, 2010). Les T3SS utilisent, comme source d'énergie, l'ATP, libérée par une ATPase (Zarivach *et al.*, 2007). Parmi les T3SS de *Salmonella*, on compte le T3SS-1, le T3SS-2 et le flagelle qui est considéré comme l'ancêtre des T3SS. Ce dernier n'a pas de fonction de translocation de protéines effectrices mais uniquement de sécrétion du constituant du filament flagellaire, c'est-à-dire la flagelline.

II.1. Le flagelle

II.1.1. La structure du flagelle

Le flagelle prend racine au niveau de la membrane bactérienne et s'étend du côté extracellulaire sur une longueur totale de 10 µm. Il est composé d'une partie passive, d'une partie active et d'un appareil de sécrétion (Macnab, 2004) (Figure 2):

- La partie passive est composée de : l'anneau MS, la tige et des anneaux P et L (cet ensemble tripartite constitue le corps basal), du crochet (structure cylindrique, sur laquelle la flagelline est ancrée) relié au corps basal, des protéines de jonction entre le crochet et le filament, du filament flagellaire lui-même, constitué de flagelline formant une structure hélicoïdale, et enfin, des protéines de coiffe terminant le filament.
- Une partie motrice formée par l'anneau C (permettant la rotation du flagelle dans les 2 sens) et le complexe périphérique Mot.
- Un appareil de sécrétion de type III (composé des protéines FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ et FliR) associé à la partie motrice et localisé au niveau de l'anneau MS. A ce complexe sont associées des protéines périphériques telles que l'ATPase FliI,

fournissant l'énergie au processus d'exportation. Cet appareil permet l'exportation des composants du flagelle comme les protéines du crochet et la flagelline.

II.1.2. La régulation de l'expression des protéines flagellaires

La fine régulation de l'expression des gènes flagellaires se fait de manière séquentielle : on distingue les gènes précoces, intermédiaires et tardifs qui présentent 3 classes de promoteurs différents. Cela permet d'éviter l'expression des structures distales du flagelle (telles que la flagelline) alors que les structures proximales (telles que le corps basal et le crochet) n'ont pas été mises en place (Chilcott et Hughes, 2000). Tout d'abord, l'opéron *flhDC* est transcrit puisqu'il code le régulateur central des gènes flagellaires. La transcription des gènes intermédiaires est alors activée par l'oligoprotéine $FlhD_4C_2$ et le facteur σ^{70} permettant ainsi la synthèse des protéines constituant le corps basal et le crochet puis l'assemblage de ces structures, ainsi que l'expression des régulateurs FlgM (également appelé facteur anti- σ^{28}) et FliA (également appelé facteur σ^{28}) (Saini *et al.*, 2011). Lorsque le crochet est mis en place, le facteur σ^{28} n'est plus séquestrée par FlgM qui est alors sécrétée et FliA peut activer l'expression des gènes tardifs, tels que les gènes codant la flagelline, le complexe Mot, les protéines du chimiotactisme Che. Les travaux de Saini *et al*. soulignent le fait que les régulateurs FlgM et FliA n'interviennent pas uniquement de façon ponctuelle dans l'initiation du processus d'assemblage du flagelle mais agissent de manière continue car ils interviennent dans le contrôle de l'expression des gènes du flagelle en réponse à une accumulation de protéines flagellaires en phase stationnaire de croissance (Saini *et al.*, 2011).

Il est important de préciser que la transcription de l'opéron *flhDC* peut également être soumise à une régulation, puisque sa transcription peut être inhibée par FimZ, le régulateur transcriptionnel positif de l'expression des fimbriae de type I, ou par un autre régulateur transcriptionnel, RtsB (Clegg et Hughes, 2002; Ellermeier et Slauch, 2003).

Par ailleurs, la protéine FliK qui est sécrétée par le crochet, en s'associant avec la protéine FlhB, contrôle l'exportation des protéines par le crochet en fonction de la longueur de ce dernier (Minamino *et al.*, 2009).

II.1.3. Le flagelle et la mobilité de *Salmonella*

Le flagelle a pour principal rôle de permettre à la bactérie de se mouvoir dans l'environnement. De plus, le flagelle est impliqué dans le phénomène de chimiotactisme. En

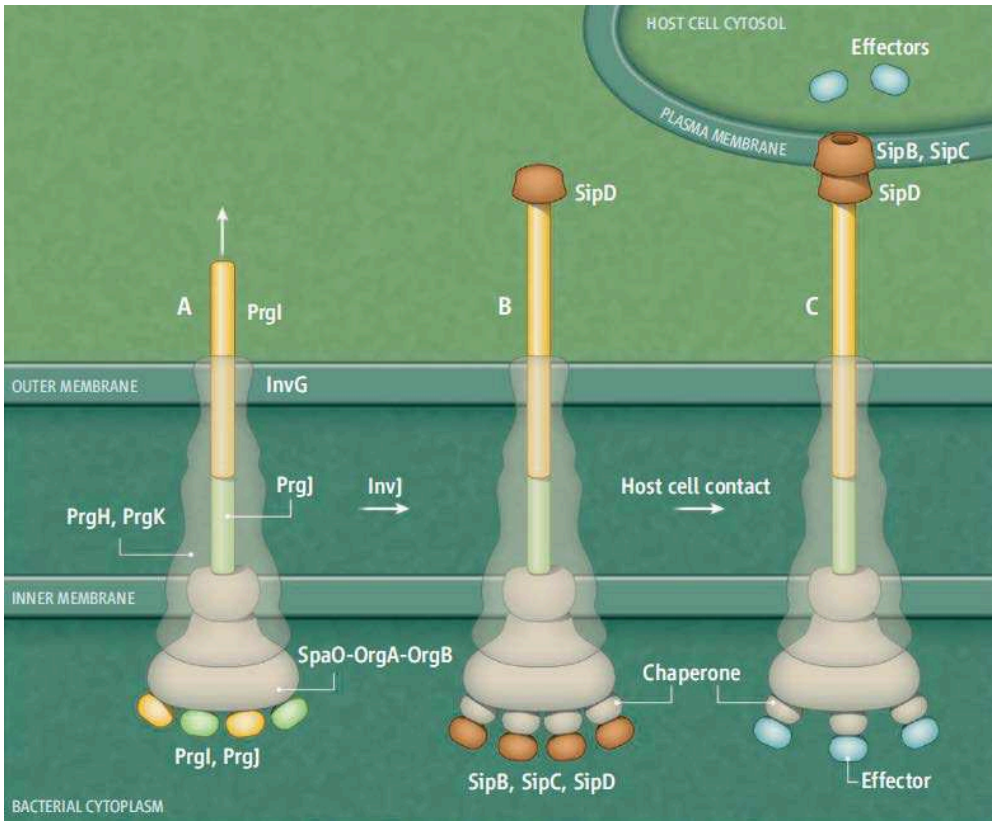


Figure 3. Séquences d'assemblage du T3SS-1 de *Salmonella* suite à la mise en place du corps basal (Stamm et Goldberg, 2011)

A: La sécrétion des composants de l'aiguille PrgJ et PrgI est mise en place avec un contrôle de l'élongation de l'aiguille par InvJ

B: Le T3SS-1 est entièrement assemblé. SipD est à la pointe de l'aiguille et les translocases SipB et SipC associées à leurs chaperonnes sont prêtes à être sécrétées

C: Suite à l'activation du T3SS-1 par contact avec la cellule hôte, les translocases sont sécrétées et insérées dans la membrane plasmique de la cellule eucaryote et les couples effecteurs-chaperonnes peuvent être sécrétés.

effet, une protéine de signalisation CheY phosphorylée peut se fixer sur les protéines flagellaires FliN et FliM, induisant un changement conformationnel de FliG, entraînant un changment du sens de rotation du flagelle. Cela aboutit au changement de la direction de *Salmonella* (Minamino *et al.*, 2011).

Après ingestion, cette capacité à être mobile que lui confère le flagelle va permettre à *Salmonella* d'accélérer sa rencontre avec les cellules intestinales et de jouer un rôle dans l'attachement et l'entrée dans les cellules épithéliales et dans la virulence *in vivo* (Dibb-Fuller *et al.*, 1999; Dibb-Fuller et Woodward, 2000).

II.2. Le T3SS-1

II.2.1. La structure du T3SS-1 de *Salmonella*

Le T3SS-1 est constitué de 3 parties : le corps basal, l'aiguille et un translocon situé à l'extrémité de l'aiguille (Figure 3) :

- Le corps basal, ancrant le T3SS-1 dans les feuillets interne et externe de la membrane bactérienne, est composé des protéines PrgH, PrgK et InvG. Les protéines PrgH et PrgK composent l'anneau interne contenant l'appareil d'exportation (formée des protéines InvA, SpaQ, SpaP, SpaR et SpaS) (Deane *et al.*, 2010) tandis que la protéine InvG forme l'anneau externe (Schraidt et Marlovits, 2011).
- L'aiguille, formée par la protéine PrgJ du côté basal et par PrgI, est fixée sur le corps basal et traverse le périplasme et le feuillet externe de la membrane externe bactérienne. Elle mesure environ 50 nm du côté extracellulaire et sa longueur est contrôlée par la protéine InvJ (Stamm et Goldberg, 2011).
- A l'extrémité de l'aiguille se trouvent les protéines du translocon SipD, SipB et SipC, également connues sous le nom des protéines Ssp, qui permettent de former un pore dans la membrane plasmique de la cellule hôte.

SipD présente un domaine hydrophile et interagit directement avec la protéine de l'aiguille PrgI (Rathinavelan *et al.*, 2011). Les protéines SipB et SipC possèdent un domaine hydrophobe et sont directement impliquées dans la formation du pore au niveau de la membrane plasmique eucaryote, ce qui permettra la translocation des protéines effectrices (Mattei *et al.*, 2011). Une étude a montré l'interaction directe de SipB avec le cholestérol (Hayward *et al.*, 2005).

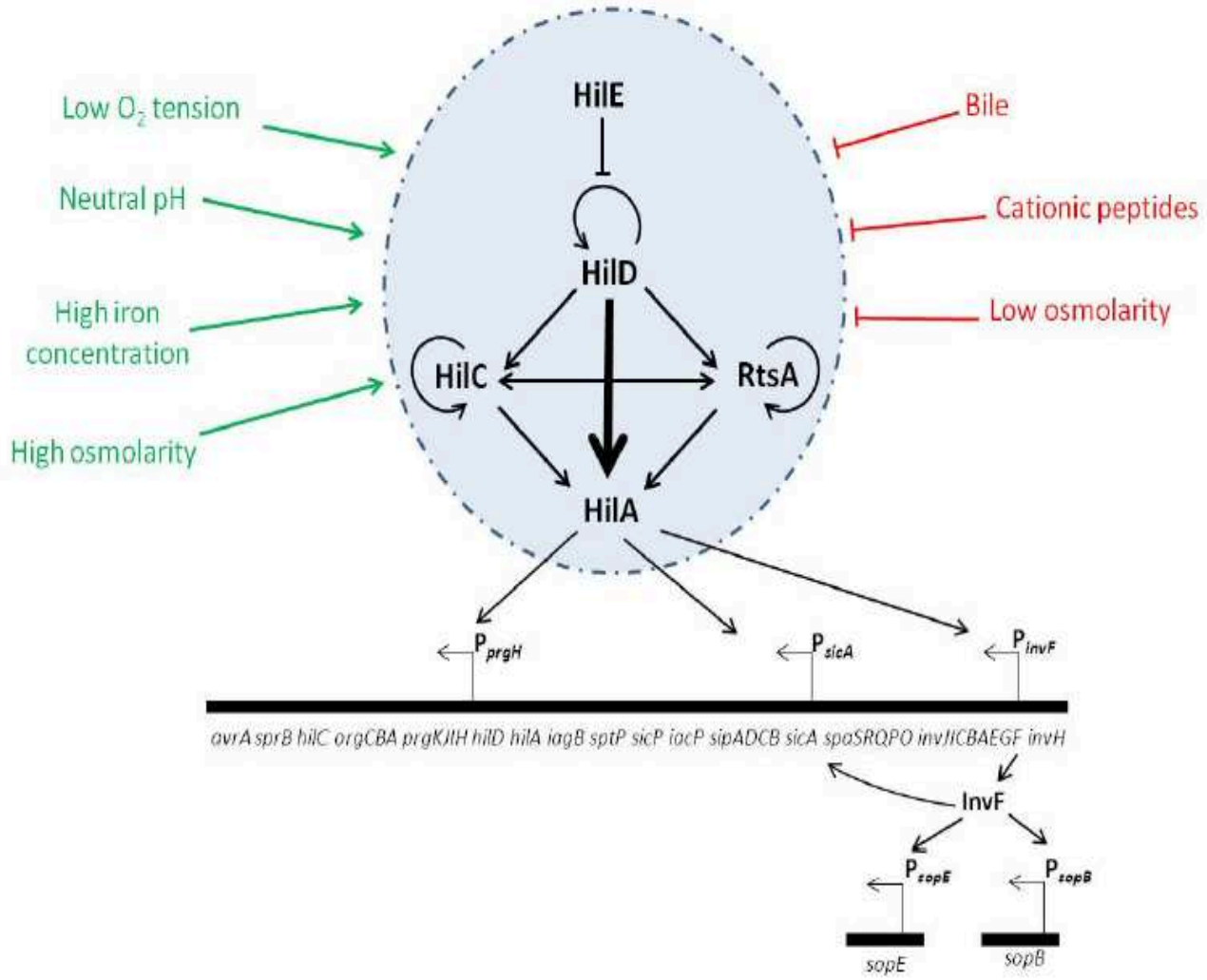


Figure 4. Régulation transcriptionnelle et environnementale des gènes de SPI-1
(Rosselin *et al.*, 2012)

HilA est le régulateur central des gènes impliqués dans la biosynthèse du T3SS-1 et est lui-même régulé par les régulateurs périphériques HilC, HilD, RtsA et HilE.
Lorsque *Salmonella* rejoint l'iléon, les conditions environnementales (représentées en vert) activent l'expression des gènes de SPI-1. En revanche, cette expression est réprimée en présence de bile ou de peptides cationiques.

Il a été récemment mis en évidence qu'une plate-forme, constituée des protéines SpaO, OrgA et OrgB et associée au T3SS-1 sur la face cytoplasmique de la membrane interne, permet de charger les protéines effectrices de manière séquentielle en interagissant avec leurs chaperonnes (Lara-Tejero *et al.*, 2011). Cela permet d'optimiser l'invasion cellulaire en sécrétant les effecteurs selon un ordre précis. Un rôle de l'ATPase du T3SS-1, InvC, a également été décrit dans la reconnaissance des effecteurs associées à leur chaperonne (Akeda et Galan, 2004, 2005).

II.2.2. La régulation de l'expression du T3SS-1

Les gènes codant la plupart des protéines du T3SS-1 se trouvent sur le chromosome de *Salmonella* au niveau de l'îlot de pathogénicité SPI-1 (*Salmonella* Pathogenicity Island 1) qui contient 39 gènes au total, comprenant entre autres, les gènes codant les protéines structurales du T3SS-1 (présents sur les opérons *inv/spa* et *prg*), les protéines du translocon (SipB, SipC et SipD), certains effecteurs (SipA, SptP et AvrA), des chaperonnes (SicA, InvB et SicP) ainsi que des régulateurs transcriptionnels (HilA, HilC, HilD et InvF). Les gènes codant d'autres protéines effectrices (SopA, SopB, SopD, SopE, SopE2, SlrP, SspH1 et SspH2) sont localisés ailleurs sur le chromosome.

La régulation de SPI-1 s'effectue de manière très fine, en réponse aux stimuli environnementaux auxquels est soumise *Salmonella* (Figure 4). HilA est le régulateur transcriptionnel central de cet îlot. Cette protéine active directement la transcription des opérons *inv/spa* et *prg*. HilA est également capable d'induire la transcription du gène *invF*, codant un activateur transcriptionnel ayant notamment pour cibles l'opéron *sip* et les gènes *sopE* et *sopB* (Darwin et Miller, 1999). Il est important de préciser que la transcription des gènes codant les effecteurs des T3SS n'a lieu que si les gènes codant les protéines structurales des T3SS ont préalablement été transcrits. Un second niveau de régulation transcriptionnelle a également lieu à travers la régulation de *hilA* par une boucle de rétro-contrôle impliquant trois régulateurs transcriptionnels : HilC, HilD et RtsA. Chacun de ses régulateurs est capable de lier la région promotrice de *hilA* et également d'activer leur propre transcription. HilC, HilD et RtsA agiraient en levant la répression transcriptionnelle de *hilA* exercée par les protéines H-NS et Hha (Akbar *et al.*, 2003; Queiroz *et al.*, 2011). Il existe d'autres régulateurs de *hilA* agissant, pour la plupart, *via* HilD, parmi lesquels on trouve des systèmes à deux composants qui répondent à des signaux environnementaux tels que des changements de concentration en O_2 ou en fer, de pH et d'osmolarité. Certains de ces systèmes tels que BarA/SirA et

OmpR/EnvZ vont activer l'expression de HilA et d'autres vont, à l'inverse jouer un rôle de répresseur. C'est le cas des systèmes PhoP/PhoQ et PhoB/PhoR qui empêchent l'expression de *hilA via* la protéine HilE qui à son tour, empêche HilD d'être active (Baxter *et al.*, 2003; Baxter et Jones, 2005; Fahlen *et al.*, 2000; Lucas et Lee, 2001).

II.2.3. Le T3SS-1 et l'invasion cellulaire de *Salmonella*

Chez *Salmonella*, le T3SS-1 joue un rôle de facteur d'entrée dans la cellule hôte mais il est également impliqué dans l'induction d'une réponse inflammatoire entraînant la destruction des macrophages contenant les salmonelles, soit par production de cytokines pro-inflammatoires (Hoffmann *et al.*, 2010), soit par une induction d'apoptose (Bernal-Bayard et Ramos-Morales, 2009). Nous ne décrirons ici que son rôle principal dans l'invasion cellulaire de l'hôte.

L'entrée de *Salmonella* se caractérise par une modulation du cytosquelette d'actine et du trafic vésiculaire de la cellule hôte. Ces phénomènes vont conduire à la formation de larges ondulations membranaires de la cellule eucaryote, permettant l'internalisation de *Salmonella*. La cellule eucaryote retrouve ensuite son état initial. Ce phénomène est dépendant de la sécrétion par le T3SS-1 de *Salmonella*, d'une vingtaine d'effecteurs. Cinq d'entre eux jouent un rôle majeur dans l'internalisation de *Salmonella* ; il s'agit de SipA, SipC, SopB, SopE et SopD. En interagissant avec l'actine, SipC induit la nucléation et la polymérisation d'actine au niveau de la membrane plasmique eucaryote. La nucléation de l'actine est renforcée par l'action de SipA, qui empêche la dépolymérisation des filaments d'actine. Puis, SipC, en interagissant avec un composant des vésicules d'exocytose, Exo70, va médier, au point d'entrée, la fusion des vésicules d'exocytose avec la membrane plasmique, et ce, grâce à l'activation de la GTPase RalA par SopE et SopB (Nichols et Casanova, 2010). L'ensemble de ces phénomènes va permettre l'apport de membrane intracellulaire au niveau de la membrane plasmique, ce qui est nécessaire à la formation des larges ondulations membranaires qui sont requises pour l'internalisation de *Salmonella*. Ainsi, SopE et son paralogue SopE2, aidés de l'effecteur SopB, vont également activer les GTPases Rac-1 et Cdc42 qui sont impliquées dans la formation des ondulations membranaires conduisant à l'internalisation de la bactérie (Friebel *et al.*, 2001; Patel et Galan, 2006). *Salmonella* se retrouve alors dans la cellule hôte, à l'intérieur d'une vacuole d'endocytose correctement refermée *via* l'activité phosphoinositide phosphatase de l'effecteur SopB aidé de l'effecteur SopD (Bakowski *et al.*, 2010). Cette vacuole est nommée SCV (pour *Salmonella* Containing

Vacuole). Suite à l'entrée de *Salmonella* dans la SCV, l'effecteur SptP est sécrété par le T3SS-1. Cette protéine mime l'activité des protéines GAP (GTPase-activating Proteins) en désactivant les Rho GTPases Rac-1 et Cdc42, ce qui restaure l'état initial de la membrane cellulaire eucaryote (Humphreys *et al.*, 2009).

II.2.4. Suite à l'entrée médiée par le T3SS-1

SopB va intervenir à nouveau, cette fois en réduisant le nombre de lipides chargés négativement à la surface de la SCV, permettant ainsi le recrutement de marqueurs endosomaux précoces tels que Rab5 et EEA1 (Bakowski *et al.*, 2010). Ces marqueurs sont ensuite remplacés par des marqueurs endosomaux tardifs tels que Rab7 et LAMP1. On assiste alors à l'acidification du lumen de la SCV, condition nécessaire à la survie et la multiplication intracellulaire de *Salmonella* dans les macrophages (Rathman *et al.*, 1996). De plus, Rab7 va interagir avec la protéine eucaryote RILP, une protéine qui permet la liaison aux microtubules *via* le moteur moléculaire qu'est la dynéine, induisant ainsi la migration de la SCV vers le Centre d'Organisation des Microtubules (COMT) (Guignot *et al.*, 2004). Environ deux heures après l'infection de macrophages, la SCV se retrouve près de l'appareil de Golgi. SipA, en stabilisant les filaments d'actine autour de la SCV va permettre à celle-ci de se maintenir à proximité de l'appareil de Golgi (Brawn *et al.*, 2007). Cette localisation de la SCV près de l'appareil de Golgi permet à *Salmonella* de croître et de se multiplier.

II.2.5. Le rôle *in vivo* du T3SS-1

Chez la souris, de nombreuses études ont rapporté l'importance de l'îlot de pathogénicité SPI-1 dans la colonisation gastro-intestinale après inoculation par voie orale et son absence d'implication dans la phase systémique de l'infection par *S.* Enteritidis et *S.* Typhimurium est visible après inoculation par voie intraveineuse ou intrapéritonéale (Altier, 2005; Karasova *et al.*, 2010; Murray et Lee, 2000). De plus, il a été montré que l'absence de SPI-1 entraîne uniquement un retard de l'infection systémique par *S.* Enteritidis au niveau du foie et de la rate de poulets d'une semaine inoculés par voie orale, indiquant que le T3SS-1 peut faciliter l'infection mais qu'il n'est pas essentiel à l'invasion ni à la propagation des salmonelles dans les organes profonds chez cet hôte (Desin *et al.*, 2009). Par ailleurs, un mutant *spaS* ou ΔSPI-1 de *S.* Typhimurium qui présentent un T3SS-1 défectueux sont atténués à la fois dans la

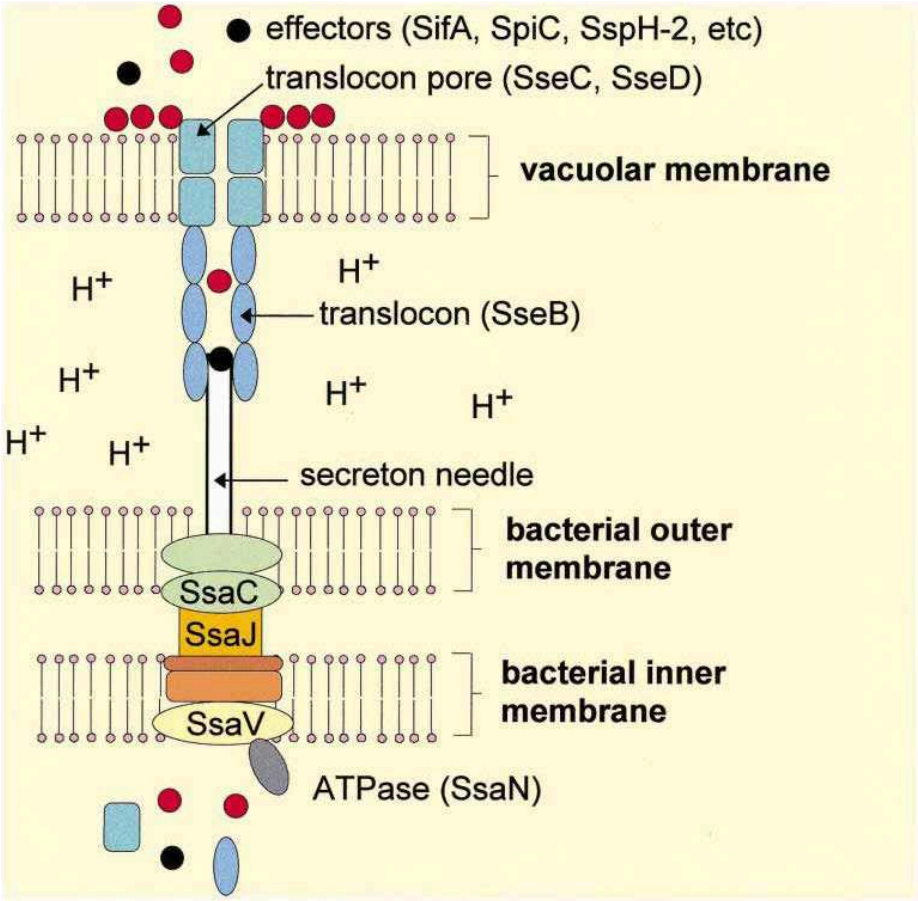


Figure 5. Modèle de structure du T3SS-2 de *Salmonella*
(Holden, 2002)

colonisation gastro-intestinale et dans la phase systémique de l'infection chez le poulet (Dieye *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2007).

Cependant, d'autres données présentes dans la littérature indiquent que le rôle *in vivo* du T3SS-1 est controversé. En effet, une étude d'infection des bovins *via* un modèle d'anses iléales ligaturées a montré qu'un mutant de délétion Δ*SPI-1* de *S.* Typhimurium pouvait induire une pathologie identique à celle induite par la souche sauvage (Coombes *et al.*, 2005). Enfin, des cas cliniques humains ont permis d'isoler des souches *S.* Senftenberg ne possédant pas l'îlot SPI-1, suggérant que le T3SS-1 n'est pas indispensable à *Salmonella* pour induire une gastroentérite (Hu *et al.*, 2008).

II.3. Le T3SS-2

II.3.1. La structure du T3SS-2 de *Salmonella*

Le T3SS-2 présente une structure similaire au T3SS-1 (Figure 5). Par homologie, le corps basal serait constitué des protéines SsaV, SsaJ et SsaC qui sont insérées dans la membrane interne, le périplasme et la membrane externe, respectivement. SsaN est l'ATPase fournissant l'énergie au système. L'aiguille, quant à elle est formée des protéines SsaG, SsaH et SsaI. A la pointe de l'aiguille se trouve la protéine SseB qui assure la jonction entre l'aiguille et le translocon. Enfin, le translocon serait constitué des protéines SseC et SseD (Holden, 2002). Une plateforme composée des protéines SpiC, en complexe avec SsaM et SsaL, jouerait un rôle dans la mise en place du translocon SseB, SseC et SseD et dans la sécrétion des effecteurs (Yu *et al.*, 2010).

II.3.2. La régulation de l'expression du T3SS-2

Les gènes codant la plupart des protéines du T3SS-2 se trouvent sur le chromosome de *Salmonella* au niveau de l'îlot de pathogénicité SPI-2. Le régulateur transcriptionnel central des gènes du T3SS-2 est le système à deux composants SsrA/SsrB qui régule positivement les gènes du T3SS-2 (Worley *et al.*, 2000). En effet, SsrB, le régulateur transcriptionnel de ce système à deux composants peut se lier à de nombreux promoteurs tels que ceux de l'opéron *ssrA-ssrB* et des gènes *ssaB, ssaG, ssaM, sseA, sifA* et *sifB* et peut donc moduler les différentes étapes d'intervention du T3SS-2 (Walthers *et al.*, 2007). En phase exponentielle de

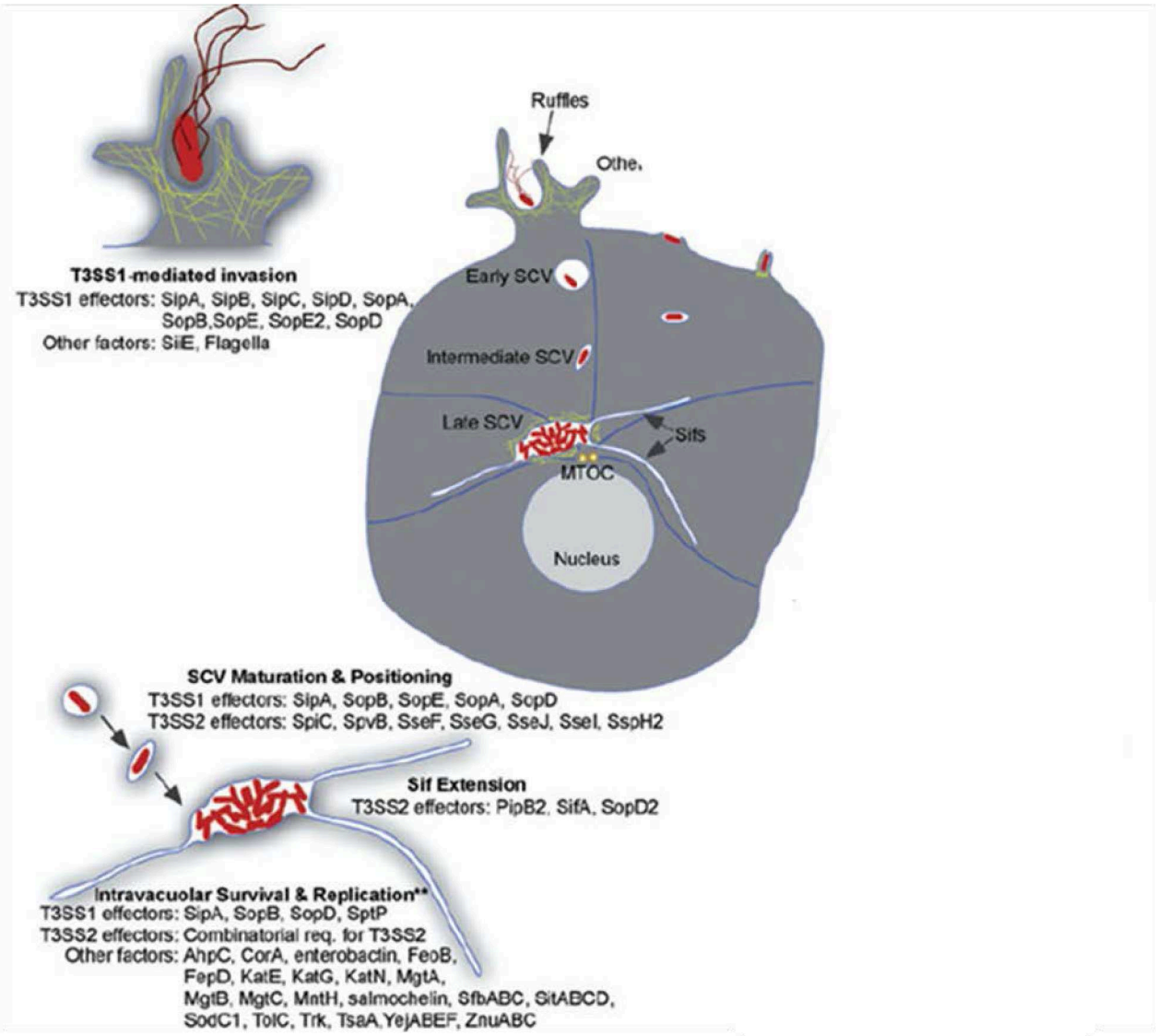


Figure 6. Modèle de la vie intracellulaire de *Salmonella* dépendante du T3SS-2
d'après (Ibarra et Steele-Mortimer, 2009)

Suite à son invasion dans une cellule phagocytaire ou non phagocytaire, *Salmonella* se retrouve dans un phagosome modifié : la SCV. Grâce aux effecteurs du T3SS-1 et du T3SS-2 et aux interactions de la SCV avec les microtubules, la SCV va pouvoir se déplacer à proximité du COMT qui correspond au site de nucléation des microtubules dans la cellule eucaryote. La survie et la mutiplication intracellulaire de *Salmonella* dépendront de nombreux facteurs (listés dans ce schéma) d'acquisition de nutriments et d'échappement à la signalisation cellulaire de l'hôte.
Les filaments jaunes représentent le réseau d'actine. Les traits bleus correspondent aux microtubules et les prolongements blancs de la SCV correspondent aux Sifs.
SCV : *Salmonella* Containing Vacuole ; COMT : Centre Organisateur des Microtubules.

croissance, à pH légèrement acide ou bien en phase stationnaire, à faible concentration en ions bivalents, la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse du T3SS-2 est activée par ce système à deux composants (Lober *et al.*, 2006). Ces conditions correspondent aux conditions environnementales rencontrées par *Salmonella* dans la vacuole d'endocytose.

La transcription de l'opéron *ssrA-ssrB* peut être à son tour activée par l'action du système à deux composants OmpR/EnvZ en milieu intracellulaire (Worley *et al.*, 2000).

Une étude a montré que lorsque *Salmonella* réside dans le macrophage, le système PhoP/PhoQ permet également l'expression de *ssrB* (Bijlsma et Groisman, 2005). Par ailleurs, le régulateur SlyA, en se liant à la région promotrice de *ssrA*, active la transcription des gènes de SPI-2 tels que *sseB, sopD2, pipB2* ainsi que d'autres gènes impliqués dans la résistance aux peptides antimicrobiens (Linehan *et al.*, 2005; Navarre *et al.*, 2005).

Il est intéressant de noter qu'un même système à deux composants peut réguler l'expression du T3SS-1 et du T3SS-2 ; c'est le cas du système OmpR/EnvZ (Lucas et Lee, 2001).

Il est faux de penser que les gènes du T3SS-2 ne sont exprimés qu'au niveau intracellulaire, puisque dans le lumen de l'iléon, la transcription de ces gènes est activée grâce aux régulateurs OmpR et Fis (Osborne et Coombes, 2011). *Salmonella* se prépare donc à affronter l'environnement du phagosome macrophagique avant même d'y pénétrer.

II.3.3. Le T3SS-2 et la survie et multiplication intracellulaire de *Salmonella*

Le T3SS-2 présente différents rôles : celui de permettre à *Salmonella* de survivre et de se multiplier dans les cellules hôtes lorsque la bactérie est dans la vacuole d'endocytose, il s'agit de son rôle majeur que nous décrirons ici (Figure 6), mais également, celui de cytotoxicité à l'encontre des macrophages. Ainsi, l'effecteur SpvB est capable d'induire la dépolymérisation de l'actine et d'activer la caspase-3, aboutissant à la destruction du macrophage (Browne *et al.*, 2008).

Le premier effecteur du T3SS-2 qui intervient est SpiC. Des travaux montrent qu'en interagissant avec les protéines du trafic vésiculaire TassC et Hook3, SpiC permettrait d'inhiber la fusion de la SCV avec le phagosome (Lee *et al.*, 2002; Shotland *et al.*, 2003); d'autres travaux montrent, à l'inverse, que la SCV fusionne avec les lysosomes et que la survie des salmonelles dépend de leur capacité à résister à cette fusion et non de leur capacité à y échapper (Carrol *et al.*, 1979; Drecktrah *et al.*, 2007).

Lorsque la SCV se retrouve près du COMT, cette position est maintenue par la sécrétion de 4 effecteurs du T3SS-2 : SseF, SseG, PipB2 et SifA (Bakowski *et al.*, 2008). *Salmonella* étend alors des ramifications à partir de la SCV : les Sifs (S*almonella* induced filament) qui pourraient lui servir à capter les nutriments nécessaires à sa division. Pour cela, elle requiert la présence d'au moins 5 effecteurs du T3SS-2 SifA, PipB2, SseF, SseG et SopD2 qui vont interagir avec les kinésines, la protéine eucaryote SKIP (SifA and Kinesin Interacting Protein) et les microtubules. Pour croître, les Sifs vont détourner différents réseaux au sein de la cellule eucaryote. Certains Sifs vont uniquement détourner le trafic *trans*-Golgien tandis que d'autres vont détourner en plus les vésicules d'endocytose (Mota *et al.*, 2009; Schroeder *et al.*, 2010). PipB2 serait l'effecteur impliqué dans le recrutement des kinésines inactives et SifA permettrait le recrutement de la protéine SKIP. Cette dernière interagirait alors avec les kinésines pour les activer. Les kinésines diviseraient alors les vésicules le long des microtubules (Schroeder *et al.*, 2010). D'autres effecteurs du T3SS-2 peuvent également jouer un rôle dans la survie et la multiplication intracellulaire de *Salmonella* : ainsi, SspH2, SseI et SteC interviennent dans le réarrangement des réseaux d'actine (Miao *et al.*, 2003; Poh *et al.*, 2008). Il a été montré récemment qu'à environ 24 heures post-infection, la diminution de la concentration des effecteurs du T3SS-1 SipA et SopB, ainsi que l'augmentation de celle des effecteurs du T3SS-2 SifA et PipB2 permettrait à la SCV de s'éloigner de sa position centrale pour se déplacer vers la périphérie de la cellule hôte afin de permettre à la bactérie d'infecter les cellules adjacentes (Szeto *et al.*, 2009). Par ailleurs, une autre récente étude montre que les salmonelles sont capables de sortir de la SCV et de se multiplier dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cette multiplication est indépendante du T3SS-2 (Malik-Kale *et al.*, 2012).

II.3.4. Le rôle *in vivo* du T3SS-2

Dans de nombreuses études, l'îlot de pathogénicité SPI-2 a été décrit comme étant essentiel à l'infection systémique et l'induction de la pathologie par *Salmonella* que ce soit en modèle murin ou aviaire (Fierer *et al.*, 2012; Karasova *et al.*, 2010; Wisner *et al.*, 2010). Bohez *et al.* ont montré que le gène *ssrA* codant le principal régulateur transcriptionnel de SPI-2 est impliqué dans la colonisation de l'appareil reproducteur des poules par *S.* Enteritidis mais ne semble pas requis pour la colonisation intestinale (Bohez *et al.*, 2008). Par ailleurs, une autre étude souligne l'importance à la fois de SPI-1 et de SPI-2 dans la colonisation systémique du foie et de la rate chez les poulets infectés par *S.* Enteritidis par voie orale (Rychlik *et al.*, 2009).

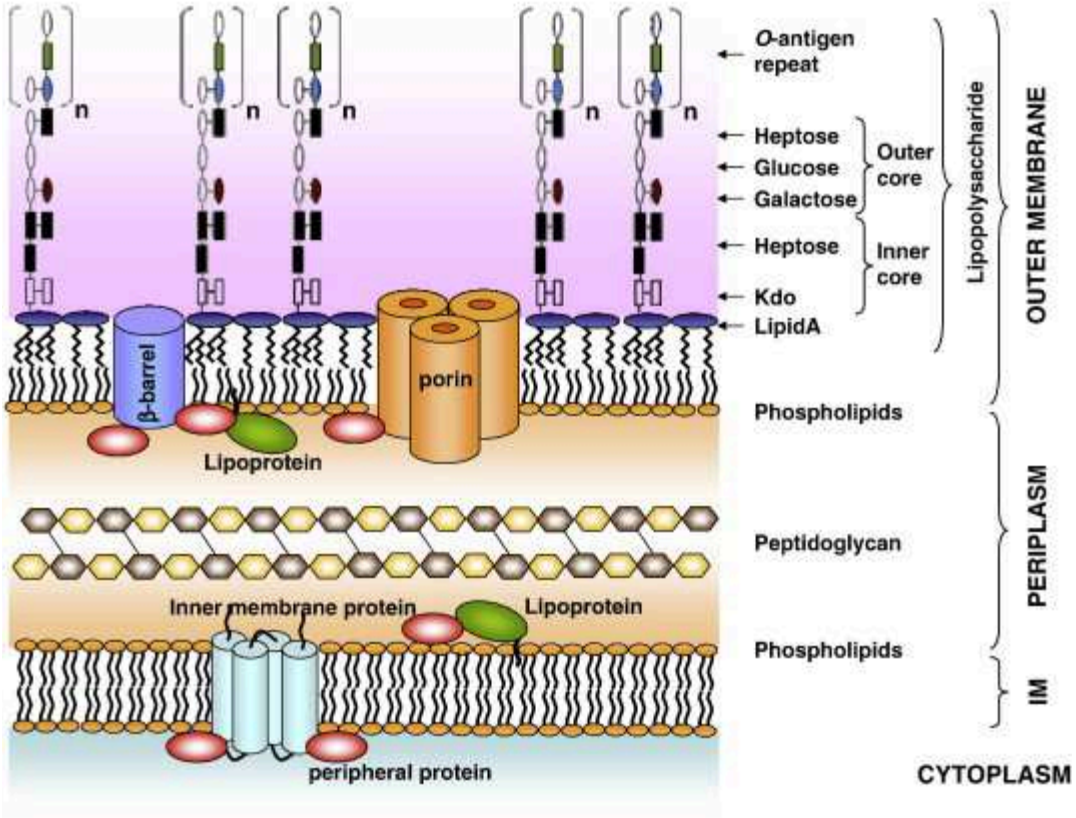


Figure 7. Organisation de la membrane d'une bactérie à Gram négatif
(Sperandeo *et al.*, 2009)

Kdo : acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique ; β-barrel : tonneau β ; IM : membrane interne.

III. La membrane externe des bactéries à Gram négatif

La technique de coloration mise au point en 1884 par Christian Gram a permis de classer les bactéries en deux grands groupes en fonction de la capacité de chaque bactérie à retenir ou non une coloration, capacité qui reflète les différences structurales de l'enveloppe cellulaire des deux groupes bactériens. Les bactéries à Gram positif sont entourées d'un mur de peptidoglycane qui présente une rigidité plus importante que la membrane cytoplasmique (ou membrane interne). Les bactéries à Gram négatif ne sont quant à elles entourées que d'une fine couche de peptidoglycane qui est elle-même entourée par une membrane externe contenant notamment un glycolipide, le lipopolysaccharide (LPS) (Figure 7). La membrane externe constitue une barrière qui protège la cellule de nombreux agents cytotoxiques potentiellement présents dans le milieu extracellulaire (détergents, antibiotiques, peptides antimicrobiens, *etc*…). Cette membrane externe est une bicouche lipidique qui, de façon asymétrique, est généralement composée de phospholipides sur la face interne et de LPS sur la face externe. Cependant, cette asymétrie peut être moins prononcée dans le cas des *Neisseriaceae* chez qui des phospholipides sont également présents dans le feuillet externe de la membrane externe (Steeghs *et al.*, 2001). De plus, au sein de cette membrane sont incorporées des protéines qui participent à divers phénomènes importants pour la survie et/ou la virulence de la bactérie, tels que le transport, la protéolyse, l'adhésion, la signalisation, la sécrétion, le contrôle de l'homéostasie et la biogénèse de la membrane externe elle-même (Silhavy *et al.*, 2010). Ces protéines peuvent être soit des protéines intégrales de membrane externe (PME), des lipoprotéines ou des glycoprotéines.

III.1. Composition

III.1.1. Les lipides de la membrane externe

III.1.1.1. Le LPS

Dans la membrane externe, la propriété de barrière protectrice peut être attribuée notablement à la présence du glycolipide LPS. Le LPS peut être divisé en trois parties distinctes : le lipide A (ou endotoxine) qui permet l'ancrage du LPS dans la membrane externe, le core oligosaccharidique et l'antigène O, qui peut être présent sur la partie distale. Les sucres composant le LPS sont présentés sur la Figure 8. On distingue le LPS lisse (en présence d'antigène O) du LPS rugueux, plus hydrophobe (en absence d'antigène O). Des mutants

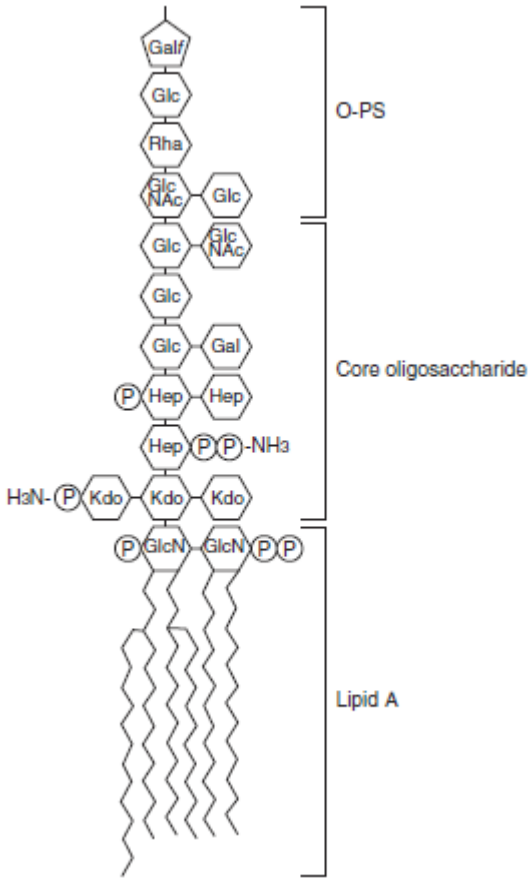


Figure 8. Structure du LPS (Narita, 2011)

Le LPS est composé du lipide A, du core oligosaccharidique et de l'antigène O polysaccharidique (O-PS).
GlcN : D-glucosamine ; Kdo : 3-désoxy-D-manno-octulosonate; Hep: L-glycéro-D-manno-heptose; Glc: D-glucose; Gal: D-galactose; GlcNAc: N-acétyl-D-glucosamine; Rha: L-rhamnose; Galf: D-galactofuranose; P: phosphate.

ayant un LPS rugueux présentent une sensibilité augmentée aux composés hydrophobes tels que certains antibiotiques, sels biliaires ou détergents. Cependant, il existe des bactéries à Gram négatif qui ne présentent pas de LPS, c'est le cas de *Treponema pallidum* et *Borrelia burgdorferi* (Fraser *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 1998). Notons que contrairement aux autres bactéries à Gram négatif, chez *Neisseria meningitidis*, le LPS n'est pas requis pour la viabilité de la bactérie et de ce fait, ce modèle bactérien a été souvent utilisé pour l'étude de mutants liés au LPS (Steeghs *et al.*, 1998).

Chez *S.* Typhimurium, le LPS est impliqué dans la virulence bactérienne. Il joue un rôle dans l'induction d'un choc endotoxique et la résistance aux défenses immunitaires de l'hôte (Gronow et Brade, 2001). Le lipide A est la partie du LPS capable d'induire une réponse immunitaire innée *via* l'activation du Toll-like receptor 4 (TLR4) présent sur les cellules de l'hôte. Enfin, l'absence de LPS, comme dans le cas d'un mutant délété du gène *rfaC*, qui ne synthétise plus le core oligosaccharidique du LPS, est affecté dans sa mobilité et dans la sécrétion des protéines codées par SPI-I et par le flagelle (Crhanova *et al.*, 2011).

III.1.1.2. Les phospholipides

Les phospholipides majoritaires de la membrane externe sont les phosphatidyléthanolamines. On retrouve également du phosphatidylglycérol, chargé positivement et une infime part de cardiolipine qui est une forme condensée de ce phosphatidylglycérol (Ricci et Silhavy, 2012). La concentration élevée en phopholipides contenant des chaînes acyl saturées au sein de la membrane externe, rend cette dernière beaucoup plus rigide que la membrane interne (Huijbregts *et al.*, 2000).

III.1.2. Les protéines au sein de membrane externe

La robustesse de la membrane externe n'empêche pas le passage de nutriments, l'efflux, la sécrétion d'effecteurs et l'assemblage de macromolécules à la surface bactérienne. Au sein de la membrane externe, ces fonctions sont principalement permises par la présence des protéines membranaires qui font majoritairement partie de deux classes : les lipoprotéines, majoritairement présentes au niveau de la face périplasmique de la membrane externe et les PME ou « β-barrel proteins », incrustées de façon intégrale dans la membrane externe et qui permettent les échanges avec le milieu extracellulaire.

III.1.2.1. Les protéines intégrales de membrane externe

Les PME décrites à ce jour adoptent quasi-exclusivement une conformation en tonneaux β (Ruiz *et al.*, 2006), c'est-à-dire qu'elles présentent une région transmembranaire formée par de nombreux feuillets β reliés par des boucles et positionnés autour d'un pore central avec majoritairement des acides aminés hydrophobes présents sur la face externe du tonneau et des acides aminés polaires tapissant l'intérieur du pore. Les extrémités N-terminale et C-terminale de la protéine résident dans le périplasme. Mais certaines PME présentent un domaine périplasmique non négligeable pouvant servir de récepteurs ou de plateforme d'assemblage protéique (Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006).

Notons que la protéine Wza est une exception, puisqu'il s'agit d'une protéine intégrale de membrane externe constituée d'un octamère d'hélices α adoptant une conformation nommée « α -barrel protein » et présentant une partie lipoprotéique périplasmique en N-terminal (Whitfield et Naismith, 2008). Cette protéine est impliquée dans la translocation des polysaccharides capsulaires de groupe 1 à la surface de la membrane externe (Nesper *et al.*, 2003).

Parmi les PME majoritaires, se trouvent OmpC et OmpF qui forment des trimères ainsi que OmpA qui est une protéine de membrane monomérique. Chez *Salmonella,* la porine OmpD est également présente en abondance (Nikaido, 2003). Les PME servent en général à un passage passif à travers la membrane de sucres, ions et molécules hydrophiles inférieures à 700 Da (tels que certains antibiotiques). LamB, transporteur de la maltodextrine et ScrY, transporteur du sucrose sont des exemples de PME qui, à l'inverse des porines majoritaires, permettent une diffusion spécifique de substrats à travers la membrane.

Les PME ont été décrites dans la littérature comme jouant des rôles dans l'efflux (ex : TolC), la sécrétion (*via* les autotransporteurs), la biogenèse des fimbriae (ex : FimD), la biogenèse membranaire (ex : BamA), la protéolyse (ex : la protéase OmpT) et la réponse au stress (ex : la phospholipase OmpLA) (Tamm *et al.*, 2004).

III.1.2.2. Les lipoprotéines de membrane externe

De nombreuses lipoprotéines ont été identifiées chez les bactéries à Gram négatif, par exemple, on en compte plus de 90 chez *E. coli* (Miyadai *et al.*, 2004). Les lipoprotéines peuvent être ancrées à la face périplasmique de la membrane externe ou à la face externe de cette membrane par une réaction de lipidation d'un résidu cystéine conservé en N-terminal permettant à la protéine hydrophile de s'ancrer à la membrane (Kovacs-Simon *et al.*, 2011). Les lipoprotéines peuvent interagir avec les protéines périplasmiques, les PME, le

peptidoglycane ou d'autres lipoprotéines. Il est important de noter que l'ancrage membranaire des lipoprotéines n'est pas systématiquement nécessaire à leur fonctionnalité. En effet, quand elles sont surexprimées, de nombreuses lipoprotéines de *E. coli* sont connues pour remplir leur fonction même en absence d'ancrage à la membrane externe (Chng *et al.*, 2010; Tsukahara *et al.*, 2009). Cependant, dans certains cas, la délocalisation de certaines lipoprotéines peut s'avérer toxique pour la bactérie. C'est le cas de la lipoprotéine Lpp, qui conduit à la lyse bactérienne lorsqu'elle se retrouve délocalisée dans la membrane interne (Yakushi *et al.*, 1997).

Chez les bactéries pathogènes, les lipoprotéines peuvent jouer un rôle dans la virulence, notamment dans la colonisation, l'invasion et l'échappement au système immunitaire de l'hôte (Khandavilli *et al.*, 2008; Neelakanta *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2009). Chez *S.* Enteritidis, il a, par exemple été montré que les lipoprotéines BamB et BamD sont essentielles à la virulence bactérienne *in vivo* et sont impliquées dans l'expression des gènes de SPI-I (Fardini *et al.*, 2007; Fardini *et al.*, 2009).

III.2. Biogénèse de la membrane externe

III.2.1. Biogénèse du LPS

Le précurseur de l'antigène O, qui est un undecaprenyl phosphate oligosaccharide, est synthétisé dans le cytoplasme. Chez la majorité des *Salmonellae* et *E. coli* étudiées, la flippase de membrane interne Wzx permet de transloquer ce précurseur vers le côté périplasmique de la membrane interne où l'antigène O polysaccharidique peut être polymérisé par la protéine Wzy (Narita, 2011). Indépendemment de l'antigène O, le lipide A et le core oligosaccharidique sont synthétisés au niveau de la face cytoplasmique de la membrane interne. Cet ensemble core oligosaccharidique + lipide A est ensuite basculé vers la face périplasmique de la membrane interne par l'intervention de la translocase-flippase MsbA qui utilise de l'ATP. Dès son entrée dans la face périplasmique de la membrane interne, pour les souches possédant un LPS lisse, l'ensemble core oligosaccharidique + lipide A se voit lier l'antigène O à son extrémité par la ligase WaaL (Han *et al.*, 2012; Raetz et Whitfield, 2002). Le LPS complet ainsi formé est ensuite relargué du feuillet externe de la membrane interne par le transporteur ABC LptBCFG (transporteurs à ATP Binding Cassette) (Narita et Tokuda, 2009).

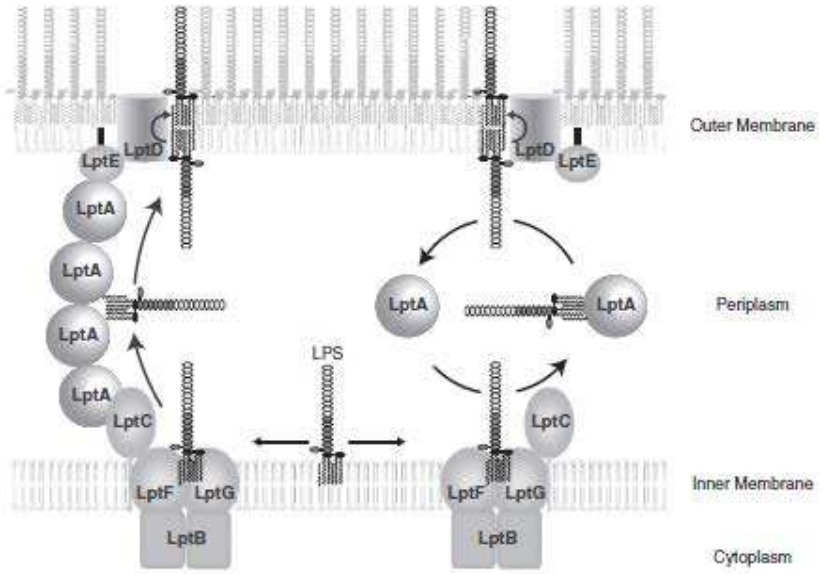


Figure 9. Modèles de transfert du LPS à la membrane externe
(Narita, 2011)

Suite à sa biosynthèse, le LPS peut être transféré à la membrane externe selon la voie « chaperonne » qui est représentée sur la partie droite ou par le modèle de « pont » qui est représenté sur la partie gauche du schéma.

A partir de cette étape, deux modèles de transport du LPS à travers le périplasme sont décrits dans la littérature (Figure 9) :

- Le LPS est transféré de proche en proche en suivant un « pont » formé par les protéines LptC, LptA et enfin LptE pour aller de la membrane interne vers la membrane externe (Sperandeo *et al.*, 2011) ; ce mécanisme pourrait correspondre aux zones d'adhésion entre la membrane interne et la membrane externe que Bayer décrivait il y a plus de 40 ans (Bayer, 1991).

- Le LPS est transporté vers la membrane externe par la chaperone LptA *via* un système analogue au système Lol qui sera décrit dans la partie 2.3.2. de ce chapitre.

Enfin, c'est l'action de la flippase LptD qui assure l'insertion du LPS dans le feuillet externe de la membrane externe.

III.2.2. Trafic des phospholipides de la membrane externe

Le phénomène par lequel les phospholipides synthétisés dans le cytoplasme basculent de la membrane interne vers la membrane externe n'est pas bien connu. MsbA peut jouer ce rôle de façon active ou bien des peptides transmembranaires peuvent médier cette translocation passivement (King et Sharom, 2012; Kol *et al.*, 2003) mais ce rôle joué par MsbA ne semble pas exister chez *N. meningitidis* (Tefsen *et al.*, 2005). Par ailleurs, certaines études ont tenté d'expliquer ce phénomène par des zones d'adhésion entre la membrane interne et la membrane externe que sont les jonctions de Bayer (Bayer, 1968).

La présence de phospholipides dans le feuillet externe de la membrane externe entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire à des molécules hydrophobes telles que les sels biliaires. C'est pourquoi de nombreuses bactéries à Gram négatif et en particulier, les bactéries intestinales disposent d'un mécanisme permettant de détruire ou de retirer les phospholipides du feuillet externe de la membrane externe de la bactérie.

Deux enzymes de membrane externe avaient été identifiées comme étant impliquées dans le maintien de l'asymétrie des phospholipides membranaires : PagP, une lipideA-palmitoyltransferase et PldA, une phospholipase active sous forme dimérisée, ayant pour fonction de détruire les phospholipides exposés à la surface de la bactérie (Bishop, 2008; Dekker, 2000).

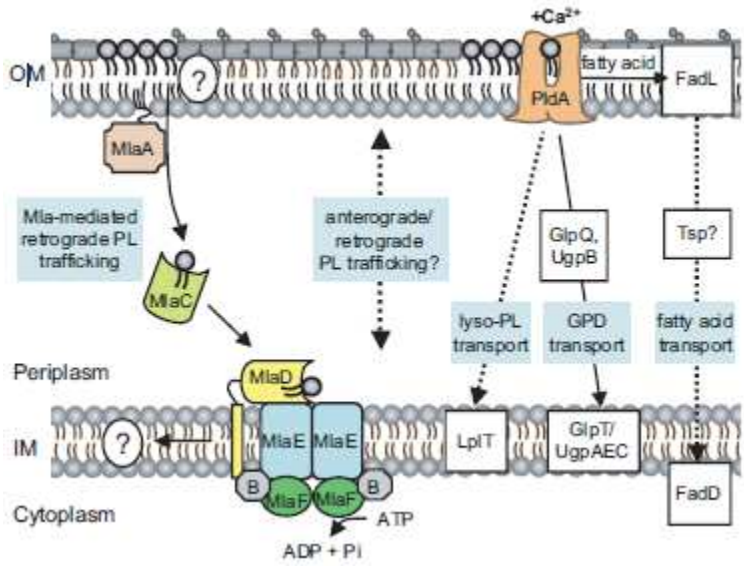


Figure 10. Modèle représentant les voies Mla et PldA
(Malinverni et Silhavy, 2009)

La voie Mla permet de retirer des phospholipides (PL) à partir du feuillet interne ou externe de la membrane externe et de les apporter au complexe MlaFEDB situé dans la membrane interne par l'intermédiaire de la protéine périplasmique MlaC. Les flèches en pointillés représentent les voies actuellement non identifiées de transport à travers le périplasme. De plus, l'implication directe des protéines inscrites dans les rectangles blancs dans la voie PldA n'a pas encore été démontrée.

Plus récemment, un nouveau système de transporteur ABC a été décrit : il s'agit de la voie Mla composée d'au moins 6 protéines et décrite chez *E. coli* comme étant un système permettant de déplacer les phospholipides de la membrane externe vers la membrane interne afin d'éviter une accumulation de ces lipides au sein de la membrane externe (Malinverni et Silhavy, 2009) (Figure 10). De manière générale, les transporteurs ABC forment un ensemble de protéines transmembranaires dont le rôle est le transport de diverses substances (ions, macromolécules, *etc*…) à travers la membrane, en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Les phospholipides retirés par la voie Mla à partir du feuillet interne ou externe de la membrane externe vont être dirigés vers le complexe MlaFEDB situé dans la membrane interne par l'intermédiaire de la protéine périplasmique MlaC. La délétion de chaque membre du système Mla entraîne une accumulation de phospholipides dans la membrane externe, entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire de la bactérie, alors que cette augmentation de perméabilité membranaire n'est pas observée chez un mutant de délétion *pagP* ou *pldA*. En l'absence de PldA, c'est le système Mla qui empêche l'accumulation des phospholipides à la surface de la bactérie. En condition normale, c'est-à-dire en absence de stress, l'activité de Mla inhibe l'action des phospholipases. Ce nouvel ABC transporteur constitue donc le système principal de maintien de l'asymétrie en phospholipides membranaires et les enzymes membranaires PagP et PldA interviendront notamment en condition de stress membranaire. Ainsi, suite à l'activation du système à deux composantes PhoP/PhoQ, on assistera à l'activation de PagP (Groisman, 2001).

III.2.3. Biogénèse des lipoprotéines et des protéines de membrane externe

III.2.3.1. Franchissement de la membrane interne

Les protéines sont toutes synthétisées dans le cytoplasme mais la majorité de ces protéines est destinée à quitter ce compartiment et est confrontée au franchissement de la membrane interne. Les systèmes Sec et Tat vont permettre d'exporter ces protéines du cytoplasme vers les autres compartiments bactériens et nous nous intéresserons ici aux protéines destinées au compartiment périplasmique et à la membrane externe (Yuan *et al.*, 2010), et ce, grâce à la nature du peptide signal que possède chaque pré-protéine. De manière générale, les peptides signaux ne présentent pas d'homologie de séquence. Ils présentent néanmoins trois régions conservées (Figure 11) : un domaine chargé positivement en N-terminal (région n), un domaine central hydrophobe (région h), ainsi qu'un domaine hydrophile en C-terminal (région c) qui contient les caractéristiques permettant à la pré-protéine d'être reconnue par une

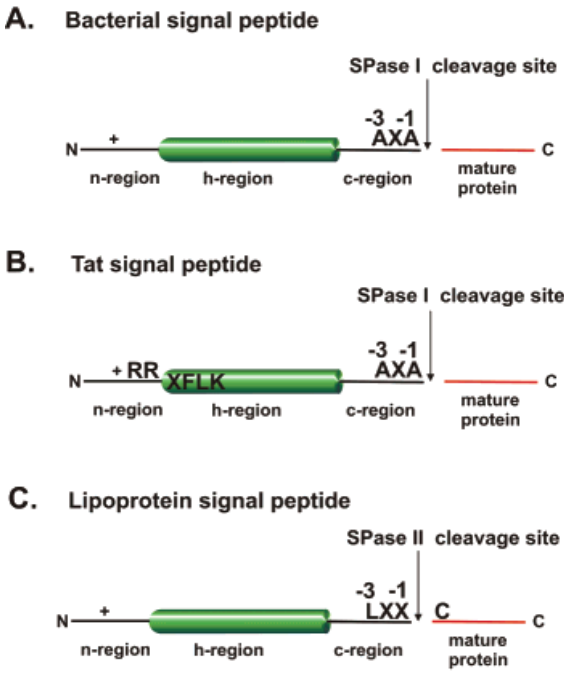


Figure 11. Les peptides signaux bactériens
d'après (Paetzel *et al.*, 2002)

Structure d'un peptide signal de type Sec (A), de type Tat (B) et d'un peptide signal de lipoprotéine qui passe également par le système Sec (C).
SPase : Signal Peptidase ; A : alanine ; C : cystéine ; L : leucine ; R : arginine ; X : acide aminé.

signale peptidase. Les régions h et c du peptide signal peuvent traverser la membrane interne (Briggs *et al.*, 1986), permettant le clivage de la partie qui se retrouve du côté périplasmique. Les peptides signaux des pré-protéines passant par les systèmes Sec ou Tat présentent en leur région c des résidus aliphatiques en position -1 et -3 permettant la reconnaissance par la signale peptidase I en vue du clivage du peptide signal. Les peptides signaux de type Tat ont en plus la particularité de présenter deux résidus arginine en région n.

Le peptide signal des pré-lipoprotéines présente en plus, dans la région c, une séquence nommée lipobox L[A/S][G/A]C qui contient l'information nécessaire à la modification lipidique au niveau du résidu cystéique en position +1. Pour les lipoprotéines, suite à leur passage par le système Sec et à la réaction de lipidation en +1 de la pré-protéine, le peptide signal est clivé par la signale peptidase II.

III.2.3.1.1. .Le système Sec

Le système Sec est retrouvé à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes. Chez les bactéries, il est essentiel et constitue la voie principale d'export protéique. Il reconnaît les pré-protéines présentant un peptide signal en N terminal et permet de les exporter sous une conformation non repliée. Ce système est formé de deux complexes protéiques présents à la membrane interne : le translocon SecYEG et l'ensemble des protéines accessoires SecDFyajC servant au relarguage des protéines traversant le translocon. La protéine cytoplasmique SecA constitue le moteur de cette machinerie puisqu'elle fournit l'énergie nécessaire pour l'hydrolyse d'ATP (Cao et Saier, 2003).

La première étape de la biogénèse des protéines membranaires est de distinguer ces dernières grâce à leur peptide signal. Il existe deux voies dépendantes du système Sec : la translocation de la protéine à travers la membrane interne peut être co-traductionnelle et il y a alors une prise en charge de la protéine naissante au niveau du ribosome par le complexe SRP (Signal Recognition Particle) qui permet la reconnaissance du peptide signal et qui est essentiel au transfert de la plupart des pré-protéines de membrane interne vers le système Sec (du Plessis *et al.*, 2011; Ulbrandt *et al.*, 1997). Ce complexe SRP est composé de la protéine Ffh et de l'ARN 4,5S. Le récepteur du système SRP est la GTPase FtsY et l'ensemble formé par le système SRP et son récepteur est essentiel à la croissance de *E. coli* (Luirink et Sinning, 2004; Phillips et Silhavy, 1992). D'autres protéines peuvent être prises en charge par la protéine SecB pour éviter leur dégradation, leur éventuelle agrégation et leur repliement. SecB dirige ensuite ces pré-protéines vers SecA qui est située du côté cytoplasmique de la membrane

interne et leur translocation *via* le système Sec s'effectue donc de manière post-traductionnelle (du Plessis *et al.*, 2011).

III.2.3.1.2. Le système Tat

Le système Tat permet la translocation de protéines repliées et activées dans le cytoplasme (Natale *et al.*, 2008). Il s'agit d'un système non essentiel à la bactérie contrairement au système Sec. Comme nous venons de le voir, les substrats présentent une séquence signale en N terminal composée de deux résidus arginine consécutives, d'où le nom Twin Arginin Translocation (Tat) donné à ce système. De nombreux substrats de ce système nécessitent des co-facteurs ou chaperonnes correctrices pour un repliement cytoplasmique correct. L'énergie de ce système provient de la force protomotrice (Frobel *et al.*, 2012). Le translocon Tat est constitué des protéines TatA, TatB et TatC. Les protéines TatB et TatC interagissent entre elles pour se lier à la protéine qu'elles prennent en charge au niveau de la région twinarginine de son peptide signal. Suite au transport de la pré-protéine, la protéine TatA se détache du complexe TatBC et la protéine est relarguée de la membrane interne par clivage du peptide signal par la signale peptidase I (Natale *et al.*, 2008).

III.2.3.2. Maturation et assemblage des lipoprotéines à la membrane externe

Suite au franchissement de la membrane interne des pré-lipoprotéines par le système Sec, le groupement thiol du résidu cystéine contenu dans la lipobox est modifié en un groupement diacylglycéryl par la lipoprotein diacylglyceryl transferase (Lgt), permettant l'ancrage futur à la membrane. La lipoprotein signal peptidase (Lsp ou Signal Peptidase II) clive le peptide signal, laissant la cystéine comme le premier résidu en N-terminal sur lequel une réaction d'acylation se fait par l'action de la N-acyl transferase (Lnt). L'élément qui va déterminer le guidage d'une lipoprotéine vers la membrane externe par le système Lol ou le maintien de la lipoprotéine dans la membrane interne, est la nature de l'acide-aminé qui suit la cystéine en position N-terminale de la lipoprotéine mature (c'est-à-dire l'acide aminé en position +2) (Yamaguchi *et al.*, 1988). Si l'acide-aminé en +2 est un aspartate, la lipoprotéine est retenue à la membrane interne alors que la présence d'un autre acide-aminé en cette même position entraîne la lipoprotéine vers le système Lol pour une localisation finale à la membrane externe. Les résidus en +3 et +4 de la protéine peuvent également jouer un rôle dans sa localisation chez de nombreuses bactéries à Gram négatif (Narita et Tokuda, 2007; Silva-Herzog *et al.*, 2008). Le transporteur ABC LolCDE (lipoprotein localization machinery)

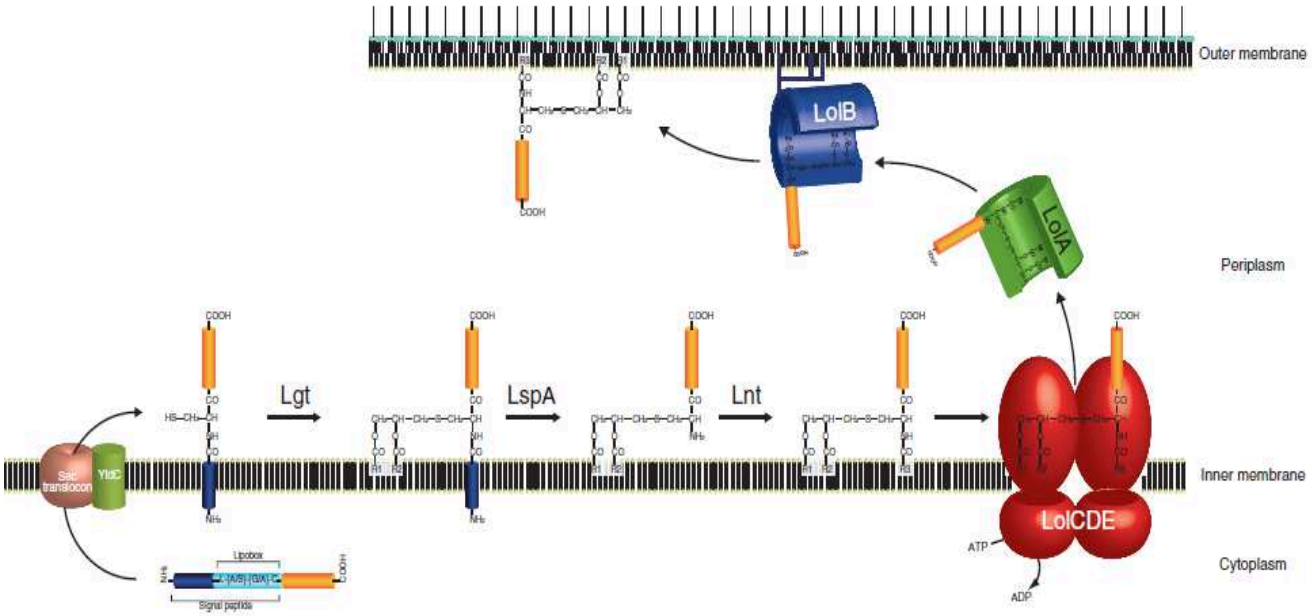


Figure 12. Maturation des lipoprotéines et leur transport chez les bactéries à Gram négatif
(Narita, 2011)

Le précurseur d'une lipoprotéine est une pré-protéine contenant une séquence signal en N-terminal avec une séquence consensus caractéristique d'une lipobox. La Lgt permet l'ancrage de la lipoprotéine à la membrane. La Lsp permet le clivage du peptide signal. La Lnt permet une réction d'acylation sur le résidu cystéine de la lipoprotéine. L'ABC transporteur LolCDE reconnaît la lipoprotéine mature et permet la formation d'un complexe LolA-lipoprotéine. Dans le périplasme, la lipoprotéine est transférée à LolB qui l'incorpore dans la membrane externe.

reconnaît la lipoprotéine mature et la libère de la membrane interne, permettant ainsi la formation d'un complexe LolA-lipoprotéine. Dans le périplasme, LolA transfère la lipoprotéine à LolB, présent à la face périplasmique de la membrane externe qui permet l'insertion de la lipoprotéine dans cette nouvelle membrane de façon irréversible (Figure 12). Dans ce système Lol, LolA est une chaperonne et LolB est un récepteur situé à la membrane externe. LolA et LolB sont capables d'interagir avec la lipoprotéine car elles possèdent toutes deux une cavité hydrophobe.

III.2.3.3. Assemblage des protéines intégrales de la membrane externe

Les protéines intégrales de membrane externe franchissent la membrane interne sous une forme non repliée ; c'est pourquoi elles sont prises en charge par des chaperonnes périplasmiques qui empêchent leur éventuelle agrégation ou mauvais repliement. Les principales chaperonnes périplasmiques prenant en charge les PME sont les protéines SurA, Skp et DegP qui seront décrites dans le chapitre consacré au complexe BAM (chapitre IV). PpiD est une chaperonne périplasmique ancrée à la membrane interne qui ne joue pas de rôle majeur dans la maturation des PME en conditions normales mais peut jouer ce rôle de manière plus importante lorsque les protéines SurA ou Skp font défaut (Matern *et al.*, 2010). Les PME sont ensuite guidées vers le complexe de membrane externe BAM qui joue un rôle d'assemblage et d'insertion dans la membrane externe des PME. Les protéines destinées à être assemblées par le complexe BAM, présentent en leur région C terminale, une séquence cible X-Z-X-Z-X-Z-Tyr-Z-Phe/Trp (X étant un résidu hydrophobe et Z n'importe quel acide aminé) (de Cock *et al.*, 1997; Lehr *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2006). Cependant, il est important de noter que toutes les PME ne sont pas assemblées par le complexe BAM. En effet, c'est le cas de Wza qui est formée par des hélices α ainsi que de la PME PulD qui ne possède pas la séquence cible en C terminal (Collin *et al.*, 2007; Collins et Derrick, 2007).

Ce chapitre nous a permis de voir les différents systèmes d'assemblage des composants de la membrane externe d'une bactérie. Cependant, il est important de garder à l'esprit que ces systèmes ne fonctionnent pas toujours de manière isolée et qu'il peut exister des interactions entre ces différents systèmes. Par exemple, la protéine Wza qui a été décrite chez *E. coli* comme impliquée dans le passage du polysaccharide capsulaire de groupe 1 à la membrane externe, joue un rôle dans la biogénèse ou l'assemblage du LPS (Collins et Derrick, 2007).

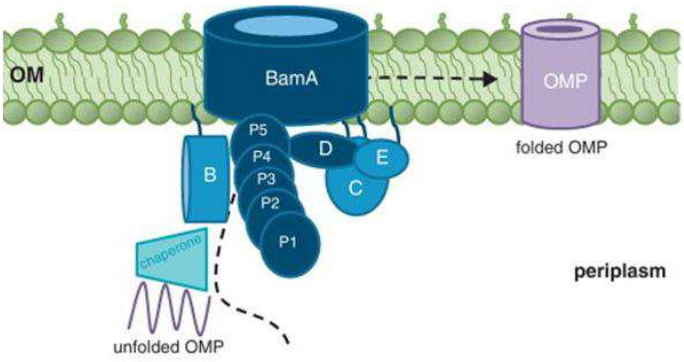


Figure 13. Schéma du complexe BAM et de l'assemblage de PME (OMP) chez *E. coli*
(Rigel et Silhavy, 2012)

Le complexe BAM, situé dans la membrane externe, est composé de la protéine BamA qui présente 5 domaines POTRA (P1 à P5) dans sa partie périplasmique ainsi que des lipoprotéines BamB, BamC, BamD et BamE. Suite au franchissement de la membrane interne, les pré-protéines non repliées sont chaperonnées jusqu'au complexe BAM qui va permettre leur repliement et leur insertion au sein de la membrane externe.

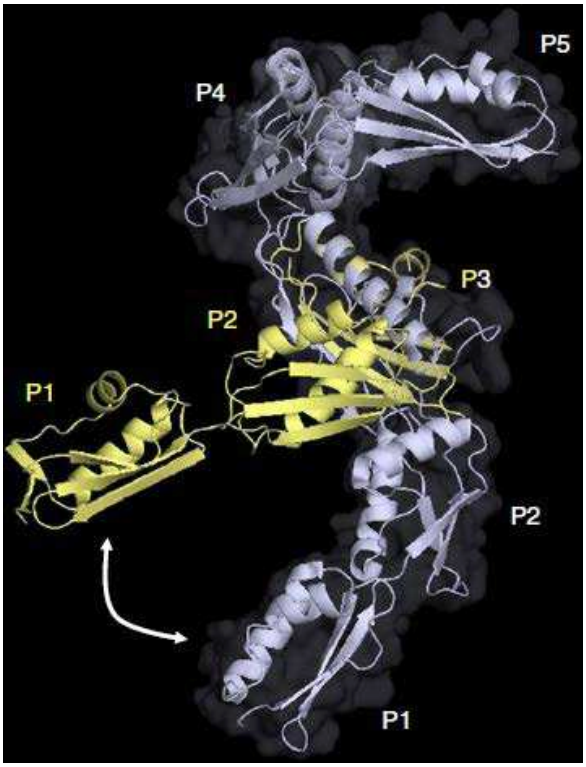


Figure 14. Région périplasmique de BamA composée des domaines POTRA
(Ricci et Silhavy, 2012)

Les domaines POTRA n° 2 et 3 présentent une flexibilité : en jaune, la conformation coudée ; en gris, la conformation étendue.

IV. Le complexe BAM

Le complexe BAM a été identifié pour la première fois chez *N. meningitidis* où la PME BamA initialement nommée Omp85 a été décrite comme étant essentielle à la viabilité de cette bactérie et impliquée dans l'assemblage à la membrane externe des porines majeures de cette bactérie : PorA et PorB (Voulhoux *et al.*, 2003). Des études chez *E. coli* ont montré que les lipoprotéines BamB (anciennement YfgL), BamC (anciennement NlpB), BamD (anciennement YfiO) et BamE (anciennement SmpA) forment un complexe avec la protéine BamA associé à la membrane externe. Au sein de ce complexe BamABCDE où le ratio de est de 1 pour chaque protéine, BamB et BamD sont capables d'interagir avec BamA. BamC interagit avec BamD. Enfin, BamE permettrait de stabiliser les interactions BamA-BamD et BamC-BamD (Sklar *et al.*, 2007a; Stenberg *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005) (Figure 13). Notons cependant que la composition en lipoprotéines du complexe BAM peut différer selon les genres bactériens (Anwari *et al.*, 2012; Gatsos *et al.*, 2008). Toutes ces lipoprotéines, avec la protéine BamA, jouent un rôle dans l'assemblage des PME. Il est important de préciser que malgré l'association de ces protéines sous forme de complexe à la membrane externe et leur importance commune dans l'assemblage des PME. Les gènes *bamA*, *bamB*, *bamC*, *bamD* et *bamE* ne sont pas regroupés au niveau d'un même locus sur le chromosome contrairement à ce que leur nom pourrait laisser penser.

IV.1. Les membres du complexe BAM

IV.1.1. La protéine BamA

La protéine BamA est requise pour la mise en place des PME à la membrane externe (Wu *et al.*, 2005). Il s'agit d'une protéine essentielle qui appartient à la famille Omp85/BamA et elle est présente chez toutes les bactéries à Gram négatif dont le génome a été séquencé (Reumann *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001). Cette protéine formant un tonneau β, présente 5 domaines POTRA (polypetide-transport associated) qui sont requis pour les interactions protéine-protéine. Chacun des 5 domaines POTRA de BamA présents sur sa partie N-terminale périplasmique présente une structure de type β–α–α–β–β (Figure 14).

Chez *E. coli*, une étude par délétion des domaines POTRA montre que les POTRA 2 à 5 sont nécessaires à l'interaction avec BamB et le POTRA 5 à l'interaction avec le sous-complexe BamCDE (Kim *et al.*, 2007). Le POTRA 1, quant à lui, a été décrit comme interagissant avec



Figure 15. Alignement de séquences partielles des protéines de la famille Omp85 de procaryotes et d'eucaryotes
(Gentle *et al.*, 2004)

Les régions les plus conservées sont grisées et contiennent les feuillets β (représentées par des flèches). La région la moins conservée (représentée par les lettres en minuscule) correspond à la boucle reliant les deux feuillets.

la chaperonne périplasmique SurA (Bennion *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que les domaines POTRA sont capables d'interagir avec les PME non repliées (Knowles *et al.*, 2008; Ricci *et al.*, 2012).

Des protéines de la famille Omp85/BamA ont été identifiées dans les mitochondries (Sam50 ou Tob55), les chloroplastes (Toc75) et les chromalvéolates (Bullmann *et al.*, 2010; Schleiff *et al.*, 2011). Ces protéines présentent des motifs très conservés (Figure 15). L'homologue de BamA au sein des mitochondries de tous les eucaryotes est la protéine essentielle Sam50. Cette protéine est responsable de l'assemblage et de l'insertion des PME mitochondriales (Kozjak *et al.*, 2003). Elle fait partie du complexe SAM (sorting and assembly). De façon intéressante, Sam50 présente un seul domaine POTRA (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003).

Dans les chloroplastes, deux protéines homologues de BamA ont été identifiées : Toc75-V (ou OEP80) et Toc75 (Inoue et Potter, 2004). Elles sont toutes deux localisées dans la membrane externe, présentent chacune deux domaines POTRA et sont impliquées dans l'assemblage des PME dans les chloroplastes.

IV.1.2. La lipoprotéine BamB

Chez *E.* coli, la lipoprotéine BamB est nécessaire pour un assemblage correct des PME car en l'absence de BamB, les PME telles que OmpA, OmpC et OmpF sont accumulées dans le périplasme sous une forme mal repliée. Ce phénotype est accentué dans un mutant de délétion Δ*degP* (Charlson *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2005). Par contre, il est important de préciser que toutes les PME ne sont pas affectées de la même manière puisque le niveau de la protéine de membrane TolC augmente dans la membrane externe du mutant de délétion *ΔbamB* (Charlson *et al.*, 2006). Il a également été montré, chez cette bactérie, que l'inactivation du gène *bamB* entraîne une augmentation de sensibilité aux antibiotiques suivants : vancomycine, chlorobiphenyl vancomycine (CBPV), bacitracine, novobiocine, rifampicine et érythromycine (Ruiz *et al.*, 2005; Vuong *et al.*, 2008).

Des études précédentes au laboratoire ont montré que chez *S.* Enteritidis, BamB joue aussi un rôle dans l'organisation de la membrane externe. En effet, l'inactivation de *bamB* augmente la perméabilité membranaire de la bactérie à ces mêmes antibiotiques excepté à la novobiocine et à la CBPV qui n'a pas été testée et le mutant *ΔbamB* présente une quantité plus faible des protéines OmpA, OmpC, OmpD et OmpF par rapport à la souche sauvage au sein de sa membrane externe (Fardini *et al.*, 2007).

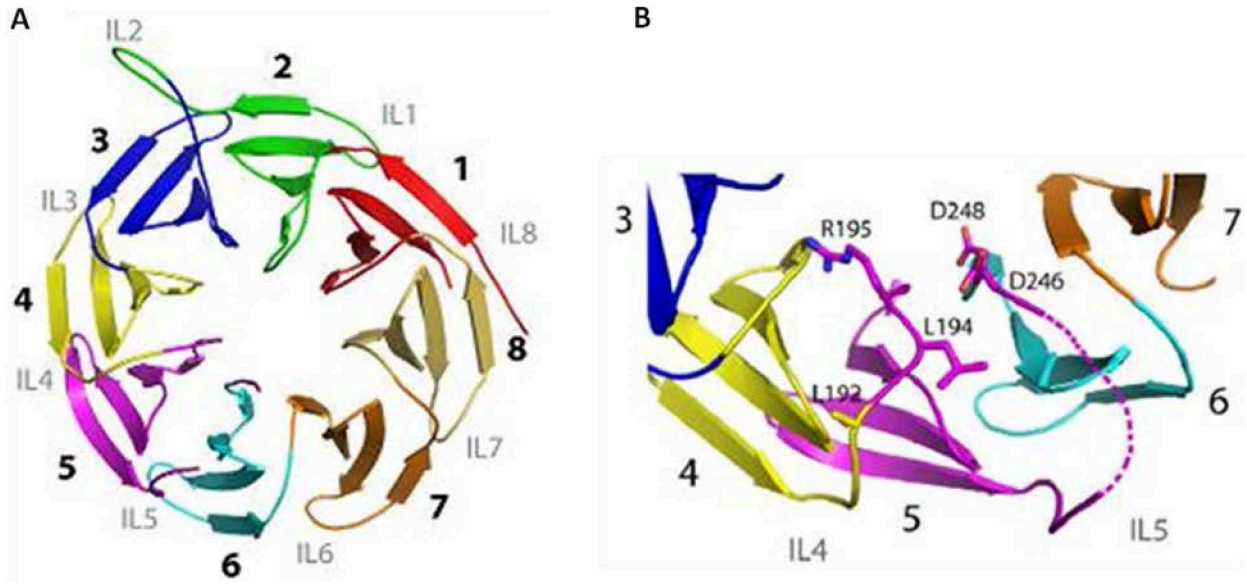


Figure 16. Structure de BamB
(Noinaj *et al.*, 2011)

(A) BamB possède 8 feuillets β consécutifs
(B) Les boucles IL4 et IL5 de BamB présentent des résidus importants pour l'interaction avec BamA. Ce zoom permet de localiser les résidus L192, L194, R195, D248 et D246 (équivalents respectifs dans la protéine mature : L173, L175, R176, D227 et D229).

Les 4 structures cristallographiques de BamB décrites dans la littérature ne présentent pas de différences importantes : il s'agit d'une protéine avec 8 domaines « β-propeller » périplasmiques autour d'un axe central. Chaque domaine contient 4 feuillets β antiparallèles et est relié au domaine adjacent par une boucle (IL, interconnecting Loop) (Albrecht et Zeth, 2011; Heuck *et al.*, 2011; Kim et Paetzel, 2011) (Figure 16A). BamB interagit avec BamA *via* les domaines POTRA n° 2, 3 et 4 de BamA. Des mutations ponctuelles dans BamB ont permis de mettre en évidence 5 résidus présents dans les boucles IL4 et IL5 et impliqués dans l'interaction avec BamA chez *E. coli*. Il s'agit des résidus L173, L175 et R176 et des résidus D227 et D229 de la protéine mature (Vuong *et al.*, 2008) (Figure 16B). Ces résidus spécifiques de l'interaction BamA/BamB sont très conservés et forment un continuum à proximité du centre du « β-propeller » BamB. Il a été suggéré que les régions non conservées de BamB pourraient, à l'inverse, être impliquées dans l'interaction avec les différentes PME non repliées. BamB permettrait ainsi d'augmenter la capacité de BamA à se lier aux différents substrats (Heuck *et al.*, 2011).

Par ailleurs, il a été montré que, chez *E. coli*, BamB présente une activité serine-thréonine kinase mise en évidence par des tests d'autophosphorylation et qu'elle peut lier un composé oxydant : le pyrroloquinoline-quinone (PQQ). Pourtant, l'analyse bioinformatique ne révèle aucun domaine kinase dans sa séquence mais uniquement des domaines d'interaction avec la molécule PQQ. Khairnar *et al.*, montrent que cette activité kinase de BamB est impliquée dans la réparation de l'ADN et la recombinaison homologue, et ce, de manière dépendante de PQQ (Khairnar *et al.*, 2007). La localisation de BamB dans le périplasme associée à la membrane externe n'est en théorie pas compatible avec cette activité kinase puiqu'il n'y a pas d'ATP dans le périplasme.

IV.1.3. Les lipoprotéines BamC, BamD et BamE

De façon similaire à BamB, la lipoprotéine BamC est impliquée dans l'assemblage des PME mais le phénotype d'un mutant de délétion *ΔbamC* est le moins altéré de tous les mutants des membres du complexe BAM (voire pas altéré chez *Salmonella*, cf figure 17): on observe une augmentation de la perméabilité membranaire à la rifampicine et le mutant présente un phénotype de létalité dans un contexte Δ*surA*, suggérant ainsi que BamC jouerait un rôle dans le repliement des protéines chaperonnées par SurA au niveau du périplasme (Onufryk *et al.*, 2005).

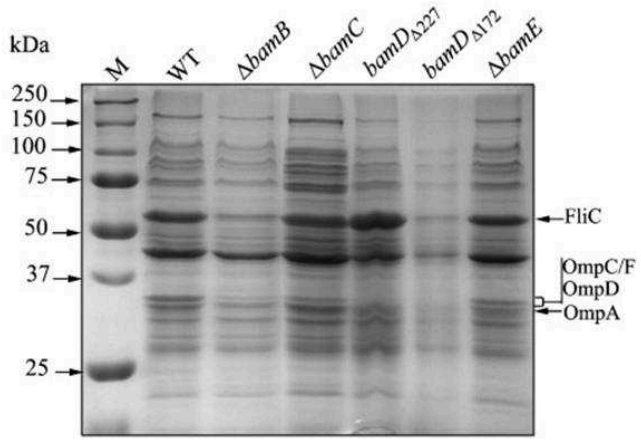
BamC présente deux domaines indépendants : une région en C-terminal et une région en N-terminal repliées en hélices α et connectées entre elles par un inter-domaine flexible. Les 70 acides aminés en extrémité N-terminale de la protéine ne présentent pas de structure particulière (Albrecht et Zeth, 2011; Heuck *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011a; Warner *et al.*, 2011). Il est intéressant de voir que cette extrémité N-terminale non structurée est la région la plus conservée de la protéine chez les bactéries et est importante pour la liaison avec BamD. Le domaine C-terminal de BamC présente des acides aminés conservés qui pourraient également être impliqués dans l'interaction avec BamD ou avec d'autres membres du complexe BAM (Kim *et al.*, 2011a).

La lipoprotéine BamD est essentielle chez *E. coli* mais pas chez *Salmonella*. Néanmoins, chez *Salmonella*, un mutant de délétion Δ*bamD* présente un défaut de croissance important par rapport à sa souche parentale ; c'est pourquoi, chez cette bactérie, les études phénotypiques permettant d'étudier le rôle de BamD ont été effectuées *via* des mutants partiels (Fardini *et al.*, 2009). Cette lipoprotéine est fortement impliquée dans l'assemblage des PME telles que LamB, OmpA, OmpC, OmpD et OmpF et dans la perméabilité membranaire aux antibiotiques (Fardini *et al.*, 2009; Malinverni *et al.*, 2006; Onufryk *et al.*, 2005). BamD est majoritairement constituée d'hélices α et présente 5 domaines tétratricopeptides TRP (tetratricopeptide repeats) en N-terminal, impliqués dans les interactions protéine-protéine (Sandoval *et al.*, 2011). Il a été montré qu'une forme tronquée de BamD, possédant uniquement la région TRP1 à 3, est capable de lier le motif conservé d'interaction protéine-protéine qui se trouve en C-terminal des PME (Albrecht et Zeth, 2011) suggérant ainsi que BamD aurait un rôle de reconnaissance des PME destinées à être assemblées par le complexe BAM (Ricci *et al.*, 2012). Cependant, les données récentes concernant la structure du complexe BamC/BamD révèle une fixation de BamC sur cette même région N-terminale de BamD impliquée dans la fixation des peptides (Kim *et al.*, 2011a).

BamE est la plus petite lipoprotéine du complexe BAM. L'absence de BamE conduit à un léger défaut d'assemblage des PME (Fardini *et al.*, 2009) et à une activation du système de stress membranaire σ^E. Un mutant Δ*bamE* présente une augmentation des CMI (concentration minimale inhibitrice) d'un facteur 4 à la rifampicine et d'un facteur 2 au cholate qui est présent dans les sels biliaires, par rapport à la souche sauvage. De plus, ce mutant est incapable de croître sur un milieu contenant 0,5% de SDS et 1mM d'EDTA (Lewis *et al.*, 2008; Sklar *et al.*, 2007a).

BamE est impliquée dans la stabilité du complexe BAM (Sklar *et al.*, 2007a). Par ailleurs, des études de spectrométrie ont montré qu'elle est capable de se lier au phosphatidylglycérol et

(a)



(b)



(c)

Strain	Inhibition zone (mm)*			
	Vancomycin	Bacitracin	Erythromycin	Rifampicin
WT	6	6	7	10
Δ*bamB*	12	9	12	20
Δ*bamC*	6	6	7	10
Δ*bamE*	6	7	8	14
$bamD_{\Delta 227}$	14	10	15	21
$bamD_{\Delta 172}$	16	19	23	27

Figure 17. Implication de chaque lipoprotéine du complexe BAM dans l'assemblage des PME à la membrane externe et la sensibilité aux antibiotiques
d'après (Fardini *et al.*, 2009)

La souche sauvage de *Salmonella* Enteritidis LA5 (WT), les mutants Δ*bamB*, Δ*bamC* et Δ*bamE* ainsi que les mutants partiels $bamD_{\Delta 227}$ et $bamD_{\Delta 172}$ ont été utilisés.
(a) Profil des protéines totales membranaires (membrane interne+membrane externe) sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie
(b) Western-blot avec un anticorps anti-OmpA sur les mêmes échantillons
(c) Antibiogrammes sur les différentes souches. Les diamètres des zones d'inhibition à la vancomycine, bacitracine, érythromycine et rifampicine sont exprimés en mm (le diamètre d'un disque mesurant 6mm).

permettrait ainsi d'initier l'insertion des PME dans la membrane externe (Endo *et al.*, 2011; Knowles *et al.*, 2011). En solution, BamE existe à la fois sous forme monomérique et dimérique et chaque monomère est constitué d'un feuillet formé de 3 brins β antiparallèles en lien avec 2 hélices α (Albrecht et Zeth, 2011; Kim *et al.*, 2011b; Knowles *et al.*, 2010; Knowles *et al.*, 2011). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer sous quelle forme se trouve BamE *in vivo* puisqu'une étude montre que BamE purifiée en conditions natives à partir de la membrane externe est présente sous une forme dimérique (Albrecht et Zeth, 2011) alors qu'une autre étude montre une dimérisation de BamE uniquement en condition de stress membranaire (Knowles *et al.*, 2011).
Les phénotypes d'assemblage des PME et de sensibilité aux antibiotiques des mutants de délétion de chaque lipoprotéine du complexe BAM chez *Salmonella* sont présentés dans la Figure 17 (Fardini *et al.*, 2009).

IV.2. Rôle du complexe BAM

IV.2.1. Les partenaires du complexe BAM dans la biogénèse des PME

Les protéines de membrane externe, qui sont amenées à acquérir des structures en feuillets β, sont soumises à une instabilité structurale lorsqu'elles sont sous forme non repliée. En effet, dans cet état, les risques d'agrégation sont importants en milieu aqueux (tels que le cytoplasme et le périplasme). Des chaperonnes sont requises pour lier les PME dès le franchissement de la membrane interne via le système Sec.
La protéine SurA appartient à la classe des protéines possédant un domaine d'activité peptidyl-prolyl isomérase (PPIase) et appartient à la famille des chaperonnes. Cette activité a été mise en évidence *in vitro* (Behrens *et al.*, 2001). Les bactéries ne produisant plus la protéine SurA présentent moins de certaines PME à leur membrane externe, telles que OmpA, OmpC, OmpF et LamB et ont un système de stress membranaire σ^E activé (Rouviere et Gross, 1996; Sklar *et al.*, 2007b; Vertommen *et al.*, 2009). Comme ce système de stress est touché, il est difficile de déterminer spécifiquement les cibles de SurA. De façon intéressante et malgré le fait que la transcription du gène *lptD* (également nommé *imp* et impliqué dans la biogénèse du LPS) soit augmentée lors de l'activation du système σ^E, un mutant de délétion Δ*surA* présente une quantité réduite de LptD à la membrane externe (Ruiz *et al.*, 2005; Vertommen *et al.*, 2009). De plus, il a été décrit dans la littérature, que des mutants présentant un LPS tronqué (tel qu'un mutant touché sur le gène *lptD)* peuvent présenter une réduction du nombre

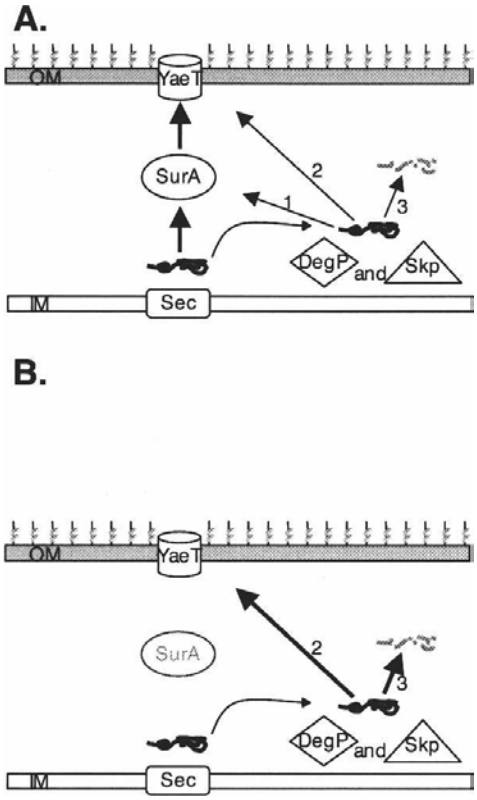


Figure 18. Modèle du rôle des chaperonnes périplasmiques dans la biogénèse de la membrane externe
(Sklar *et al.*, 2007)

Les PME sont exportées à travers la membrane interne *via* le système Sec.
(A) Chez une souche sauvage, la majorité des PME sont prises en charge par SurA dans le périplasme et les PME qui n'auront pas bien été prises en charge peuvent l'être par DegP et Skp (voie 1) ou bien directement livrées au complexe BAM à la membrane externe, sans l'intervention de SurA (voie 2) ou encore dégradées par l'activité protéase de DegP (voie 3).
(B) En absence de SurA, les protéines DegP et Skp sont mobilisées en raison d'une accumulation de PME mal repliées dans le périplasme (voies 2 et 3).
YaeT : BamA.

de PME à la membrane (Laird *et al.*, 1994). Cet exemple prouve à nouveau qu'il existe des liens entre les différents systèmes d'assemblage des composants de la membrane externe (les PME et le LPS). Des études plus récentes ont montré l'implication spécifique de SurA dans le chaperonnage d'autres protéines telles que PapC et FimD (en lien avec la biogénèse des pili) (Justice *et al.*, 2005; Watts et Hunstad, 2008), de EspP (Ieva et Bernstein, 2009; Ruiz-Perez *et al.*, 2009), Hbp (Sauri *et al.*, 2009) et IcsA (en lien avec les autotransporteurs) (Purdy *et al.*, 2007) et l'adhésine intimine (Bodelon *et al.*, 2009).

Une autre chaperonne périplasmique, FkpA a été décrite et présente un domaine PPIase (Saul *et al.*, 2004). FkpA joue un rôle mineur par rapport à SurA mais contribue à l'assemblage des PME notamment quand le système de stress σ^E est activé (Onufryk *et al.*, 2005).

Une seconde voie, indépendante de SurA et engageant d'autres protéines périplasmiques, Skp et DegP a été décrite comme jouant un rôle similaire et parallèle à SurA notamment dans le cas où la prise en charge des PME par SurA n'aurait pas eu lieu de façon correcte (Sklar *et al.*, 2007b) (Figure 18). Skp est une chaperonne impliquée dans la liaison des PME non repliées (Qu *et al.*, 2009). Il est important de noter que les mutants de délétion Δ*surA* ou Δ*skp* ne sont pas létaux contrairement au double mutant de délétion (Sklar *et al.*, 2007a).

L'accumulation de protéines mal repliées ou agrégées dans le périplasme étant toxique pour la bactérie, des mécanismes de réponse au stress se mettent en place et induisent la séquestration suivie de la dégradation des protéines mal repliées (Rhodius *et al.*, 2006). DegP répond à ce stress en agissant comme une protéase pour les PME mal repliées conduisant à leur destruction et un autre domaine de la protéine DegP est capable de fixer les PME repliées simultanément, ce qui va lui permettre d'exercer son rôle de chaperonne en parallèle (Krojer *et al.*, 2008). Il est important de noter que les essais de co-purifications de Skp et DegP avec le complexe BAM, n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction de ces chaperonnes avec le complexe (Sklar *et al.*, 2007b). Il est possible que, contrairement à SurA, ces chaperonnes puissent transférer leurs substrats sans interagir physiquement avec le complexe.

IV.2.2. Modèles d'insertion des PME par le complexe BAM

Une fois guidées par les chaperonnes vers la membrane externe, les PME sont prêtes à être repliées et insérées dans la membrane. Des études ont montré qu'*in vitro*, les PME sont capables de se replier et de s'insérer spontanément dans une bicouche lipidique sans l'intervention d'aucun complexe protéique (Burgess *et al.*, 2008; Kleinschmidt, 2003).

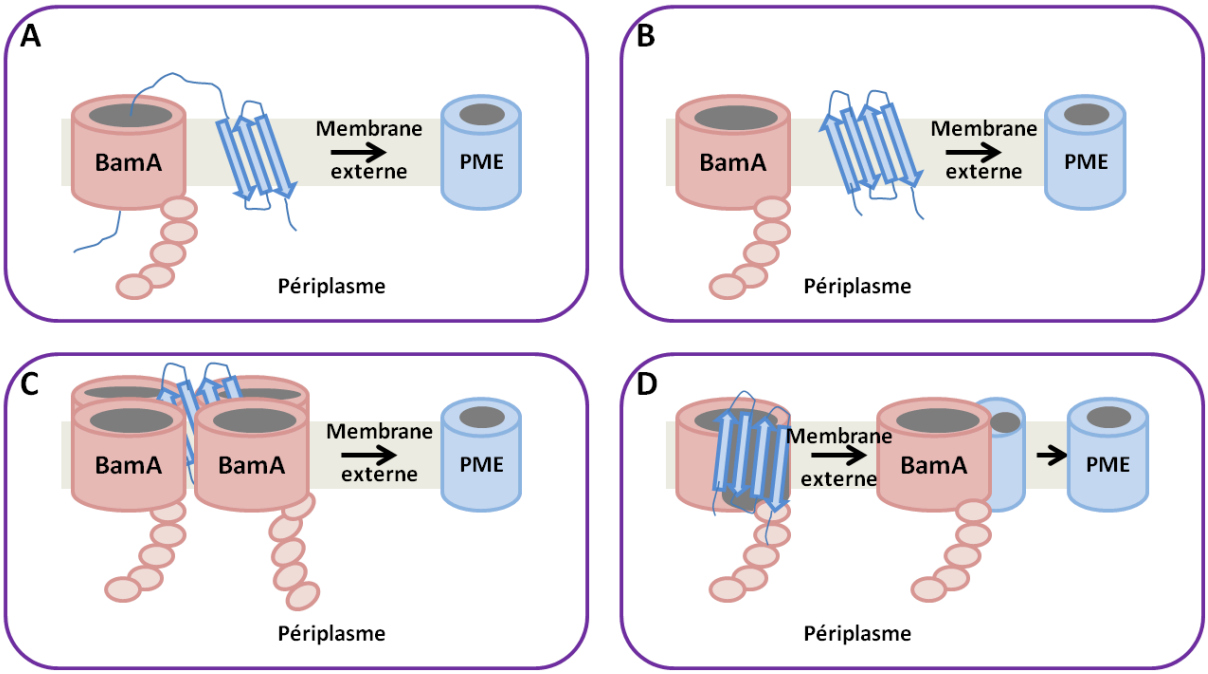


Figure 19. Modèles d'assemblage des PME par le complexe BAM
d'après (Kim *et al.*, 2012)

Pour plus de clarté, les lipoprotéines BamB, BamC, BamD et BamE n'ont pas été représentées. Les cercles roses liés du côté périplasmique de BamA représentent ses domaines POTRA. Les flèches bleues représentent les brins β (substrat du complexe BAM) formant la future PME.
A : Le substrat est tout d'abord transloqué à travers BamA, avant d'être replié du côté extracellulaire et inséré à la membrane.
B : Le substrat est inséré dans la membrane par la face périplasmique et le repliement de la PME se fait entre BamA et la bicouche lipidique de la membrane.
C : Ce modèle est similaire au modèle précédent avec pour différence le repliement de la PME qui a lieu au cœur d'un tétramère de BamA.
D : Le substrat prend pour matrice les brins β en C terminal et N terminal de BamA. Des liaisons hydrogènes se mettent en place entre ces brins de BamA et les brins β du substrat. La PME se replie ainsi à l'intérieur de la protéine BamA. La PME est ensuite libérée latéralement dans la membrane.

Cependant, dans ces conditions le processus est lent (Tamm *et al.*, 2004) en comparaison à l'assemblage des PME en présence du complexe BAM.

Certaines études ont permis d'estimer que le temps nécessaire à l'assemblage des PME par le complexe BAM est comprise entre 30 secondes et quelques minutes (Hagan *et al.*, 2010; Ureta *et al.*, 2007). Ce processus ne nécessite pas d'apport énergétique puisque le périplasme est dépourvu d'ATP et la membrane externe est dépourvue de gradient ionique. Dans une intéressante étude, Hagan *et al.* ont purifé le complexe BAM avec ou sans BamB et l'ont incorporé dans des liposomes pour étudier l'assemblage de la PME OmpT en présence de la chaperonne SurA (Hagan *et al.*, 2010). Ils ont ainsi montré que BamB a une fonction spécifique d'augmentation de l'activité d'assemblage des PME au sein du complexe BAM, en présence de SurA. SurA est nécessaire à cet assemblage mais semble entrer dans une voie indépendante de BamB puisqu'un double mutant *E. coli ΔbamB ΔsurA* présente un défaut d'assemblage des PME beaucoup plus marqué que les simples mutants *ΔbamB* ou *ΔsurA* (Ruiz *et al.*, 2005).

Les données actuelles ne permettent pas encore de décrire les étapes et la chronologie d'intervention de chaque acteur du complexe BAM lors de l'assemblage des PME. Néanmoins, les résultats accumulés durant cette décennie permettent de mettre en place des modèles d'assemblage des PME par le complexe BAM.

Kim *et al.* ont présenté 4 modèles d'assemblage (Kim *et al.*, 2012): Dans le premier modèle (Figure 19A), la PME non repliée passe par le pore de la protéine BamA, sort du côté extracellulaire, puis, est repliée et insérée dans la membrane. Ce modèle de passage des PME à travers BamA a été proposé suite aux études structurales chez *Bordetella pertussis* concernant FhaC, une protéine de membrane externe homologue à BamA qui, suite à la fixation de son substrat, l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), subit un changement de conformation induisant l'augmentation du diamètre de son pore et permettant ainsi le passage de son substrat FHA (Clantin *et al.*, 2007). Dans le même ordre d'idée, il a été montré que BamA peut montrer une variabilité de la conductance de son pore suite à la liaison d'un substrat, indiquant qu'il s'agit d'une protéine flexible structuralement (Stegmeier et Andersen, 2006). Trois autres modèles ont été imaginés par Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2012). Dans le second modèle (Figure 19B), BamA servirait de chaperonne au substrat non replié qui s'insère entre BamA et la bicouche lipidique membranaire où le repliement peut avoir lieu. Dans le modèle suivant (Figure 19C), BamA pourrait se tétramériser afin d'aider au repliement du substrat qui aurait lieu au cœur de ce tétramère. La dissociation de ce tétramère libérerait la PME repliée. Dans le dernier modèle (Figure 19D), les brins β en C terminal et N terminal de BamA reliés

par une liaison hydrogène serviraient de matrice pour le repliement de la PME. L'initiation de l'assemblage de la PME non repliée se ferait alors par sa liaison aux domaines POTRA de BamA par un alignement de brins β par β-augmentation. Les domaines POTRA terminent ce processus par des liaisons hydrogène sur les bordures du feuillet β afin qu'un tonneau β se forme et puisse s'insérer dans la membrane.

Par ailleurs, il n'y a pas de preuve formelle que BamB présente également un site de liaison aux PME, mais le modèle proposé par Hagan *et al.* semble indiquer que BamB peut également servir de matrice à l'assemblage des brins β des PME (Hagan *et al.*, 2011).

De manière intéressante, une étude séquentielle chez *E.* coli a montré qu'au cours de l'assemblage et la sécrétion de la protéase à sérine extracellulaire EspP, les lipoprotéines BamB et BamD continuaient d'interagir avec EspP après l'intervention de la protéine BamA, montrant ainsi que lors de l'assemblage des PME, il existe des étapes où les lipoprotéines du complexes BAM peuvent intervenir en se liant aux PME à un stade plus tardif par rapport à l'intervention de BamA (Ieva *et al.*, 2011).

IV.3. Rôle du complexe BAM dans la virulence bactérienne

En plus de leur importance dans la biogénèse de la membrane externe, trois lipoprotéines du complexe BAM, BamB, BamD et BamE ont été impliquées dans la virulence bactérienne.

Il a été précédemment mis en évidence dans notre laboratoire que le gène *bamB* est requis *in vivo* pour l'infection systémique chez la souris et chez le poussin d'un jour. En effet, un mutant Δ*bamB* colonise significativement moins la rate de souris et d'un facteur 45 que la souche sauvage et 60 % des souris inoculées par voie orale avec ce mutant survivent au-delà de 21 jours alors que la souche sauvage tue toutes les souris entre 7 et 10 jours post-inoculation (Fardini *et al.*, 2007). Chez le poussin d'un jour, un mutant Δ*bamB* colonise significativement moins les caeca et la rate à 2 et 5 jours post-inoculation (Amy *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'inactivation de *bamB* conduit à la réduction de la transcription de la plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse des 3 T3SS (Amy *et al.*, 2004; Fardini *et al.*, 2007) ce qui entraîne un défaut d'entrée de *Salmonella* dans les cellules et réduit la mobilité de la bactérie. Il a été montré que ce contrôle passe notamment par la diminution de la transcription des gènes codant les régulateurs transcriptionnels centraux de chacun de ces T3SS : HilA pour les gènes associés au T3SS-1, $FlhD_4C_2$ et FliA pour ceux associés au flagelle et SsrB pour ceux associés au T3SS-2 (Fardini *et al.*, 2007). Ainsi, BamB est la première protéine de membrane externe capable de réguler l'expression des 3 T3SS dans le même sens. BamB joue

également un rôle dans la virulence d'une souche d'*E. coli* invasive puisque son absence entraîne une diminution de la capacité de la bactérie à envahir les cellules épithéliales (Rolhion *et al.*, 2005).

De manière similaire à BamB il a été montré, que chez *Salmonella*, BamD est requise pour l'expression des gènes du T3SS-1 et du flagelle puisque l'expression d'une protéine BamD tronquée en C-terminal implique une diminution de la transcription des gènes codant les régulateurs transcriptionnels des gènes du T3SS-1 et du flagelle. De plus, un mutant de délétion partielle du gène *bamD* présente une capacité réduite d'invasion des cellules HT-29 (Fardini *et al.*, 2009).

Concernant la protéine BamE, elle n'est pas requise pour l'entrée et la survie de *S.* Typhimurium ou *S.* Enteritidis dans les cellules épithéliales HT-29 ou dans les macrophages de souris (Fardini *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2008). En accord avec ce phénotype, aucun défaut d'expression des T3SS n'a été observé chez un mutant Δ*bamE* (Fardini *et al.*, 2009). Cependant, chez la souris infectée par voie orale ou intrapéritonéale, un mutant Δ*bamE* colonise 10 fois moins le foie et la rate par rapport à la souche sauvage. De plus, ce mutant colonise moins bien des sites systémiques tels que le foie et la rate en comparaison avec les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques, suggérant soit un défaut de réplication du mutant dans les organes systémiques, soit un défaut de translocation du mutant à partir du système lymphatique (Lewis *et al.*, 2008).

A l'heure actuelle, aucune donnée dans la littérature ne suggère un rôle de BamC dans la virulence. En effet, aucun défaut d'expression des T3SS ou d'entrée dans les cellules épithéliales n'a été observé chez un mutants Δ*bamC* de *S.* Enteritidis (Fardini *et al.*, 2009).

La première hypothèse qui vient à l'esprit pour expliquer le défaut d'expression des T3SS chez les mutants du complexe BAM est un rétrocontrôle suite au défaut d'assemblage de l'appareil de sécrétion. Cependant, un mutant de délétion Δ*bamB* de *Salmonella,* qui présente un défaut d'assemblage de ces PME à la membrane externe, peut assembler un T3SS-1 fonctionnel à sa membrane externe lorsqu'on force la transcription des gènes de SPI-1 en exprimant en trans, le régulateur transcritionnel HilA de manière constitutive. De manière réciproque, dans un mutant Δ*invA,* qui est incapable de mettre en place un T3SS-1 fonctionnel au sein de la membrane externe, on n'observe pas de rétrocontrôle des gènes du T3SS-1 (Fardini *et al.*, 2009).

Par ailleurs, le complexe BAM a été décrit comme étant impliqué dans l'assemblage de certains autotransporteurs, tels que EspP ou Hbp, qui jouent un rôle important dans la virulence de certaines bactéries (Ieva *et al.*, 2011; Sauri *et al.*, 2009). Les autotransporteurs

sont des protéines composées d'un domaine C-terminal adoptant une structure en β-barrel qui s'insère dans la membrane externe et d'un domaine passager servant à transloquer dans le milieu extracellulaire la partie N-terminale de la protéine. Il est donc probable qu'un défaut d'assemblage de ces autotransporteurs par le complexe BAM entraînerait un défaut de virulence bactérienne ce qui n'a pas été testé à l'heure actuelle.

MATERIEL ET METHODES

Table 1A. Souches bactériennes utilisées

Souche	Principales caractéristiques	Source
MC1061	Souche de *E. coli* de genotype : F^- *Δ(ara-leu)7697 [araD139]*$_{B/r}$ *Δ(codB-lacI)3 galK16 galE15* λ^- *e14*$^-$ *mcrA0 relA1 rpsL150(strR) spoT1 mcrB1 hsdR2(*r^-m^+*)*	(Casadaban et Cohen, 1980)
TG1	Souche de *E. coli* de génotype : F' [*traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZΔM15*]*supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, (*r^-m^-*)*	(Gibson *et al.*, 1984)
LK5 *hsdR* $^-$	Souche de *S. enterica* serovar Enteritidis mutée dans son sytème de restriction-modification (SPT^R)	Don de L. Bossi
LA5	Souche sauvage de *S. enterica* serovar Enteritidis (NAL^R)	(Allen-Vercoe *et al.*, 1997)
LA5Δ*bamB*	Mutant isogénique de la souche LA5 délétée du gène *bamB* (NAL^R)	(Fardini *et al.*, 2007)
Δ*bamD*$_{227}$	Mutant isogénique de la souche LA5 délétée partiellement du gène *bamD* (NAL^R)	(Fardini *et al.*, 2009)
Δ*bamD*$_{172}$	Mutant isogénique de la souche LA5 délétée partiellement du gène *bamD* (NAL^R)	(Fardini *et al.*, 2009)
Δ*ompC* Δ*ompA*	Double mutant isogénique de la souche LA5 délétée des gènes *ompC* et *ompA* (NAL^R)	Cette étude
Δ*ompC* Δ*ompD*	Double mutant isogénique de la souche LA5 délétée des gènes *ompC* et *ompD* (NAL^R)	Cette étude
Δ*ompC* Δ*ompF*	Double mutant isogénique de la souche LA5 délétée des gènes *ompC* et *ompF* (NAL^R)	Cette étude

SPT : spectinomycine, NAL : acide nalidixique, R : résistant.

I. Bactériologie

I.1. Souches, vecteurs et milieux de culture

Les souches utilisées sont présentées dans la Table 1A et les plasmides, dans la Table 1B.
Les différentes souches sont conservées à -80°C, dans un milieu de culture additionné de glycérol (50% final). Elles sont pré-cultivées dans 10 mL de milieu TSB (Tryptone Soya Broth : peptone de caséine 17 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4, 2.5 $g.L^{-1}$; glucose, 2.5 $g.L^{-1}$; NaCl, 5 $g.L^{-1}$) ou en milieu LB (Luria Bertani : Tryptone 10 $g.L^{-1}$, extrait de levure 5 $g.L^{-1}$, NaCl 10 $g.L^{-1}$) à 37°C, sous agitation la veille de chaque expérience et elles sont en général cultivées après une dilution au 1 : 100 le lendemain dans le même milieu que la préculture.
En fonction des souches utilisées, un antibiotique peut être ajouté au milieu de culture à la concentration finale suivante : CAR (100 $\mu g.mL^{-1}$), NAL (20 $\mu g.mL^{-1}$), KAN (50 $\mu g.mL^{-1}$).
Dans les différentes expériences, quand nécessaire, la croissance des bactéries a été suivie à l'aide d'un spectrophotomètre (appareil Spectronic 20 genesys) en mesurant l'absorbance de la culture diluée au 1 : 5 à une longueur d'onde de 600nm.
Notons que la transcription des gènes clonés dans les vecteurs pTrcHisA et pBAD24 a été induite par ajout dans le milieu de culture, d'IPTG (1mM final) ou d'arabinose (0,2% final) respectivement.

I.2. Transformation bactérienne

Il existe deux types de transformations bactériennes : la transformation par choc thermique (utilisée lors des clonages) et la transformation par choc électrique ou électroporation (utilisée lors des transformations plasmidiques).
Concernant la **transformation par choc thermique**, des bactéries chimio-compétentes (*E.coli* MC1061) dont on dispose au laboratoire (préalablement préparées à partir de lavages en $CaCl_2$ 50 mM d'une culture bactérienne à $DO_{600nm} \approx 0,4$) conservées à -80°C, dans une solution de glycérol 15% final, sont mises en contact avec l'échantillon d'ADN souhaité (environ 500 ng pour 100 µL de bactéries compétentes, c'est-à-dire environ 2.10^7 bactéries).
Après 30 mn dans un bain-marie glacé, le mélange est placé 5 mn à 42°C puis 10 mn dans la glace.
Les souches de *Salmonella* ont été transformées par **électroporation**. On effectue une dilution au 1 : 100 à partir d'une préculture en milieu LB, dans 10mL de milieu LB. Elle est incubée à

Table 1B. Plasmides utilisés

Plasmide	Principales caractéristiques	Source
pACYC177	Vecteur de clonage (CAR^R, KAN^R)	(Chang *et al.*, 1978)
pTrcHisA	Vecteur d'expression (CAR^R), promoteur inductible à l'IPTG	Invitrogen
pAC*bamB*	pACYC177 portant le gène *bamB* sauvage de *S.* Enteritidis (CAR^R)	(Fardini *et al.*, 2007)
pTrcHis*bamB*	pTrcHisA portant le gène *bamB* sauvage de *S.* Enteritidis et produisant la protéine $_6$His-BamB (CAR^R)	V.Gaudon, laboratoire
pBAD*bamB*(L173S)	pBAD24 portant le variant *bamB* de *E. coli* produisant BamB(L173S)-His_6 (CAR^R), promoteur inductible à l'arabinose	(Vuong *et al.*, 2008)
pBAD*bamB*(R176A)	pBAD24 portant le variant *bamB* de *E. coli* produisant BamB(R176A)-His_6 (CAR^R)	(Vuong *et al.*, 2008)
pBAD*bamB*(D227A)	pBAD24 portant le variant *bamB* de *E. coli* produisant BamB(D227A)-His_6 (CAR^R)	(Vuong *et al.*, 2008)
pBAD*bamB*(D229A)	pBAD24 portant le variant *bamB* de *E. coli* produisant BamB(D229A)-His_6 (CAR^R)	(Vuong *et al.*, 2008)
pBAD*bamB*(L173S,L175S,R176A)	pBAD24 portant le variant *bamB* de *E. coli* produisant BamB(L173S,L175S,R176A)-His_6 (CAR^R)	(Vuong *et al.*, 2008)
pAC*bamB*(L173S)	pACYC177 portant le variant *bamB* de *E. coli* produisant BamB(L173S)-His_6 (CAR^R)	Cette étude
pAC*bamB*(R176A)	pACYC177 portant le variant *bamB* de *E. coli* produisant BamB(R176A)-His_6 (CAR^R)	Cette étude
pAC*bamB*(D227A)	pACYC177 portant le variant *bamB* de *E. coli* produisant BamB(D227A)-His_6 (CAR^R)	Cette étude
pAC*bamB*(D229A)	pACYC177 portant le variant *bamB* de *E. coli* produisant BamB(D229A)-His_6 (CAR^R)	Cette étude
pAC*bamB*(L173S,L175S,R176A)	pACYC177 portant le variant *bamB* de *E. coli* produisant BamB(L173S,L175S,R176A)-His_6 (CAR^R)	Cette étude
pAC*bamB*Δ*ps*	pACYC177 portant *bamB* de LA5 produisant BamB sans peptide signal (CAR^R)	Cette étude
pTrcHis*bamB*-K82A	pTrcHisA portant le gène *bamB* de LA5 et produisant la protéine $_6$His-BamBK82A (CAR^R)	Cette étude

CAR : carbénicilline, KAN : kanamycine, R : résistant.

37°C sous agitation jusqu'à une DO_{600nm} d'environ 0,8 pour l'électroporation d'un plasmide. Il est important que toutes les étapes qui suivent s'effectuent à froid. La culture est ensuite centrifugée à 16000 *g* pendant 3 mn à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 10 mL de glycérol 10% stérile et froid. Cette étape de lavage est répétée 3 fois avec la solution de glycérol 10% puis le culot est repris dans un volume de 200 µL en glycérol 10% stérile et froid. Les bactéries compétentes sont mises en contact avec l'ADN durant 1 mn dans la glace (à 100 µL de suspension bactérienne est ajouté 50 ng d'ADN plasmidique). Le mélange est introduit dans une cuve d'électroporation 0,2 cm stérile conservée à -20°C (Biorad). L'appareil permettant l'électroporation (Bio-rad micro Pulser) est réglé sur le programme Bacteria *E. coli* 2 (2,5 kVolts) adapté aux cuves 0,2 cm (Biorad).

Après chaque transformation (électroporation ou choc thermique), les bactéries transformées sont rapidement incubées une heure dans 1 mL de bouillon SOC (Hydrolysat de caséine 20 $g.L^{-1}$, extraits de levure 5 $g.L^{-1}$, NaCl 10 mM, KCL 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucose 20 mM) à 37°C sous agitation. 200 µL de la culture sont étalés sur une gélose TSA avec l'antibiotique de sélection adéquat. La culture est centrifugée 5 mn à 10 000 *g*, le surnageant est éliminé, puis le culot est repris dans 200 µL de bouillon SOC et étalé sur une nouvelle gélose. Les milieux gélosés sont enfin incubés 18 h dans une étuve à 37°C.

I.3. Transduction bactérienne

La transduction consiste en un transfert génétique au cours duquel un ou plusieurs gènes sont transmis d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par l'intermédiaire d'un bactériophage dit transducteur. Ces gènes sont encapsidés par le bactériophage à la suite de sa multiplication dans la bactérie donneuse génétiquement différente de la bactérie receveuse. Nous avons utilisé le phage P22HT105*int* (Anderson et Roth, 1978) pour transférer de l'ADN de la souche de salmonelle donneuse LK5 *hsdR* $^{-}$ (où le système de restriction est inactif) vers la souche de salmonelle receveuse LA5 (qui est *hsdR* $^{+}$), suite à notre protocole de mutagénèse par délétion (décrit dans le paragraphe II.9.). Ce phage permet une encapsidation de fragments d'ADN de 30 kb au maximum.

Pour cela, environ 100 µL d'une préculture de 18h dans 10 mL de milieu TSB (avec antibiotique si nécessaire) sont introduits dans 10 mL de milieu TSB. Une boîte de TSA avec antibiotique si nécessaire est inondée avec ce dernier bouillon puis, séchée après ouverture de la boîte pendant 15-30 mn sous le PSM (poste de sécurité microbiologique). Environ 10^9 phages sont déposés au centre de la gélose. Après une étape de séchage, la boîte est incubée,

couvercle en haut, à l'étuve à 37°C pendant 18h. La plage de lyse est ensuite découpée à l'aide d'une spatule de façon stérile, et incubée dans 20 mL de milieu TSB avec antibiotiques si nécessaire pendant 4h à 37°C avec agitation. 200 µL de $CHCl_3$ y sont ajoutés et le mélange est placé sur la paillasse pendant 1h avant d'être centrifugé 10 mn à 16000 *g*. Le surnageant correspondant au lysat phagique est récupéré et filtré sur filtre 0,22 µm.

La souche receveuse est cultivée dans 10 mL TSB pendant 4 à 5h à 37°C sous agitation à partir de 50 µl d'une préculture de 18h. La culture est entièrement centrifugée 10 mn à 8400 *g*. Le surnageant est éliminé et le culot, repris dans 3 mL de solution MC stérile (solution MC: solution de ($MgSO_4$; $7H_2O$) à 0,1 M final+ solution de ($CaCL_2$; $2H_2O$) à 5 mM final). La $DO_{600\ nm}$ est mesurée et le nombre approximatif de bactéries par millilitre est déterminé, sachant que $DO_{600\ nm}$ = 1 équivaut à 10^9 bactéries.mL^{-1}. Le lysat phagique est ensuite dilué en milieu MC pour avoir un nombre de phages par mL 20 fois et 100 fois inférieur à la suspension bactérienne, respectivement. On place 1 mL de la suspension bactérienne + 1 mL du lysat phagique pour chaque dilution du lysat soit :

-tube n°1 : 1 phage pour 20 bactéries

-tube n°2 : 1 phage pour 100 bactéries

Après une incubation de 20 mn à 37°C, chaque mélange est vortexé puis centrifugé 3 mn à 8400 *g*. Le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 mL de tampon citrate trisodique 1%. Deux lavages supplémentaires sont effectués dans ce tampon. Chaque culot est repris dans 1 mL de tampon citrate trisodique 1%. Pour chaque suspension, 200 µL de suspension pure et 200 µL de la dilution à 10^{-1} sont déposés sur TSA avec les antibiotiques nécessaires. Les milieux gélosés sont enfin incubés 18h à 37°C.

I.4. Antibiogramme

A partir de précultures bactériennes sur la nuit (en présence d'antibiotique, d'arabinose ou d'IPTG si nécessaire), des suspensions bactériennes sont préparées de façon à présenter une turbidité proche de celle du standard McFarland 0,5 (utilisation d'un densitomètre). Les milieux gélosés de Mueller Hinton (MH) (Infusion de viande de bœuf, 300 $g.L^{-1}$; hydrolysat de caséine, 17,5 $g.L^{-}1$; amidon, 1,5 $g.L^{-1}$; agar, 17 $g.L^{-1}$; eau distillée quantité suffisante pour (qsp) 1 L), additionnés d'arabinose si nécessaire, sont inondés par ces suspensions bactériennes. Après séchage des géloses, des disques d'antibiotiques de 6mm de diamètre (fournisseur : Biorad) ont été déposés stérilement grâce à un distributeur, selon les recommandations de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility

Testing). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18h et les diamètres d'inhibition sont ensuite mesurés pour chaque antibiotique testé.

I.5. Expériences in vivo

Un modèle murin d'infection systémique létale est utilisé et le protocole mis en place nous permet d'évaluer le niveau de colonisation de la rate, qui est, en conditions normales, un organe stérile (Pardon *et al.*, 1986).

I.5.1. Infection expérimentale des souris

Pour la préparation des inocula, une préculture en TSB est effectuée pour chaque souche. Le lendemain, une dilution est effectuée au 1 : 100 dans 400 mL de TSB (avec antibiotique si nécessaire) et la culture est mise sous agitation à 37°C pendant 24 heures. Une centrifugation a lieu à 4°C, à 3000 *g*, pendant 20 mn. Le surnageant est éliminé et le culot est repris de façon homogène dans 15 mL d'eau physiologique tamponnée stérile contenant du glycérol 50% final. Ce mélange est réparti en aliquots de 1 mL dans des cryotubes de 1,8 mL et les tubes sont conservés à -80°C.
Afin de titrer les inocula, un tube est décongelé pour chaque souche et 1 mL est utilisé pour une série de dilutions en tubes d'eau physiologique tamponnée stérile de 10 mL final. La DO_{600nm} est mesurée sur la dilution au 1 : 100 et 200 µL de chaque dilution est étalée sur les milieux gélosés suivants :

- SS (*Salmonella-Shigella*) qui est un milieu sélectif inhibant la croissance des bactéries à Gram positif et permettant de visualiser les bactéries lactose (+) en rose (pouvant fermenter le lactose en acide lactique telles que *E. coli*) et lactose (-) incolores (telles que *S.* Enteritidis qui, de plus, présente au centre de la colonie une coloration noire due à la production de sulfure d'hydrogène)
- SS additionné de carbénicilline pour les souches hébergeant le plasmide pACYC177 afin de voir si le plasmide a bien été maintenu dans nos souches au cours de la préparation des inocula.

Après 16 à 18 heures d'incubation à 37°C, le comptage des colonies s'effectue sur les boîtes et le titre de chaque inoculum est ainsi évalué. En parallèle, 200 µL d'inoculum pur sont

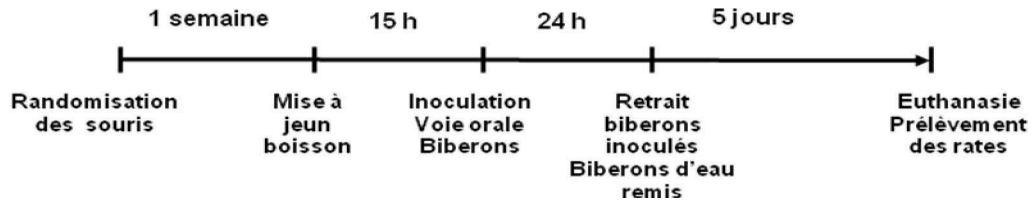


Figure 20. Frise présentant les différentes étapes de l'infection expérimentale des souris Bamb/C par voie orale

La durée entre chaque étape est indiquée au dessus de l'axe.

étalés sur TSA, afin de voir d'éventuelles contaminations après 16 à 18 heures d'incubation à 37°C.

Les expériences *in vivo* ont été effectuées en accord avec les recommandations françaises n° 2001-131 : 4.02.2001 et n° 2001-464 : 29.05.2001 et le protocole a été préalablement approuvé par le "Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale - Centre Limousin" qui est reconnu par le ministère de la recherche (dossier n° 2011/10). Les animaux utilisés sont des souris femelles BALB/c (laboratoire Janvier, Le Genest Saint Isle, France) âgées de 6 à 7 semaines. Les souris sont réparties au hasard, en lot de dix dans chaque cage dotée d'un couvercle filtrant (animalerie INRA, Nouzilly, France). Une semaine d'acclimatation a lieu à la suite de cette répartition.

La veille de l'inoculation, les souris sont privées de boisson durant 15 heures. L'inoculation s'effectue par voie orale avec environ 5.10^8 bactéries par souris. Pour cela, on place un biberon de 150 mL par cage de 10 souris. Chaque biberon a été préparé à partir des inocula titrés et d'eau déminéralisée stérile, pour avoir une solution bactérienne à une concentration finale de $1{,}25.10^8$ bactéries/mL, puisque les biberons restent 24 heures et que chaque souris boit en moyenne 4mL par 24 heures (données antérieures du laboratoire). Les biberons contaminés sont pesés avant et après l'inoculation qui dure 24 heures afin d'évaluer le volume d'inoculum bu par chaque lot de souris. Des biberons d'eau sont remis après l'inoculation. Les différentes étapes de cette expérience peuvent être résumées par la frise suivante (Figure 20).

Les souris sont euthanasiées 5 jours post-inoculation suite à une anesthésie au CO_2 suivie d'une dislocation cervicale et les rates sont prélevées de façon aseptique puis placées dans des sacs individuels préalablement pesés (*Stomacher*). Les rates sont ensuite pesées et broyées à l'aide d'un rouleau, 2 mL de TSB sont ajoutés à chaque prélèvement et l'homogénéisation du broyat se fait pendant 2 mn sur un homogénéiseur (*Stomacher 80*) à vitesse rapide. Une gamme de dilution est effectuée de 10^{-1} à 10^{-6} et 200 µL de chaque dilution sont étalés sur milieux SS et SS+CAR. Les boîtes sont incubées 16 à 18 heures à 37°C et le nombre de colonies est déterminé par comptage. Le nombre de bactéries par gramme de rate est évalué pour chaque souris. Des tests statistiques paramétriques ont ensuite été effectués car la distribution de nos échantillons est normale. Un test d'analyse de variance (ANOVA) réalisé avec le logiciel *Systat 13* permet de voir si les différences observées entre les lots de souris sont dues ou non au hasard. Si la différence n'est pas due au hasard, (*pvalue* < 0,05), un test de Tuckey-Kramer permet de comparer, deux à deux, les lots de souris.

I.5.2. Préparation du sérum polyclonal anti-BamB

Avant mon arrivée au laboratoire, le sérum polyclonal anti-BamB a été obtenu par Y. Fardini, par trois injections sous-cutanées sur trois lapins mâles de lignée New Zealand White à des intervalles de 15 jours. Les injections ont été effectuées avec 40 µg de protéine 6His-BamB de *S.* Enteritidis purifiée à partir du plasmide pTrcHisA-*bamB*. L'émulsifiant utilisé est l'adjuvant de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Au cours du protocole, des prélèvements de sans ont été réalisés afin de vérifier la réactivité et la spécificité des séra obtenus, par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et western-blot.

II. Biologie moléculaire

II.1. Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN sont toutes effectuées sur un culot bactérien après centrifugation de 5 mL d'une culture bactérienne en TSB (en présence d'antibiotique si nécessaire) de 16 à 18 heures.

II.1.1. ADN chromosomique

L'extraction de l'ADN est effectuée grâce au kit DNeasy (Qiagen). Pour extraire l'ADN de *Salmonella*, une étape initiale de 15 mn de lyse à température ambiante par ajout de lysozyme (1mg.mL^{-1} final) au mélange contenant le culot bactérien et la solution P1 est nécessaire. La suite de l'extraction est réalisée selon les recommandations du fournisseur.

II.1.2. ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique est effectuée grâce au kit QIAprep Miniprep (Qiagen). Pour extraire un plasmide d'une souche de *Salmonella*, une étape initiale de 15 mn de lyse à température ambiante par ajout de lysozyme (1mg.mL^{-1} final) au mélange contenant le culot bactérien et la solution P1 est nécessaire. La suite de l'extraction est réalisée selon les recommandations du fournisseur.

II.2. Quantification d'ADN

La concentration d'ADN est déterminée par un dosage de la DO à 260 nm au spectrophotomètre Nanodrop (Labtech). Cet appareil mesure également la DO à 280 nm. Pour rappel, le rapport DO 260 / DO 280 reflétant la qualité de l'extraction de l'ADN, doit être compris entre 1,8 et 2.

II.3. Restriction enzymatique

Chaque mélange réactionnel est composé de 3 µL de tampon adéquat à l'activité de l'enzyme de restriction utilisée (1X final contenant de la BSA, Promega), 1 Unité enzymatique (Promega), 500 ng d'ADN à restreindre et une quantité suffisante d'eau ultra pure pour obtenir un volume final de 30 µL. Le mélange a ensuite été placé 1 heure dans un bain-marie à 37°C ou 25°C, en fonction de la température d'activité de l'enzyme utilisée.

II.4. Ligation

La T4 DNA Ligase modifiée lie de façon covalente les extrémités 5' et 3' de deux brins d'ADN. Pour chaque ligation, environ 250 ng de plasmide sont mis en contact avec 1250 ng d'insert et le volume est ajusté à 5 µL en Tris-HCl (100 mM) – $MgCl_2$ (5 mM) à pH 7,6. Ensuite le mélange est mis en contact avec deux solutions du kit DNA ligation kit (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France), 25 µL de la solution A (contenant le tampon de l'enzyme) et 5 µL de solution B (contenant la ligase), d'après les recommandations du fournisseur. La ligation s'effectue à 16°C pendant au moins 30 mn.

II.5. PCR

II.5.1. Milieu de réaction et programme

Dans le cas où l'on souhaite obtenir une séquence fidèle de l'ADN matrice, les PCR sont réalisées en utilisant l'Herculase Hotstart DNA Polymérase (Stratagene) qui est dotée d'une activité correctrice.

Chaque mélange réactionnel est composé de : 5 µL de tampon 10X contenant du $MgCl_2$ (Stratagene), 0,4 µL de dNTP à 25 mM (Promega), 1 µL de chacune des amorces sens et anti-

Table 2. Liste des amorces utilisées.

Amorce	Séquence (5'--> 3') et caractéristiques
ompA-P_1	CTCGTTGGAGATATTCATGGCGTATTTTGGATGATAACGAGGCGCAAAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ompA-P_2	TTTTTTATCAGACGGAAACTTAAGCCTGCGGCTGAGTTACCACGTCTTTACATATGAATATCCTCCTTAG
ompC-P_1	AAGCAGTGGCATAAAAAAGCAATAAAGGCATATAACAGAGGGTTAATAACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ompC-P_2	CCGCAGGCCCTTTAGCAACATCTTTTGCTGATTAGAACTGGTAAACCAGACATATGAATATCCTCCTTAG
ompD-P_1	TTTAACAATGGTTGAGGAAACACGCTAAGAAAATTATAAGGATTATTAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ompD-P_2	GCCAGCCCTGAAAGGACTGGCTTTGTATTCAGACTACAACAAAATTAGAACATATGAATATCCTCCTTAG
ompF-P_1	TGACGGCAGTGGCAGGTGTCATATAAAAAAACCAATGAGGGTAATAAATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ompF-P_2	AGGACCGAAGTCCTGTTTTTGAGGCATAAAACAAAGGGGTCTGCTGATCACATATGAATATCCTCCTTAG
bamB-K82A-clonage-mut	ACC AGA TCT CTT TGC CAT CAT CCG CAT TGA GCG CTG CTA CCA CGC CCG CG
bamB-clon-pBAD-to-pAC-for	TTG TAC CCG GGC GAG AGG GAC CCG ATG
bamB-clon-pBAD-to-pAC-rev	TAG AAG CTT AGT GAT GGT GAT GGT GAT G
$YfgL_{20}$	TGT TCA CTG TTT AGC GGC GAA G (phosphate en 5')
$YfgL_{21}$	CAT CGG GTC CCT CTC AGA TGG AC (phosphate en 5')
$YfgM_4$	CGA TAA GCC GGA TAG CAT TCC CGC CGC TG
$YfgK_5$	CGG TCA CGA GTC AGA CCC GGG AAA TCC
pACYC177-1	CAGACTAAACTGGCTGACGG
pACYC177-2	TCTGCGATTCCGACTCGTCC
pBAD24-1	CTA CTG TTT CTC CAT ACC CG
pBAD24-2	AAA ATC TTC TCT CAT CCG CC
pTRC-His-for	GGC TAG CAT GAC TGG TGG ACA GC
pTRC-His-rev	ACT TTC ACC AGC GTT TCT GGG

Les bases soulignées correspondent à des sites de restriction enzymatique. Les bases surlignées en jaune correspondent aux mutations ponctuelles que l'on souhaite introduire dans l'amplicon.

sens à 10 µM (Eurogentec), 0,5 µL d'Herculase à 5 U. μL^{-1} et 1 µL d'ADN à environ 40 ng. μL^{-1} ou de l'eau ultra pure pour le témoin négatif. Le volume réactionnel final est ajusté à 50 µL avec de l'eau ultra pure stérile.

Dans le cas où l'on n'a pas besoin d'être fidèle à l'ADN de matrice, l'enzyme Uptitherm (Interchim) qui n'a pas d'activité correctrice est utilisée. Avec cette enzyme, chaque mélange réactionnel est composé de : 2,5 µL de Tampon 10X, 0,75 µL de $MgCl_2$ à 250 mM, 0,2 µL de dNTP à 25mM (Promega), 1,25 µL de chacune des amorces sens et anti-sens à 10 µM (Eurogentec), 0,15 µL d'Uptitherm à 5 U. μL^{-1} et 1 µL d'ADN à environ 40 ng. μL^{-1} ou de l'eau ultra pure pour le témoin négatif. Le volume réactionnel final est ajusté à 25 µL avec de l'eau ultra pure stérile.

Les amplifications sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur (Biorad My Cycler). La première étape consiste en un cycle de dénaturation à 95°C pendant 2 mn puis de 30 cycles composés de 3 étapes : l'hybridation qui se réalise à une température spécifique pour chaque couple d'amorces et dure 30 secondes par cycle, l'élongation qui est réalisée à 72°C pendant le temps nécessaire à la synthèse d'un nouveau fragment, sachant que 1000 pb sont synthétisées en 1 mn environ et la dénaturation effectuée à 95°C pendant 30 secondes par cycle. La PCR se termine enfin par 1 mn à la température d'hybridation des amorces et 7 mn d'élongation à 72°C afin de terminer l'amplification.

II.5.2. Amorces utilisées

Les amorces utilisées sont répertoriées dans la Table 2. Elles ont été synthétisées par la société Eurogentec et nous les avons utilisées pour générer un produit PCR.

II.6. Purification d'ADN à partir d'un gel d'agarose et purification d'amplicons et de produits de digestion

Suite à la migration d'un fragment d'ADN sur un gel d'agarose (généralement un plasmide digéré dans le cadre d'un clonage), l'extraction de ce fragment est effectuée grâce au kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

La purification des amplicons obtenus après PCR ou la purification des produits d'une digestion enzymatique permet d'éliminer la présence d'amorces, d'enzymes, de dNTP ou de

tampon contenus dans le mélange réactionnel initial. La purification est effectuée grâce au kit QIAquick PCR purification (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

II.7. Séquençage

Le séquençage est réalisé afin de vérifier la séquence d'un fragment d'ADN. Les réactions de séquençage sont réalisées par la société Beckmann Coulter Genomics selon la méthode de Sanger. Le principe de cette méthode repose sur une amplification de l'ADN de type PCR à partir d'une amorce se fixant sur un brin d'ADN. Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés avec une faible concentration de quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) portant chacun une sonde chromogène de couleur différente. Ces didésoxyribonucléotides agissent comme des terminateurs de chaîne puisqu'une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation en marquant d'une couleur spécifique le didésoxyribonucléotide nouvellement incorporé. Il est ainsi possible de déterminer la séquence d'un fragment d'ADN grâce à un détecteur. Les séquences sont ensuite analysées grâce aux modules Contig Express et AlignX du logiciel Vector NTI (Invitrogen).

II.8. Mutagénèse par délétion

La délétion chromosomique d'un ORF est effectuée selon la méthode de Datsenko et Wanner (Datsenko et Wanner, 2000). Le principe consiste à générer un produit PCR (cf paragraphe I.5) contenant un gène de résistance au chloramphénicol ou à la kanamycine, en utilisant les plasmides matrices pKD3 ou pKD4 respectivement ainsi que les couples d'amorces P_1 et P_2 présentés dans le tableau d'amorces, flanqué des régions amont et aval du gène d'intérêt à déléter. Le produit PCR est ensuite introduit par électroporation (cf paragraphe I.2 avec la différence que la DO_{600nm} à atteindre est d'environ 0,3 et que la culture se fait à 30°C en présence d'arabinose) dans la souche de *S.* Enteritidis LK5 *hsdR* $^{-}$ (SPT^{R}) porteuse du plasmide thermosensible pKD46 produisant la recombinase λ red à partir d'un promoteur inductible à l'arabinose. Les colonies résistantes au chloramphénicol et à la kanamycine obtenues sont incubées à 37°C pendant une nuit. Après avoir curé le plasmide pKD46 des clones sélectionnés par leur caractère résistant à l'antibiotique, on peut y introduire, par électroporation, le plasmide thermosensible pCP20 produisant la recombinase FLP permettant

d'éliminer le fragment d'ADN contenu entre deux régions FRT (c'est-à-dire ici, la cassette de résistance à l'antibiotique).

II.9. Electrophorèse en gel d'agarose

Chaque échantillon est additionné de 3 µL de tampon de charge (Glycérol 3%; Tris-acétate 40mM pH 8; EDTA 1mM; bleu de bromophénol 0,02%). Un marqueur de taille (1 kb DNA ladder, Promega) est migré en même temps que les échantillons sur un gel d'agarose (en général 0,7% d'agarose contenant 2 µL de GELRed (Interchim) pour 100 µL de tampon TAE 0,5 X). La migration est réalisée en tampon TAE 0,5X à 8 Volts.cm^{-1}. A la fin de l'électrophorèse, le gel est exposé à un rayonnement UV (appareil Gel Doc, Biorad) afin d'observer les fragments d'ADN.

III. Biochimie

III.1. Co-immunoprécipitation

Les expériences de co-immunoprécipitations suivent le protocole de Vuong *et al.*, (Vuong *et al.*, 2008) avec cependant quelques modifications: 40 mL de culture en LB sont culottés et repris dans 300 µl de tampon de lyse (Tris-HCl pH 8, 50 mM ; NaCl 100 mM ; EDTA 0.1 mM ; lysozyme 0,35 µM , Triton 0.1%). Après 30 mn d'incubation dans la glace, les extraits protéiques contenus dans les lysats sont solubilisés avec 1 mL de BugBuster (Novagen), 1 µL de DNase benzonase (Novagen) et du phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 0,1 mM. Les échantillons sont placés 20 mn à température ambiante sous agitation sur une roue Labover (Meridis) puis centrifugés pendant 25 mn à 20000 *g*. Les surnageants sont récupérés et, pour chaque souche, la concentration de protéines est déterminée en mesurant la DO à 280 nm au spectrophotomètre Nanodrop (Labtech). L'expérience est effectuée à partir de 11 mg de protéines qui sont précipitées avec 100 µl de billes de sépharose couplées à la protéine G (Sigma) pendant 1 h, à température ambiante, sur la roue. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 3 mn à 180 *g*. Les culots correspondant aux protéines fixées aux billes de manière aspécifique sont éliminés et les surnageants sont récupérés, séparés dans 2 tubes, à volume égal pour chaque échantillon. Un volume par échantillon est incubé avec un sérum polyclonal anti-BamB et placé pendant 1 h, à température ambiante, sur la roue. 50 µl de billes de sépharose couplées à la protéine G (Sigma) sont ensuite ajoutées aux deux tubes pour

chaque échantillon, pour l'étape de fixation spécifique et placés sur la roue pendant 1h à température ambiante. Les échantillons sont ensuite placés sur colonne (Spin Columns, Sigma) et cinq lavages ont été effectués avec 500 µL d'une solution de Tris-HCl 50mM pH8, NaCl 350 mM, EDTA 0,1 mM. Les précipitats sont enfin élués par ajout de 50 µL de tampon de Laemmli 5X (Tris-HCL 0,5M 2mL, β-mercaptoéthanol 0,8 mL, SDS 10% 3,2 mL, Glycérol 100% 3,2 mL, bleu de bromophénol 1X 1,6 mL, eau 5,2 mL) (Laemmli, 1970) puis chauffés 5 min à 99°C.

III.2. Extraction de protéines en condition d'expression du T3SS-1

III.2.1. Protéines sécrétées

Comme décrit par Arricau *et al.* (Arricau *et al.*, 1998), une préculture dans 10 mL de bouillon TSB des souches d'intérêt est effectuée sur la journée avec antibiotique si nécessaire. Le soir 100 µL de cette préculture sont transvasés dans un nouveau bouillon TSB de 10 mL additionné d'antibiotique. L'incubation sous agitation est réalisée dans une étuve programmable à 37°C afin que le lendemain, les bactéries soient en fin de phase exponentielle de croissance. En parallèle, des erlens de 250 mL avec 30 mL de milieu LB contenant du NaCl à 0,3 M, ainsi que des antibiotiques et de l'arabinose si nécessaire, sont préparés et placés à 37°C pendant 18h. Le milieu LB NaCl 0,3 M mime l'osmolarité que rencontre la bactérie dans l'intestin. Le lendemain, 300 µL de chaque préculture de l'étuve programmable sont ensemencés dans les erlens et mis à incuber à 37°C sous agitation jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm soit comprise entre 1,8 et 2.

25 mL de culture des erlens sont transvasés dans des tubes Corning de 50 mL. Un témoin de précipitation (90 µL de β-lactoglobuline à 1mg.mL^{-1}) est ajouté à chaque tube et les tubes sont mis à centrifuger 15 mn à 7000 *g*. Ensuite, 17 mL de surnageant sont prélevés, filtrés sur filtre 0,22 µm puis transférés dans des tubes Corex à 4°C. Dans chaque tube sont ajoutés 2 mL de TCA 100% (acide tri-chloro-acétique). Après mélange, les tubes sont laissés 30 mn dans la glace puis centrifugés 30 mn à 10000 *g* à 4°C. Enfin, le surnageant est éliminé et le culot est repris à l'aide de 100 µL de tampon de Laemmli 5X. L'acidité de l'échantillon due à des traces éventuelles de TCA est neutralisée par un ajout de 1 à 2 µL de soude 10N. L'intégralité de chaque échantillon est recueillie dans des tubes Eppendorfs, le volume de protéines récupéré est mesuré puis les échantillons sont conservés à -20°C.

III.2.2. Protéines du culot bactérien

Dans le but d'effectuer une migration monodimensionnelle des protéines du culot bactérien, 1 mL de la culture en milieu LB NaCl 0,3M qui a servi à l'extraction des protéines secrétées est prélevé et centrifugé 3 mn à 13000 *g*. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 100 µL de tampon de Laemmli 5X. Les échantillons sont conservés à -20°C.

Dans le but d'effectuer une migration bidimensionnelle des protéines du culot bactérien, chaque culot bactérien est repris, après centrifugation, dans 1mL de tampon PBS (Phosphate Buffered Saline : NaCl, 137 mM ; KCl, 2,7 mM ; $Na_2HPO_4.2\ H_2O$, 10 mM ; KH_2PO_4, 2mM) sans calcium ni magnésium. La concentration des protéines est déterminée par un dosage de type Bradford (kit Biorad, selon les recommandations du fournisseur) et l'expérience est mise en place à partir de 30 µg de protéines par souche.

III.3. Extraction des protéines membranaires totales

Comme décrit précédemment (Fardini *et al.*, 2009), à partir d'une préculture en TSB incubée de 16 à 18h à 37°C sous agitation, 30 mL de milieu LB sont ensemencés au 1 : 100 (avec ajout d'antibiotique et d'inducteur de transcription quand cela est nécessaire) jusqu'à atteindre une DO_{600nm} comprise entre 0,8 et 1. La totalité de la culture est centrifugée 10 mn à 7000 *g* à 4°C et le culot est lavé avec 6 mL de tampon Tris 25 mM pH 7,4. L'étape de centrifugation est réitérée dans les mêmes conditions. Le culot est à nouveau repris dans 6 mL de tampon Tris 25 mM pH 7,4 et toutes les étapes qui suivent ont lieu dans la glace. A chaque échantillon sont ajoutés 1 µL de DNaseI 2 $mg.mL^{-1}$ (Sigma) et 200 µL PMSF 100 mM (Sigma). Chaque extrait est soniqué sur un Appareil Branson (Digital Sonifier Cell Disruptor) selon le programme suivant : 10 pulses de 30 sec, amplitude 30 % interrompus par 40 sec de pause dans la glace.

Il s'en suit une centrifugation pendant 10 mn à 8000 *g* à 4°C en tube Falcon 50 mL. Le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau à 8000 *g* pendant 10 mn à 4°C en tube Corex 30 mL afin d'éliminer d'éventuelles contaminations par les protéines du culot.

5,1 mL de surnageant est chargé à l'aide d'une seringue dans un tube Polyallomer Quick-Seal (Beckmann). On effectue une ultra-centrifugation de 15 mn à 216000 *g* à 4°C dans un rotor sw60Ti (Beckmann). Chaque culot est repris directement dans 100 µL de tampon Laemmli 5X. Les échantillons sont conservés – 20°C.

III.4. Fractionnement cellulaire

A partir d'une préculture sur la nuit, 25 mL de milieu LB sont inoculés au 1/100 jusqu'à atteindre une DO à 600 nm d'environ 0,4. 2mL de culture sont collectés pour chaque souche. Après 5 mn de centrifugation à 5000 *g*, le culot est repris dans 30 µL de Tris 10mM pH 8,2 ; EDTA 5mM ; sucrose 20% et incubé 10 mn dans la glace. Le tube est centrifugé 3 mn à 10000 *g*, le surnageant est éliminé et le culot est repris rapidement dans 30 µL de tampon Tris 10mM pH 8,2 ; $MgCl_2$ 0,5mM. On vortexe et mélange de façon homogène à l'aide d'une pipette puis on incube 10 mn dans la glace. Après une centrifugation de 3 mn à 10000 *g*, le surnageant est transféré dans un nouveau tube et constitue la **fraction périplasmique**. 50 µL de tampon Laemmli 5X est ajouté à cette fraction. Le culot est quant à lui repris dans 50 µL de Tris 10mM pH 8,2 ; EDTA 5mM ; lysozyme 1mg/mL final. Après une incubation de 10 mn à 4°C, pendant laquelle on ajoute 1 µL de DNaseI à 20 µg/mL, le tube est placé 5mn à -80°C puis rapidement transféré 5mn à 37°C. Après 30 mn de centrifugation à 10000 *g* à 4°C, le surnageant est collecté et additionné de 50 µL de tampon Laemmli 5X dans un tube correspondant à la **fraction cytoplasmique**. Le culot est lavé-centrifugé (8000 *g*) 5 fois dans une solution de Tris 10mM pH 8,2 ; EDTA 5mM et repris dans 50 µL de tampon Laemmli 5X également : il s'agit de la **fraction membranaire** (membranes interne+externe).
Après 10 minutes d'ébullition des échantillons, 10 µL sont déposés sur gel SDS-PAGE pour les fractions membranaires et 20 µL pour les fractions périplasmiques et cytoplasmiques.

III.5. Purification protéique en conditions natives

Suite à une préculture de 18 h dans 10 mL de TSB avec CAR de la souche *E. coli* TG1 préalablement transformée avec le plasmide pTrcHis*bamB,* 100 mL de milieu TSB avec CAR ont été ensemencés au 1 : 100 jusqu'à atteindre une DO_{600nm}= 0,6. Suite à l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1mM, la culture est incubée 18h à 37°C, puis centrifugée pendant 20 min à 4000 *g.* Le culot bactérien est conservé à –20 °C puis décongelé 15 mn dans la glace. Il est alors repris dans 4 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100mM, PMSF 1mM puis centrifugé à 4°C pendant 30 mn à 10000 *g* et le surnageant est récupéré et mélangé à 100 µL de résine Ni-NTA 50 % 1 h à 4°C (Qiagen). La purification est réalisée sur une colonne PD-10 Sephadex G-25M (Pharmacia). Cette dernière est préalablement lavée deux fois avec de l'eau distillée et équilibrée par le tampon A (Tris-HCl 50mM, pH 7,4, NaCl 50mM, EDTA 1mM). Après incubation, les protéines non retenues par la résine sont

éliminées par rinçage avec le tampon A contenant 15 mM d'imidazole. L'élution est réalisée par deux passages de 30 µL d'un tampon Tris-HCl 50mM, pH 7,4 NaCl 50mM EDTA 1mM, imidazole 200mM. L'éluat peut ensuite être dialysé afin que la protéine se retrouve dans un milieu approprié. Pour cela, des boudins de dialyse (5 cm de long environ) sont utilisés présentant des membranes semi-perméables. Ces boudins sont préalablement bouillis pendant 10 mn dans un grand bécher contenant un tampon $NaHCO_3$ 2% ; EDTA 1 mM, pH 8 avant d'être abondamment rincés avec de l'eau distillée. Une nouvelle étape d'ébullition des boudins est effectuée dans un tampon EDTA 1 mM à pH 8. Les boudins sont ensuite conservés dans ce tampon à 4°C et sont rincés à l'eau distillée avant utilisation. L'éluat est placé dans un boudin que l'on ferme grâce à des pinces. L'ensemble est placé dans un grand bécher contenant le tampon de dialyse à pH 7,4 (Tris-HCl 50mM, NaCl 50mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, glycérol 10%). La dialyse a lieu à 4°C, sous agitation lente pendant 18 h. Enfin, l'extrait protéique contenu dans le boudin est récupéré et conservé à -20°C.

III.6. Electrophorèse SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

III.6.1. Electrophorèse monodimensionnelle

Le gel dénaturant de polyacrylamide est coulé en deux étapes. Dans un premier temps, le gel de séparation à 10% de polyacrylamide (eau distillée 4,10 mL, Acrylamide/Bis acrylamide (37 :1) 3,30 mL, Tampon Tris 1,5M, pH 8,8 ; 2,5 mL, SDS 10% 100 µL, APS (Ammonium Persulfate) 10% 50 µL, Temed 5 µL), puis le gel de concentration à 5% de polyacrylamide (eau distillée 5,7 mL, Acrylamide (37 :1) 1,7 mL, Tampon Tris 1M, pH 6,8 ; 2,50 mL, SDS 10% 100 µL, APS 10% 50 µL, Temed 10 µL) sont coulés. La concentration en polyacrylamide peut être augmentée (12% pour le gel de séparation et 6% pour le gel de concentration) pour une meilleure séparation des protéines d'environ 30kDa.

Avant chaque dépôt, les échantillons sont dénaturés par ébullition au bain-marie à 100°C pendant 10 mn puis refroidis à température ambiante avant d'être déposés dans les puits du gel ainsi que 6 µL du marqueur de taille (All Blue Precision Protein Standard, Biorad). La migration est réalisée dans le tampon suivant : Tris base 30,3 g, Glycine 144 g, SDS 20% 50 mL, H_2O (qsp) 1L avec un voltage de 100 V pour le gel de concentration et de 115 V pour le gel de séparation (pour une taille totale de gel de 7cm x 9cm).

III.6.2. Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) consiste en une séparation des protéines en deux temps :

- L'isoélectrofocalisation (IEF) permet de séparer les protéines selon leur pI.

puis,

- Une migration en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide, perpendiculairement à l'IEF, permettant de séparer les protéines selon leur masse moléculaire.

Pour la première étape, les échantillons sont solubilisés et déposés sur une bandelette de 7cm de longueur englobant une échelle de pH allant de 3 à 5,6. La focalisation est effectuée à 27400 Volts x heures. Pour la seconde étape, des gels SDS-PAGE à 12% d'acrylamide ont été utilisés.

III.7. Coloration de gel SDS-PAGE

III.7.1. Bleu de Coomassie

Suite à une électrophorèse SDS-PAGE, les gels sont incubés 30 mn dans une solution de TCA 12% pour une étape de fixation. Puis, ils peuvent être colorés au bleu de Coomassie (H_3PO_4 85%, 1mL ; $(NH_4)_2SO_4$, 2,7 g ; bleu colloïdal G250, 0,1 g ; méthanol 100%, 20 mL, H_2O, 79 mL) pendant 16h à 18h (Neuhoff *et al.*, 1988). La décoloration s'effectue dans une solution de méthanol 25%.

III.7.2. Nitrate d'argent

Pour colorer un gel SDS-PAGE au nitrate d'argent, on effectue une étape de fixation dans une solution d'éthanol 30%, acide acétique 10% pendant une heure, puis dans une solution d'acide acétique 5% pendant 16 à 18h.

S'en suivent plusieurs étapes de lavages : 10 mn dans de l'éthanol 20%, 10 mn dans de l'éthanol 10% et 2 fois 10 mn dans de l'eau ultrapure stérile. La coloration se fait par un passage successif du gel dans différents bains : 1 mn dans une solution contenant 2 mL de $Na_2S_2O_3$. $5H_2O$ 10%, H_2O qsp 1L ; puis 2 fois 1 mn dans de l'eau ultrapure stérile et 30 mn dans une solution contenant 12,5 mL de $AgNO_3$ 1M, H_2O qsp 1L. Après un passage dans de l'eau ultrapure stérile pendant 1 mn, le gel est placé dans une solution de révélation (K_2CO_3

35 $g.L^{-1}$, 125 $\mu L.L^{-1}$ de $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 10%, 300 µL de formaldéhyde) jusqu'à l'apparition des profils. Enfin, le gel est placé dans une solution de Tris 40 $g.L^{-1}$, acide acétique 20 $mL.L^{-1}$, H_2O qsp 1L avant d'être rincé dans de l'eau.

III.8. Western-blot

Un transfert en milieu liquide du gel SDS-PAGE sur membrane de nitrocellulose (Protran) est effectué sur l'appareil trans-blot electrophoretic transfer cell (Biorad) selon les recommandations du fournisseur, dans une dilution au 1 : 10 du tampon de transfert 10X : Tris 30,3g, glycine 144g, H_2O qsp 1L additionné de 20% de méthanol. Le transfert se fait à voltage constant, 70 V et le temps de transfert est de 45 mn. Après une étape de saturation dans une solution de PBS-lait écrémé 4% pendant 30 mn, chaque membrane est incubée dans une solution d'anticorps primaire diluée dans du PBS-Tween 0,025%-lait écrémé 0,1%. Les dilutions suivantes sont utilisées :

- Sérum polyclonal anti-SipA de lapin (1:2000) (Amy *et al.*, 2004),
- Sérum polyclonal anti- H:g,m de lapin (protéines flagellaires) (1:500) (Biorad),
- Sérum polyclonal anti-Hsp60 de souris (1: 6000) (Assaydesigns-Stressgen),
- Sérum polyclonal anti-BamA de lapin (1: 40000) (J. Malinverni & T.J. Silhavy, Princeton, USA),
- Sérum polyclonal anti-BamB de lapin (1: 6000) (Y. Fardini, INRA Centre de Tours),
- Sérum polyclonal anti-OmpA de lapin (1: 6000) (R. Lloubès, CNRS, Marseille),
- Sérum monoclonal anti-phospho-sérine de souris (1 : 1000) (Sigma).

Suite à une série de 4 lavages de 5mn dans du PBS-Tween 0,025%, chaque membrane est incubée dans une solution d'anticorps secondaires couplés à la péroxydase (sérum contenant des IgG de chèvre anti-IgG de lapin) (1:10000, Dako) excepté pour les membranes incubées avec l'anti-Hsp60 pour lesquelles un sérum contenant des IgG de lapin anti-IgG de souris (1:5000, Dako) est utilisé. Cet anticorps est également couplé à la péroxydase. Suite à une série de 3 lavages de 5 mn en PBS-Tween 0,025% et un lavage en PBS, la révélation est réalisée avec le kit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) par chimioluminescence selon les recommandations du fournisseur. L'incubation a lieu à l'obscurité, à température ambiante et l'acquisition se fait sur l'appareil Fluorchem (Alpha Innotech).

III.9. Test de phosphorylation

Ce test a été effectué par l'équipe de M. Duclos (IBCP de Lyon). Avant d'effectuer le test de phosphorylation, la protéine recombinante $_6$His-BamB est déphosphorylée par la phosphatase alcaline extraite d'intestin de veau CIAP (Promega) (0,08 U d'enzyme par µg de protéine), pendant 1h à 37°C. Puis, un inhibiteur de la phosphatase alcaline (10 mM de sodium fluoride (NaF)) est ajouté et le mélange est incubé pendant 10 mn à 37°C.

Le test de phosphorylation est réalisé sur environ 1 µg de protéines auquel est ajouté 20 µL de tampon Tris-HCl 25 mM pH 7,5; EDTA 1mM ; DTT 1 mM ; $MgCl_2$ 2,5mM; $MnCl_2$ 2,5mM contenant de l'ATP froid 10 µM et [γ^{32}P-ATP] 0,5 µCi/µL. L'ensemble est incubé à 37° C pendant 30 mn et du tampon de Laemmli est ajouté à volume égal.

Après migration de l'extrait protéique sur un gel SDS-PAGE 12%, le gel est incubé dans une solution de TCA 16% à 90°C pendant 5 min afin d'éliminer les phosphates libres et d'hydrolyser les acides nucléiques contaminants. Après une étape de séchage, le gel est **autoradiographié** au contact d'un film (BioMax MS-1 Kodak) à -80°C en présence d'un amplificateur pour le ^{32}P.

L'échantillon protéique (en solution ou à partir du gel SDS-PAGE) peut être digéré par la trypsine pour une analyse par **spectrométrie de masse** MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight) (appareil Voyager DE-PRO, Applied Biosystems). Il est important de préciser que dans cet échantillon protéique, la réaction de phosphorylation a été préalablement effectuée en présence d'ATP froid et non radioactif. A partir des masses de peptides obtenus, un programme de recherche (Profound, Mascot) permet l'identification protéique à partir des banques de données (NCBI, Swissprot).

Après migration de l'extrait protéique marqué sur un gel SDS-PAGE, un transfert sur membrane de PVDF (PolyVinyliDene Fluoride) peut également être effectué. La membrane est ensuite rincée à l'eau distillée, séchée et révélée par autoradiographie. Les signaux radiomarqués sont découpés et placé dans un tube. L'**analyse des phospho-acides aminés** est alors effectuée selon la méthode décrite par Duclos *et al.* (Duclos *et al.*, 1991). Cette technique consiste en une première étape d'hydrolyse acide des protéines phosphorylées par ajout de 500 µL de HCl 6N à 110°C pendant 1 h. Après une étape de séchage, l'échantillon est repris dans 5 µL d'un tampon contenant 4 mM de chacun des phospho-acide aminés témoins suivants : phosphosérine, phosphothréonine et phosphotyrosine. Le mélange est déposé sur une plaque de cellulose et soumise à une électrophorèse en première dimension à 800 V pendant 1 h, dans un tampon contenant 2,4% de CH_2O_2 et 7,8% de CH_3COOH. Après

séchage, la plaque de cellulose est soumise à une chromatographie ascendante en deuxième dimension dans un tampon contenant 53% d'isobutanol et 20% de CH_2O_2. Les phospho-acides aminés témoins sont enfin révélés par une solution contenant de l'acétone et 0,02% de ninhydrine. La détection des phospho-acides aminés marqués au ^{32}P de la protéine d'intérêt se fait par autoradiographie.

RESULTATS



Figure 21. Alignement des séquences en acides-aminés de la protéine BamB chez *E. coli* et *S.* Enteritidis.

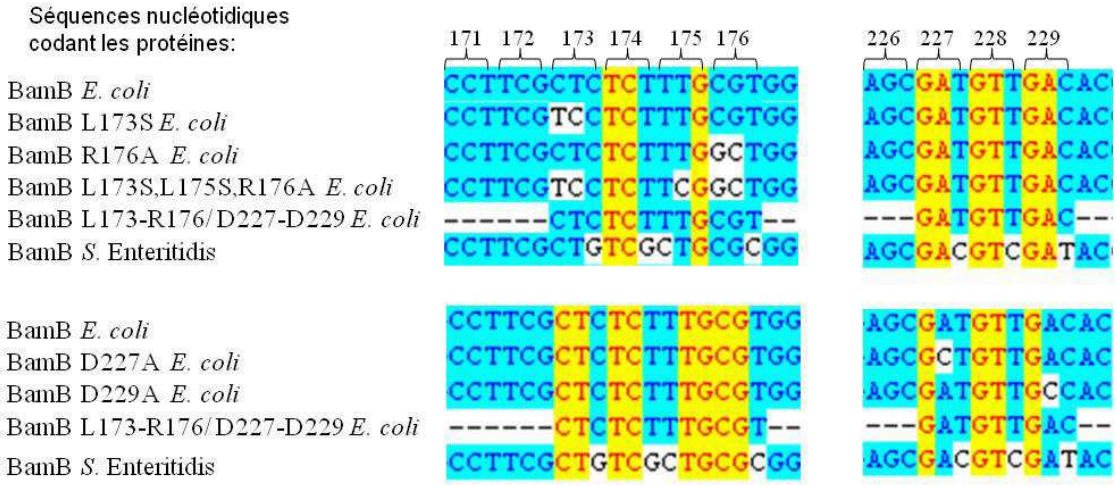


Figure 22. Vérification des séquences nucléotidiques des plasmides pBAD24*bamB* fournis par le Dr R. Misra.

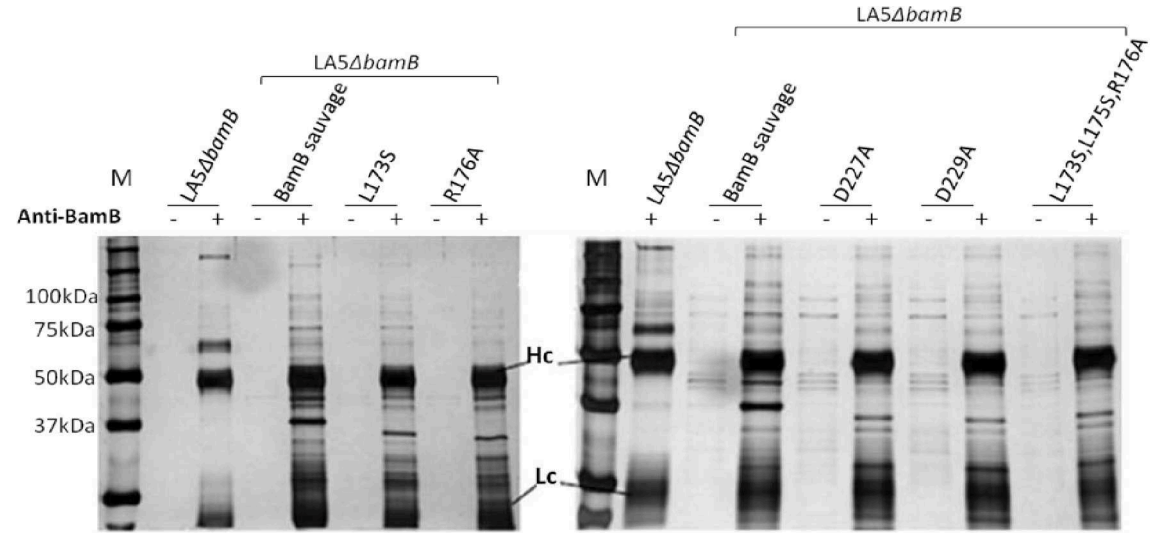
Comme énoncé dans les objectifs de ma thèse, plusieurs données suggèrent un rôle de BamB en dehors du complexe BAM. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons d'une part évalué l'importance de l'interaction BamA/BamB sur les rôles de BamB en étudiant les phénotypes de souches exprimant des variants de BamB capables ou non d'interagir avec BamA, et d'autre part, en séquestrant BamB dans le cytoplasme bactérien. Enfin, nous avons recherché une activité d'autophosphorylation de BamB chez *Salmonella* puisque BamB avait été décrite chez *E. coli* comme ayant une activité sérine-thréonine kinase, suggérant une activité cytoplasmique.

I. Impact des substitutions d'acides aminés dans la protéine BamB sur ses différents rôles chez Salmonella

Les protéines BamB d'*E. coli* et *Salmonella* présentent une identité de 90,6 % en acides aminés. De plus, les acides aminés impliqués dans l'interaction BamA/BamB décrits par Vuong *et al.,* à savoir : L173S, L175S, R176A (seuls ou en association), D227A et D229A sont conservés entre BamB d'*E. coli* et BamB de *Salmonella* (Figure 21) (Vuong *et al.*, 2008), nous avons utilisé ces mutants ponctuels de BamB afin de voir l'impact de la présence ou l'absence d'interaction BamA/BamB sur la perméabilité membranaire, l'expression et la fonctionnalité des T3SS et la virulence de *Salmonella* chez la souris. Pour cela, nous avons choisi d'introduire dans le mutant Δ*bamB* de *Salmonella* les plasmides pBAD-24 envoyés par le Dr Rajeev Misra (Arizona State University, USA) dans lesquels l'ORF *bamB* de *E. coli* présente une ou plusieurs mutations conduisant à la production des protéines BamB L173S ou BamB R176S, altérant peu l'interaction BamA/BamB et les mutations D227A, D229A ou l'association L173S,L175S,R176A altérant fortement l'interaction BamA/BamB chez *E. coli*. Ces plasmides expriment la protéine BamB marquée avec l'étiquette 6His en C-terminal. Suite à une extraction plasmidique, les plasmides ont été vérifiés par PCR et séquençage du gène *bamB* en utilisant les amorces pBAD24-1 et pBAD24-2 (Figure 22) puis introduits dans le mutant Δ*bamB* de la souche *S.* Enteritidis LA5.

Dans ces souches, l'interaction de la protéine BamB avec BamA, la sensibilité aux antibiotiques, leur capacité d'expression du T3SS-1 et du flagelle et leur virulence *in vivo* chez la souris ont été analysés ainsi que la constitution en PME. En témoins, la souche sauvage, le mutant de délétion Δ*bamB* et le mutant complémenté par le gène *bamB* sauvage ont été utilisés.

(A)



(B)

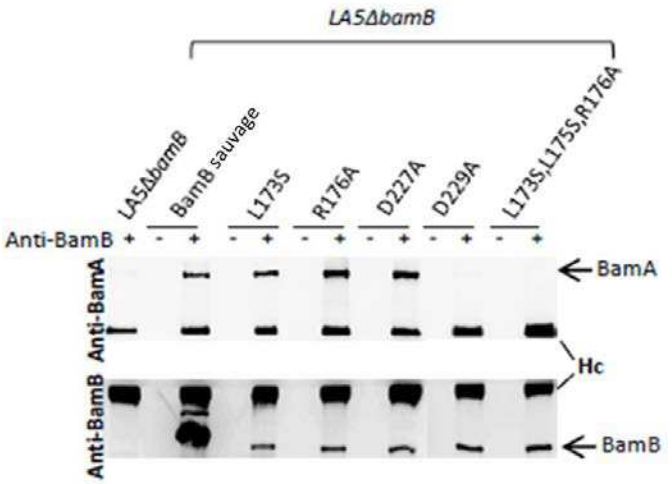


Figure 23. Effet des substitutions d'acides aminés dans la protéine BamB sur son interaction avec BamA.

Des co-immunoprécipitations de BamA avec les protéines BamB sauvage ou mutées ont été effectuées. Des lysats bactériens du mutant *S.* Enteritidis LA5Δ*bamB* seul ou exprimant la protéine BamB sauvage, la protéine BamB avec les substitutions L173S, R176A, D227A, D229A seules ou l'association des substitutions L173S,L175S,R176A ont été immunoprecipités avec (+) ou sans (-) anticorps polyclonal anti-BamB. Les immunoprécipitats ont été séparés par SDS-PAGE suivi d'une coloration au nitrate d'argent (**A**) ou transférés sur une membrane de nitrocellulose et la présence de BamB ou BamA dans les échantillons a été visualisée par western-blots (**B**) en utilisant les anticorps polyclonaux anti-BamB ou anti-BamA. Hc: immunoglobulin G heavy chain (chaîne lourde d'immunoglobuline G) ; Lc : immunoglobulin G light chain (chaîne légère d'immunoglobuline G) ; M: marqueur de poids moléculaire. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

I.1. Impact sur l'interaction BamA/BamB

Des expériences de co-immunoprécipitation ont été effectuées chez les mutants Δ*bamB* de *S.* Enteritidis exprimant les différents variants de BamB, en utilisant un anticorps anti-BamB. Cette expérience a été reproduite au minimum 3 fois de manière indépendante.
Les échantillons ont subi une migration SDS-PAGE. Les gels ont été ensuite colorés au nitrate d'argent. Pour chacune des souches étudiées, des quantités similaires de chaîne lourde et légère d'immuno-globuline IgG sont observées sur le gel coloré au nitrate d'argent, ce qui témoigne d'un dépôt équivalent de protéines entre les différents échantillons (Figure 23A). Cependant, nous n'avons pas pu ainsi mettre en évidence BamA qui, chez *Salmonella*, présente une taille théorique de 89,5 kDa contrairement à Vuong *et al.* qui avaient détecté la protéine BamA de *E. coli* après co-immunoprécipitation avec BamB et coloration au nitrate d'argent. Afin de pouvoir détecter BamA précipitée, nous avons donc procédé à des western-blots sur les mêmes échantillons et utilisé un anticorps anti-BamA (Figure 23B). La protéine BamB a été détectée à l'aide de l'anticorps anti-BamB.
Comme attendu, toutes les souches, à l'exception du mutant de délétion Δ*bamB*, expriment bien la protéine BamB et BamA est co-immunoprécipitée chez la souche sauvage et non dans le mutant de délétion. Dans les souches exprimant BamB avec les mutations L173S, R176A ou D227A, BamA est détectée à un niveau similaire à celui de la souche sauvage de *S.* Enteritidis. Seules les souches exprimant BamB portant la mutation D229A ou l'association des 3 mutations L173S,L175S,R176A présentent une très forte altération de l'interaction avec BamA chez *Salmonella* puisque l'on ne détecte pas la protéine BamA. Cela marque une différence avec ce qui a été décrit chez *E. coli* par Vuong *et al.* qui observent une abolition totale d'interaction avec BamA lorsque BamB porte les mutations D227A ou D229A ou la triple mutation L173S,L175S,R176A (Vuong *et al.*, 2008).

En conclusion, aucune implication des résidus de BamB L173, R176 ou D227 seuls n'a été observée dans l'interaction avec BamA. Seule la substitution D229A ou l'association des substitutions L173S,L175S,R176A altère fortement l'interaction BamA/BamB chez *Salmonella*.

Table 3. Impact de la délétion de *bamB* sur la sensibilité aux antibiotiques de *S.* Enteritidis

	AMX	VAN	ERY	RIF	BAC	UB	ENR	SSS	CRO	AN	TE	SPT	IPM	FEP	TEC	CHL	TMP	CIP	FFC
LA5	30	6	9	16	6	16	23	29	32	24	25	20	34	34	6	27	29	27	25
LA5Δ*bamB*	32	14	14	28	14	22	28	28	34	24	26	21	34	34	7	30	34	29	28
BamB sauvage	6	6	9	17	6	17	25	29	32	24	27	23	ND	33	ND	28	30	28	30

La sensibilité aux antibiotiques suivants : l'amoxicilline (AMX), la vancomycine (VAN), l'éythromycine (ERY), la rifampicine (RIF), la bacitracine (BAC), la fluméquine (UB), l'enrofloxacine (ENR), les sulfamides (SSS), le ceftriaxone (CRO), l'amykacine (AN), la tétracycline (TE), la spectinomycine (SPT), l'imipénème (IPM), le céfépime (FEP), la teicoplanine (TEC), le chloramphénicol (CHL), le triméthoprime (TMP), la ciprofloxacine (CIP) et le florphénicol (FFC) a été déterminée par diffusion à partir de disques d'antibiotiques en milieu gélosé, sur la souche *S.* Enteritidis LA5, le mutant LA5Δ*bamB* seul ou complémenté avec le plasmide *pACbamB* exprimant BamB sauvage (souche BamB sauvage). Les diamètres de chaque zone d'inhibition sont présentés en mm (diamètre d'un disque=6mm). ND : Non déterminé.

I.2. Impact sur la perméabilité membranaire

L'implication de BamB dans la biogénèse de la membrane externe chez *E. coli* et *S.* Enteritidis a été décrite dans la littérature. En effet, un mutant Δ*bamB* présente un défaut d'assemblage des protéines de membrane externe ainsi qu'une augmentation de sensibilité aux antibiotiques suivants : vancomycine, rifampicine, érythromycine, bacitracine et novobiocine (Fardini *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2005). Ces molécules présentent des tailles et des solubilités différentes et appartiennent à des familles d'antibiotiques différentes. Ce résultat laisse suggérer une intégrité membranaire très affectée chez un mutant de délétion Δ*bamB*. Cependant, des expériences *in vivo* non publiées du laboratoire ont montré qu'un mutant *S.* Enteritidis Δ*bamB* colonise l'intestin de souris et persiste dans les caeca de poussins aussi bien que la souche sauvage après inoculation par voie orale, malgré l'acidité de l'estomac et bien que l'intestin soit un lieu où la bactérie peut rencontrer des peptides antimicrobiens. Ces données nous ont laissé penser que la membrane externe du mutant *S.* Enteritidis LA5Δ*bamB* ne présente pas une intégrité membranaire aussi affectée qu'on pouvait l'imaginer à partir des données de la littérature.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons testé, en collaboration avec Etienne Giraud et Isabelle Monchaux (équipe Plasticité Génomique, Biodiversité et Antibiorésistance, INRA de Tours), un large panel d'antibiotiques recouvrant la plupart des familles d'antibiotiques sur ce mutant. Nous avons tout d'abord constaté que la délétion de *bamB* n'engendre pas une augmentation de la sensibilité à tous les antibiotiques testés puisque ce mutant devient plus sensible uniquement à la vancomycine, la rifampicine, l'érythromycine et la bacitracine comme décrit précédemment et dans une moindre mesure, à deux fluoroquinolones : la fluméquine et l'enrofloxacine (Table 3). La zone d'inhibition aux antibiotiques tels que le chloramphénicol, le triméthoprime, la ciprofloxacine, le ceftriaxone et le florphénicol augmente de 2 à 5 mm chez le mutant LA5Δ*bamB* en comparaison avec la souche sauvage LA5. Cependant, nous n'avons pas tenu compte de ces différences car le diamètre de la zone d'inhibition à ces antibiotiques chez la souche sauvage dépasse 25 mm et plus le diamètre est grand, plus sa mesure devient imprécise. De manière intéressante, nous remarquons qu'il n'y a pas de point commun en termes de solubilité, de taille ni de mode d'action concernant les antibiotiques auxquels le mutant LA5Δ*bamB* présente une augmentation de sensibilité.

Nous avons ensuite souhaité connaître l'implication des résidus L173, L175, R176, D227, D229 de BamB sur la sensibilité aux antibiotiques auxquels le mutant LA5Δ*bamB* présente une augmentation de sensibilité. Comme précédemment, nous avons utilisé les souches

Table 4. Impact de l'addition d'arabinose dans le milieu de culture sur la sensibilité aux antibiotiques de *S.* Enteritidis

	AMX	VAN	ERY	RIF	BAC	UB	ENR
LA5	30	6	9	16	6	16	23
LA5+arabinose	30	6	9	16	6	16	23
LA5Δ*bamB*	32	14	14	28	14	22	28
LA5Δ*bamB*+arabinose	31	15	13	28	14	23	28

La sensibilité aux antibiotiques suivants : l'amoxicilline (AMX), la vancomycine (VAN), l'éythromycine (ERY), la rifampicine (RIF), la bacitracine (BAC), la fluméquine (UB) et l'enrofloxacine (ENR) a été déterminée par diffusion à partir de disques d'antibiotiques en milieu gélosé seul ou additionné d'arabinose 0,2% final, sur la souche *S.* Enteritidis LA5 et le mutant LA5Δ*bamB.* Les diamètres de chaque zone d'inhibition sont présentés en mm (diamètre d'un disque=6mm).

Table 5. Impact des substitutions d'acides aminés de BamB sur la sensibilité aux antibiotiques de *S.* Enteritidis

	AMX	VAN	ERY	RIF	BAC	UB	ENR
LA5	33	6	9	17	6	14	22
LA5Δ*bamB*	34	12	15	28	14	22	29
BamB sauvage	6	6	9	17	6	16	25
L173S	6	6	6	17	6	17	25
R176A	6	6	6	18	6	17	25
D227A	6	12	15	26	13	20	27
D229A	6	6	6	21	6	19	25
L173S,L175S,R176A	6	14	15	32	16	25	30

La sensibilité aux antibiotiques suivants : l'amoxicilline (AMX), la vancomycine (VAN), l'éythromycine (ERY), la rifampicine (RIF), la bacitracine (BAC), la fluméquine (UB) et l'enrofloxacine (ENR) a été déterminée par diffusion à partir de disques d'antibiotiques en milieu gélosé, sur la souche *S.* Enteritidis LA5, le mutant LA5Δ*bamB* seul ou complémenté par la protéine BamB sauvage ou les variants de BamB. Les diamètres de chaque zone d'inhibition sont présentés en mm (diamètre d'un disque=6mm).

LA5Δ*bamB* complémentées en *trans* par les plasmides produisant soit BamB sauvage soit les variants de BamB. Nous avons également ajouté l'amoxicilline à nos antibiogrammes pour vérifier que les plasmides recombinants étaient bien présents dans nos souches transformées qui deviennent résistantes à cet antibiotique. De plus, comme la culture des souches qui hébergent les plasmides pBAD24 doit être faite en présence d'arabinose afin d'induire l'expression des variants de BamB, il était important de vérifier que la présence d'arabinose dans les cultures n'affecte pas le résultat des antibiogrammes. Il a été observé que pour les souches LA5 sauvage et LA5Δ*bamB*, la présence d'arabinose dans la préculture ou dans le milieu MH n'a aucun effet sur les diamètres de zones d'inhibition obtenus (Table 4). Les antibiogrammes ont donc pu être réalisés en présence d'arabinose.

Les variants de BamB présentant soit la substitution L173S soit R176A sont capables de restaurer le défaut de perméabilité de la souche LA5Δ*bamB* à un niveau de résistance similaire à la souche sauvage LA5, ce qui n'est pas le cas du variant BamB D227A ni du variant L173S,L175S,R176A puisque les souches qui expriment ces derniers variants ont un niveau de sensibilité aux antibiotiques proche du mutant de délétion LA5Δ*bamB*. Le variant BamB D229A présente un niveau différent de sensibilité aux antibiotiques puisque le niveau de sensibilité à la vancomycine, l'érythromycine et la bacitracine est restauré à un niveau similaire à la souche sauvage LA5 tandis que la restauration n'est que partielle concernant la rifampicine, la fluméquine et l'enrofloxacine (Table 5).

En conclusion, les acides aminés L173 ou R176 seuls ne sont pas impliqués dans le rôle de BamB dans la perméabilité aux antibiotiques. A l'inverse, le résidu D229 est important mais moins que le résidu D227 et l'association des résidus L173S,L175S,R176A qui sont essentiels pour ce rôle de BamB.

I.3. Impact sur l'assemblage des protéines de membrane externe

Afin d'observer l'impact des différentes substitutions d'acides aminés de BamB sur l'assemblage des PME, les protéines totales de membranes de nos souches ont été analysées par SDS-PAGE, puis coloration au bleu de Coomassie et par western-blot avec un anticorps anti-OmpA. Sur le gel coloré au bleu de Coomassie, nous avons pu analyser le profil des PME majeures OmpC/F, OmpD et OmpA grâce à une expérience effectuée dans notre laboratoire précédemment à ma thèse. Lors de cette expérience, des mutants de délétion de chacune de ces PME avaient été construits et leur profil de PME avait été comparé à celui de la souche

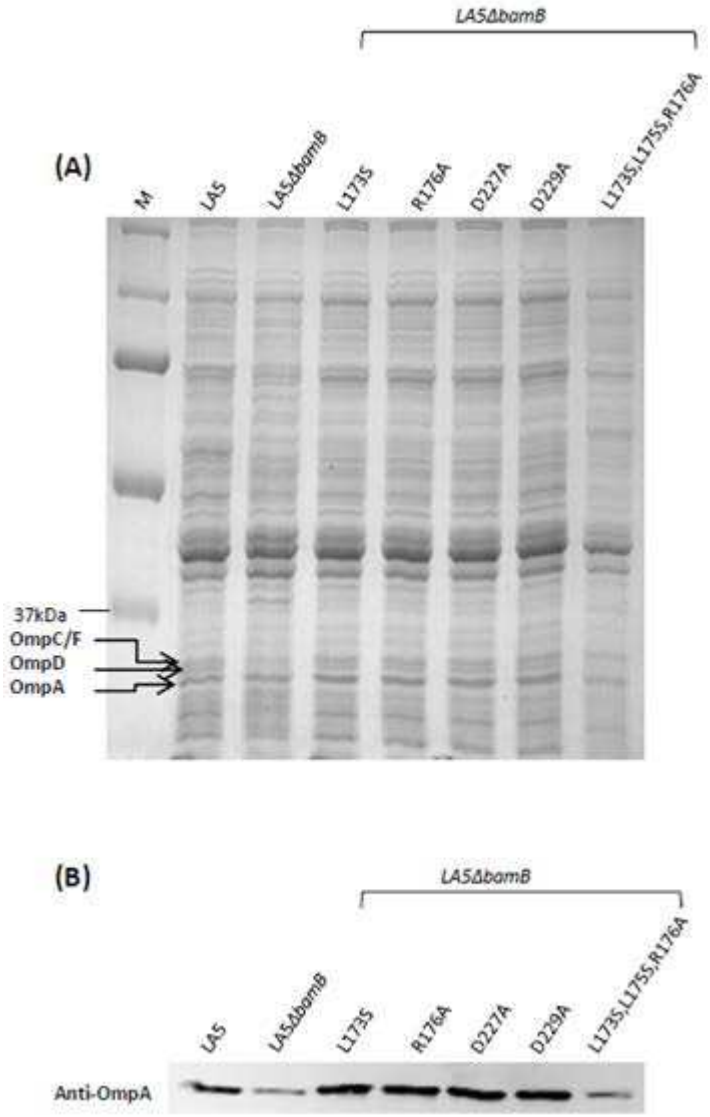


Figure 24. Impact des substitutions d'acides aminés dans la protéine BamB sur les protéines de membranes chez *S.* Enteritidis.

Après une culture en milieu LB, les protéines totales de membranes (membrane interne+membrane externe) de la souche *S.* Enteritidis LA5, du mutant LA5Δ*bamB* seul ou exprimant les variants de BamB ont été extraites. Les protéines ont été ensuite analysées par électrophorèse en SDS-PAGE 12% suivie soit d'une coloration au bleu de Coomassie G250 (**A**) soit d'un transfert sur une membrane de nitrocellulose suivi d'un western-blot avec l'anticorps anti-OmpA (**B**). La position des protéines OmpC/F, OmpD et OmpA est indiquée. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

sauvage de *S.* Enteritidis LA5 ce qui avait permis d'identifier chacune de ces porines sur le gel SDS-PAGE coloré.

Comme attendu, le mutant LA5Δ*bamB* présente un niveau membranaire de porines OmpC/F, OmpD et OmpA plus faible que la souche sauvage LA5 (Figure 24A et B). Un profil similaire de faible niveau de porines est observé pour le mutant LA5Δ*bamB* exprimant le variant BamB L173S,L175S,R176A et un faible niveau de OmpA est visible sur western-blot. Par contre, les mutants LA5Δ*bamB* produisant les autres variants de BamB portant chacun une substitution unique, ne présentent pas de différence visible avec la souche sauvage. Ils présentent un même niveau de OmpC/F, OmpD et OmpA sur le gel coloré au bleu de Coomassie (Figure 24A) ainsi que la même quantité d'OmpA sur le western-blot anti-OmpA (Figure 24B). Notons, que cela inclut le variant D227A qui n'est pas capable de restaurer le niveau de résistance aux antibiotiques de LA5Δ*bamB* vers un niveau sauvage, ainsi que le variant D229A qui est fortement altéré dans son interaction avec la protéine BamA.

En conclusion, nos résultats montrent que le défaut d'assemblage des PME du mutant LA5Δ*bamB* peut être complémenté par l'expression de tous les variants de BamB étudiés, à l'exception du variant BamB L173S,L175S,R176A.

I.4. Impact sur le contrôle de l'expression des gènes des T3SS

Chez un mutant *S.* Enteritidis Δ*bamB*, les gènes impliqués dans la biosynthèse du T3SS-1 et des flagelles sont significativement moins transcrits en comparaison avec ceux de la souche sauvage. En conséquence de cette diminution transcriptionnelle, les effecteurs du T3SS-1 et les protéines flagellaires sont moins exprimés et leur sécrétion dans le surnageant de culture est réduite chez le mutant (Fardini *et al.*, 2007). Afin de savoir si les variants de BamB sont capables de restaurer la capacité de synthétiser et d'assembler le T3SS-1 et les flagelles du mutant LA5Δ*bamB*, nous avons étudié l'expression et la sécrétion des effecteurs du T3SS-1 et des protéines flagellaires dans le culot et le surnageant de chacune de nos souches préalablement cultivées en LB NaCl 0,3M. Cette condition de culture favorise l'expression des gènes du T3SS-1 (Arricau *et al.*, 1998). Les protéines effectrices du T3SS-1 SipA, SipC ainsi que les protéines flagellaires FliC et FliD avaient été préalablement identifiées par spectrométrie de masse ce qui nous a permis d'analyser les profils de protéines sécrétées obtenus (Amy *et al.*, 2004).

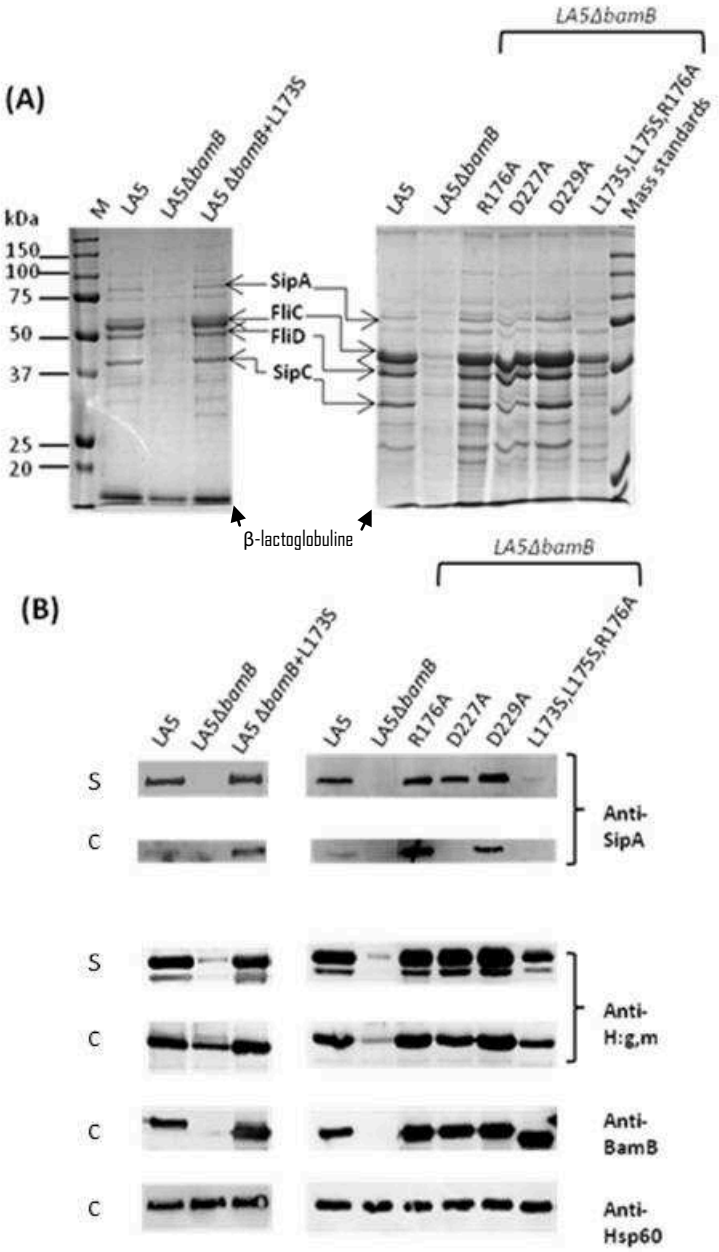


Figure 25. Impact des substitutions d'acides aminés de BamB sur l'expression du T3SS-1 et des flagelles et la fonctionnalité du T3SS-1 chez *S.* Enteritidis.

Les protéines sécrétées par la souche sauvage *S.* Enteritidis LA5, le mutant LA5Δ*bamB* seul ou exprimant les variants de BamB ont été analysées. Les protéines du surnageant ont été précipitées au TCA, puis séparées par SDS-PAGE. Le gel a été soit coloré au bleu de Coomassie G250 (A) soit transféré sur une membrane de nitrocellulose puis incubée avec un anticorps anti-SipA ou un anticorps anti-H:g,m qui reconnaît les protéines flagellaires (B). A partir des mêmes cultures, les bactéries ont été culotées et resuspendues dans du tampon de Laemmli. Après SDS-PAGE et transfert sur une membrane de nitrocellulose, des western-blots utilisant les anticorps anti-SipA, anti-H:g,m, anti-Hsp60 ou anti-BamB ont été effectués sur ces derniers échantillons. S : surnageant ; C : culot. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

Pour s'assurer que la précipitation des protéines sécrétées et le dépôt sur gel de chaque échantillon soit similaire, nous avons ajouté, à chaque surnageant de culture avant précipitation, la même quantité de β-lactoglobuline, dont la masse moléculaire est d'environ 18 kDa. Après migration des échantillons, nous pouvons voir une quantité similaire de β-lactoglobuline dans les différentes pistes du gel coloré au bleu de Coomassie, ce qui témoigne d'une précipitation similaire des protéines du surnageant des différentes souches et d'un dépôt équivalent de ces protéines dans chaque piste (Figure 25A). Pour les échantillons du culot, afin de contrôler le dépôt équivalent de protéines dans les différentes pistes du gel, nous avons détecté par western-blot, la protéine cytoplasmique Hsp60 et nous observons une quantité similaire de cette protéine dans nos différents échantillons (Figure 25B). Enfin, afin de vérifier que BamB est correctement exprimée dans nos souches, nous avons effectué un western-blot anti-BamB dans les échantillons du culot : comme attendu, BamB est bien présente dans toutes nos souches, sauf chez le mutant LA5Δ*bamB* (Figure 25B).

Conformément aux données précédentes de notre équipe (Fardini *et al.*, 2007), le mutant LA5Δ*bamB* exprime et sécrète moins de protéines effectrices du T3SS-1 SipA et SipC et également moins de protéines flagellaires FliC et FliD, par rapport à la souche sauvage LA5. L'expression de BamB L173S, R176A ou D229A restaure complètement le défaut de sécrétion du mutant puisqu'on observe dans les souches correspondantes, une expression de SipA et de FliC ainsi qu'une sécrétion de SipA, SipC, FliC et FliD à un niveau égal ou même supérieur à celui de la souche sauvage LA5 (Figure 25A et 25B). Le variant BamB D227A restaure également le défaut de sécrétion du mutant LA5Δ*bamB*. Cependant, chez la souche produisant le variant BamB D227A, un plus faible niveau de SipA et dans une moindre mesure de FliC est observable par western-blot sur le culot bactérien, par comparaison avec les autres souches exprimant une quantité similaire des variants de BamB respectifs. Etant donné que la quantité totale de protéines synthétisées par chaque souche correspond à la « somme » des protéines du surnageant et des protéines du culot et sachant que la très grande majorité des effecteurs synthétisés sont sécrétés dans le surnageant de culture, nos résultats reflètent, par rapport à la souche sauvage, une légère diminution d'expression des effecteurs du T3SS-1 dans le mutant LA5Δ*bamB* produisant BamB D227A. Le variant D227A restaure donc en grande partie l'expression des effecteurs du T3SS-1 et sa fonctionnalité ainsi que l'expression des protéines flagellaires. En revanche, le niveau de ces protéines dans le surnageant et dans le culot est fortement diminué pour le mutant LA5Δ*bamB* produisant le variant BamB L173S,L175S,R176A. Cette protéine ne permet donc pas de complémenter le

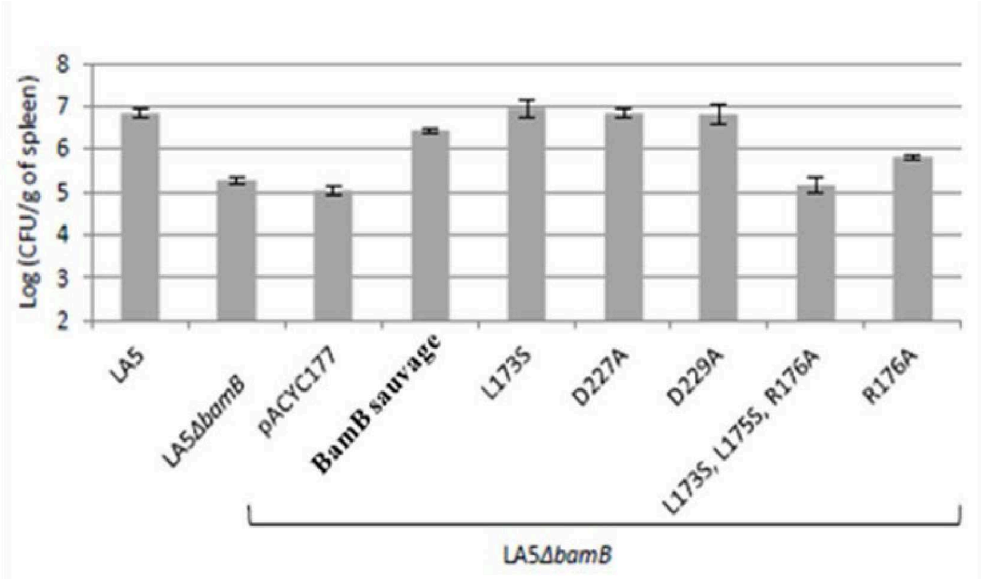


Figure 26. Impact des substitutions en acides aminés de BamB sur la virulence de *Salmonella* chez la souris.

Des groupes de 10 souris BALB/c âgées de 6 et 7 semaines ont été inoculés par voie orale avec 5.10^8 CFU (colony forming unit= unité formant colonie) des différentes souches de *S.* Enteritidis. Le niveau de colonisation de la rate a été déterminé à 6 jours post inoculation. Au minimum, deux expériences indépendantes ont été effectuées pour chaque souche. Les résultats représentent la moyenne des logs (CFU/g de rate) et correspondent aux données de l'ensemble des expériences réalisées. Les résultats ont été comparés par analyse de variance, suivie d'un test de Tukey-Kramer (Systat 13, logiciel Systat). Les différences significatives sont présentées dans la Table 6.

défaut d'expression des protéines flagellaires et le défaut d'expression et de sécrétion des protéines par le T3SS-1 observé dans un mutant LA5Δ*bamB* (Figure 25B).

En conclusion, nos résultats montrent que les acides aminés L173, R176, D227 ou D229 seuls ont peu ou pas d'influence sur le rôle de BamB dans l'expression des protéines flagellaires et l'expression et la fonctionnalité du T3SS-1. Par contre, l'association des trois résidus L173,L175,R176 est cruciale pour ce rôle de BamB.

I.5. Impact sur la virulence de Salmonella

Nous venons de voir que les différents variants de BamB ne complémentent pas le mutant LA5Δ*bamB* de la même manière en fonction du phénotype étudié. En effet, les variants BamB L173S ou BamB R176A restaurent chez le mutant Δ*bamB* à un niveau sauvage tous les phénotypes que nous avons étudiés et le variant BamB L173S,L175S, R176A n'en restaure aucun. Les variants BamB D227A et BamB D229A restaurent quant à eux un phénotype sauvage au mutant Δ*bamB* pour tous les phénotypes étudiés excepté la résistance/sensibilité aux antibiotiques, sachant que le variant BamB D227A conserve ses capacités d'interaction avec BamA ce qui n'est pas le cas du variant BamB D229A. Nous avons donc souhaité étudier la virulence des différentes souches *in vivo* afin de savoir si l'interaction de BamB avec BamA est requise pour le rôle de BamB dans la virulence et tenter d'expliquer l'important défaut de virulence du mutant LA5Δ*bamB* chez la souris (Fardini *et al.*, 2007). Dans cette optique, les variants de BamB ont été exprimés à partir du plasmide pACYC177 suite à un clonage du cadre ouvert de lecture *bamB* (en utilisant les amorces *bamB*-clon-pBAD-to-pAC-for et *bamB*-clon-pBAD-to-pAC-rev) sous contrôle du promoteur constitutif du gène *aph* (aminoglycoside phosphotransferase) présent sur ce plasmide. Cette précaution a été prise afin de s'assurer d'une expression correcte des protéines BamB chez la souris. En effet, le plasmide pBAD24 n'a pas été utilisé car une induction à l'arabinose ne peut avoir lieu *in vivo*, ce sucre n'étant pas naturellement présent chez la souris. Les clonages ont été réalisés chez *E.* coli, puis vérifiés par restriction plasmidique et séquençage des inserts en utilisant les amorces pACYC177-1 et pACYC177-2 (données non montrées). Enfin, les plasmides ont été introduits dans le mutant LA5Δ*bamB*. Il est important de préciser que les différents phénotypes *in vitro* obtenus pour les mutants LA5Δ*bamB* transformés par les plasmides recombinants pAC*bamB*, sont identiques à ceux obtenus pour les souches transformées par les

Table 6. Comparaison deux à deux du niveau de colonisation de la rate par les différentes souches de *S.* Enteritidis

Souche 1	**Souche 2**	***P* (≤)**
LA5	LA5Δ*bamB*	0.0001
LA5	pACYC177	0.0001
LA5	R176A	0.0001
LA5	L173S,L175S,R176A	0.0001
LA5Δ*bamB*	BamB sauvage	0.0001
LA5Δ*bamB*	L173S	0.0001
LA5Δ*bamB*	R176A	0.0001
LA5Δ*bamB*	D227A	0.0001
LA5Δ*bamB*	D229A	0.0001
BamB sauvage	pACYC177	0.0001
L173S	pACYC177	0.0001
L173S	R176A	0.0001
L173S	L173S,L175S,R176A	0.0001
R176A	pACYC177	0.0001
R176A	BamB sauvage	0.0001
D227A	pACYC177	0.0001
D227A	BamB sauvage	0.019
D227A	R176A	0.0001
D227A	L173S,L175S,R176A	0.0001
D229A	pACYC177	0.0001
D229A	R176A	0.0001
D229A	L173S,L175S,R176A	0.0001
L173S,L175S,R176A	BamB sauvage	0.0001
L173S,L175S,R176A	R176A	0.005

P-values (*P*) obtenues suite à un test de Tukey-Kramer (Systat 13, logiciel Systat) réalisé sur les données *in vivo* présentées sur la Figure 4. Seules les différences significatives ($P<0,05$) sont présentées.

plasmides recombinants pBAD*bamB* et ce, quelque soit le variant BamB exprimé (données non montrées).

Des souris BALB/c ont été inoculées par voie orale avec les différentes souches de *S.* Enteritidis et le niveau de colonisation de la rate a été déterminé à 6 jours post inoculation (Figure 26). Les souris BALB/c ont été choisies pour leur phénotype sensible à l'infection c'est-à-dire NRamp -/- (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein). En effet, ces souris ne possèdent pas NRamp qui est une protéine membranaire présente dans les macrophages et limitant l'entrée d'ions divalents (fer et manganèse) dans le macrophage. Cette protéine est ainsi impliquée dans la résistance de l'hôte à certains pathogènes intracellulaires tels que *Salmonella* (Papp-Wallace et Maguire, 2006). Le protocole utilisé a été validé par le « Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale – Centre Limousin ».

A 6 jours post-inoculation, le mutant LA5Δ*bamB* seul ou le même mutant portant le plasmide vide pACYC177 colonisent les rates des souris significativement moins que la souche sauvage ou que le mutant LA5Δ*bamB* complémenté avec le gène sauvage *bamB* (entre 25 et 36 fois moins avec $P < 0{,}0001$), comme décrit précédemment par l'équipe (Figure 26) (Fardini *et al.*, 2007). Les souches exprimant les variants de BamB L173S, D227A ou D229A sont capables de restaurer complètement la virulence du mutant LA5Δ*bamB*, ce qui n'est pas le cas du variant R176A ou du triple mutant L173S,L175S,R176A. En effet, le mutant LA5Δ*bamB* produisant soit BamB L173S, BamB D227A ou BamB D229A colonise les rates à un même niveau que le mutant LA5Δ*bamB* exprimant la protéine BamB sauvage (Figure 26). En revanche, le niveau de colonisation des rates est fortement réduit chez les souris inoculées par les souches produisant les variants BamB L173S,L175S,R176A ou BamB R176A en comparaison avec la souche sauvage contrôle (19 et 4 fois moins, respectivement, avec $P < 0{,}0001$). Il est intéressant de voir qu'alors que le variant L173S,L175S,R176A BamB est incapable de restaurer la virulence du mutant LA5Δ*bamB*, la souche exprimant le variant R176A BamB colonise les rates des souris de façon reproductible à un niveau significativement plus élevé que le mutant LA5Δ*bamB* (3,5 fois plus, avec $P < 0{,}0001$). Ce résultat indique que la protéine R176A BamB restaure partiellement la virulence du mutant LA5Δ*bamB*. L'ensemble des différences significatives est présenté dans la Table 6.

En conclusion, nos résultats montrent clairement que l'association des résidus L173,L175,R176 est cruciale pour le rôle de BamB dans la virulence de *Salmonella* et que le

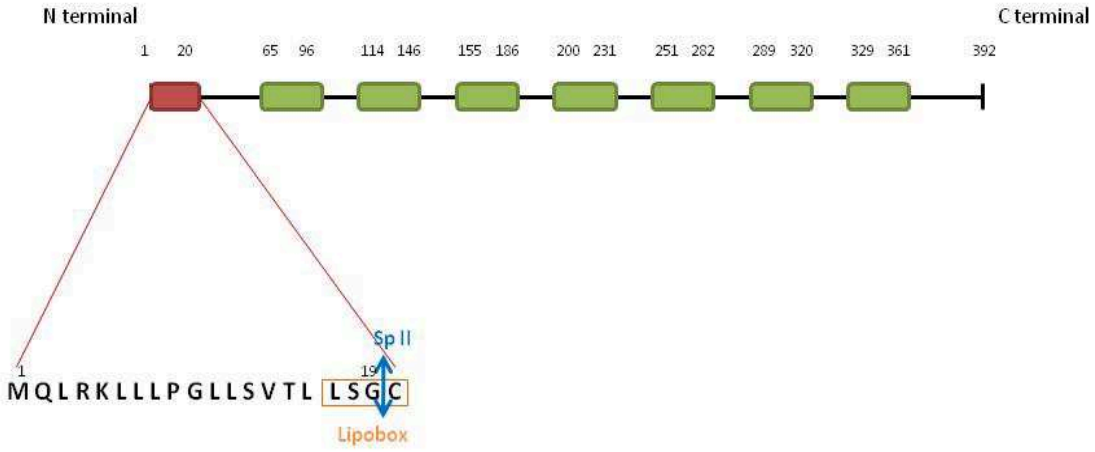


Figure 27. Schéma des domaines protéiques de BamB de *S.* Enteritidis

La région 1 à 20 représentée par le rectangle rouge englobe les acides aminés du peptide signal et de la lipobox de BamB. Le serveur LipoP 1.0 prédit un clivage de la préprotéine par la signale peptidase II après l'acide aminé 19 (SpII aussi connue sous le nom de Lsp= Lipoprotein signal peptidase). BamB présente sept domaines prédits d'interaction avec la molécule PQQ représentés par des rectangles verts.

Table 7. Impact de la délétion du peptide signal de BamB sur la perméabilité membranaire de *S.* Enteritidis

	VAN	ERY	RIF	BAC
LA5	6	6	17	6
LA5*ΔbamB*	15	11	27	12
pACYC177	16	14	26	12
LA5ΔbamB + bamB sauvage	6	6	16	6
LA5*ΔbamB + bamBΔps*	15	11	27	12

Les diamètres d'inhibition sont donnés en mm. Le diamètre d'un disque d'antibiotique est de 6mm. VAN :vancomycine, ERY :érythromycine, RIF :rifampicine, BAC :bacitracine.

résidu R176 est important pour ce phénotype. Par contre, les résidus L173, D227 ou D229 seuls ne sont pas requis pour le rôle de BamB dans la virulence.

II. Recherche d'un rôle cytoplasmique de BamB chez Salmonella

Nous avons cherché à déterminer si BamB a une fonction dans le cytoplasme, en délétant la séquence codant le peptide signal de BamB (Figure 27). Pour cela, nous avons choisi, à partir du plasmide pAC*bamB* capable de complémenter phénotypiquement un mutant de délétion *ΔbamB*, des amorces de part et d'autre de la séquence codant le peptide signal en conservant la séquence du codon d'initiation, de façon à aboutir par PCR inverse (utilisant les amorces $yfgL_{20}$ et $yfgL_{21}$) à un plasmide ne contenant plus que *bamB* sans la séquence codant le peptide signal (*bamBΔps*). Après ligation, le plasmide obtenu a été séquencé puis introduit par électroporation dans un mutant *ΔbamB*. Ainsi, cette souche exprime une protéine BamB qui est, en théorie, séquestrée dans le cytoplasme. L'étude de fractionnement cellulaire est présentée dans le paragraphe II.3.

II.1. Impact de la séquestration cytoplasmique de BamB sur la perméabilité membranaire de S. Enteritidis

Afin d'avoir une idée de la perméabilité de la membrane externe chez le mutant *ΔbamB* hébergeant le plasmide recombinant pAC*bamBΔps*, nous avons eu une approche par antibiogramme. Ces expérimentations ont été réalisées au moins 3 fois. Comme attendu, le mutant LA5*ΔbamB* présente par rapport à la souche sauvage LA5, une augmentation de sensibilité à la rifampicine, la vancomycine, l'érythromycine et la bacitracine. L'introduction du plasmide pAC*bamB* restaure un phénotype sauvage au mutant LA5*ΔbamB*, ce qui n'est pas le cas du vecteur pACYC177 seul (Table 7). Les 2 clones *ΔbamB+bamBΔps* indépendants testés présentent un profil de résistance identique à celui du mutant *ΔbamB* (Table 7). Cependant, des colonies isolées résistantes sont présentes en grand nombre à l'intérieur des zones d'inhibition de la rifampicine et de la vancomycine (clones *ΔbamB+bamΔps* RIF^R et *ΔbamB+bamΔps* VAN^R) contrairement à ce qui a été observé pour la souche *ΔbamB+bamB* qui présente un profil de résistance identique à la souche sauvage (Figure 28). Des résultats similaires ont été observés avec la bacitracine (données non montrées). L'apparition des colonies résistantes n'est pas due à un effet provenant du plasmide pACYC177 puisque ce



Figure 28. Antibiogrammes réalisés sur le mutant Δ*bamB* exprimant BamB séquestrée dans le cytoplasme suite à la délétion du peptide signal de BamB
Les clones *ΔbamB+bamBΔps* 1 et 2 sont issus de deux transformations indépendantes. Les flèches rouges indiquent les colonies résistantes, présentes à l'intérieur des zones d'inhibition. La résistance à l'amoxicilline est exprimée par un gène porté par le plasmide pACYC177. AMX: amoxicilline, E: érythromycine, RA: rifampicine, C: chloramphénicol, VA: vancomycine, CIP: ciprofloxacine.



Figure 29. Antibiogrammes sur deux clones *ΔbamB+bamBΔps* présents dans la zone d'inhibition de la rifampicine (à gauche) ou de la vancomycine (à droite)
La résistance à l'amoxicilline est exprimée par un gène porté par le plasmide pACYC177. AMX: amoxicilline, E: érythromycine, RA: rifampicine, C: chloramphénicol, VA: vancomycine, B: bacitracine.

phénomène n'est observé ni dans la souche portant le vecteur vide ni dans la souche complémentée avec pAC*bamB* (données non montrées).

Afin de déterminer si une complémentation était observée chez certains clones Δ*bamB*+*bamB*Δps, une étude plus poussée des colonies résistantes a été entreprise. Lorsque l'on effectue un antibiogramme sur une culture faite à partir des colonies résistantes situées à l'intérieur de la zone d'inhibition de la rifampicine, de la vancomycine ou de la bacitracine, le phénotype présenté est de type sauvage pour tous les antibiotiques testés, sans apparition de clones résistants à l'intérieur de la zone d'inhibition, et ce, quelque soit le disque duquel est isolé la colonie résistante de départ (Figure 29). Ces colonies présentent donc un phénotype sauvage. Afin de vérifier que les colonies résistantes n'étaient pas dues à une contamination des cultures par la souche sauvage, nous avons, dans ces souches, effectué une PCR en choisissant des amorces (*yfgM*$_4$ et *yfgK*$_5$) sur le chromosome de part et d'autre du cadre ouvert de lecture *bamB* afin qu'il n'y ait pas d'hybridation possible des amorces sur le plasmide recombinant pAC*bamBΔps*. Aucune amplification correspondant à la taille attendue pour la souche sauvage (1840 paires de bases) n'a été obtenue. Seul un fragment correspondant à la taille attendue pour le mutant délété du gène *bamB* a été obtenu (1050 paires de bases). Le gène *bamB* est donc bien délété chez ces bactéries (Figure 30) et il ne s'agit pas d'une contamination. Puis, comme lors de la délétion du cadre ouvert de lecture *bamB* chez le mutant Δ*bamB*, seuls 376 acides aminés sur 392 avaient été délétés, laissant intacte sur le chromosome la séquence codant le peptide signal, nous avons émis l'hypothèse d'une recombinaison possible entre le chromosome et le plasmide introduit, de façon à obtenir une forme sauvage du gène *bamB* sur le plasmide. Les résultats obtenus lors de la première PCR ont montré qu'il n'y avait pas eu recombinaison sur le chromosome. Pour vérifier s'il y avait eu recombinaison sur le plasmide, nous avons amplifié par PCR puis séquencé l'insert du plasmide pAC*bamBΔps* dans les colonies résistantes (données non montrées). Nous n'avons pas observé de recombinaison de la séquence codant le peptide signal sur le plasmide, ce qui invalide l'hypothèse d'un éventuel évènement de recombinaison sur ce plasmide. Les clones résistants Δ*bamB*+*bamBΔps* isolés dans la zone d'inhibition de la rifampicine, vancomycine ou bacitracine sont donc bien des mutants Δ*bamB* hébergeant le plasmide pAC*bamBΔps*.

En conclusion, on n'observe pas de complémentation, comme on l'entend classiquement, du mutant LA5Δ*bamB* par la protéine BamB sans son peptide signal puisque seules quelques bactéries acquièrent une résistance. Le phénotype de résistance observé chez certains clones

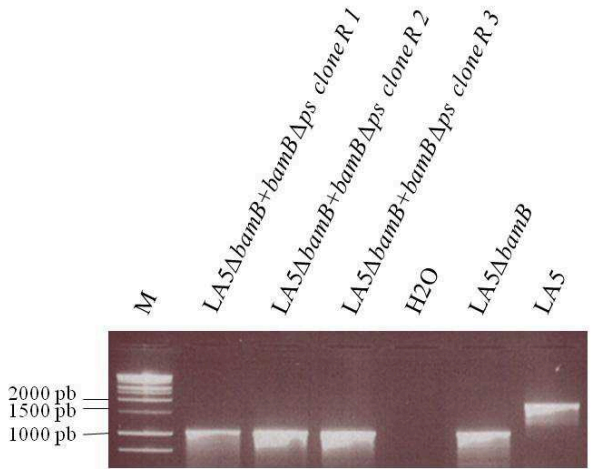


Figure 30. PCR de vérification des clones Δ*bamB*+*bamB*Δ*ps* résistants aux antibiotiques
PCR effectuée sur 3 clones résistants (nommés R1, R2 et R3) pris au hasard dans les zones d'inhibition à la vancomycine, bacitracine ou rifampicine, des antibiogrammes effectués sur et présents dans les zones d'inhibition de l'antibiogramme du mutant exprimant BamBΔps. Les amorces utilisées (*yfgM*$_4$ et *yfgK*$_5$) sont situées de part et d'autre du cadre ouvert de lecture *bamB* pour ne pas amplifier le gène *bamB* apporté en *trans via* le plasmide.

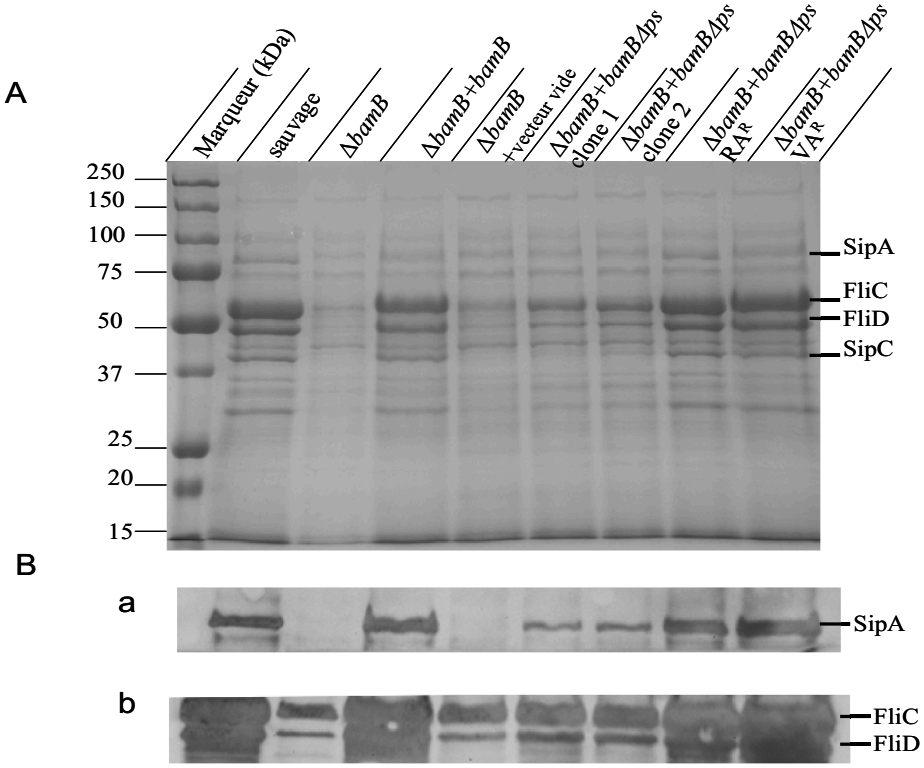


Figure 31. Impact de la délétion du peptide signal de BamB sur l'expression du T3SS-1 et du flagelle ainsi que sur la fonctionnalité du T3SS-1
(A) Profil des protéines secrétées par les différentes souches en gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie **(B)** Western-blots sur des extraits de protéines totales des différentes souches (a) révélation à l'aide d'un anticorps reconnaissant la protéine SipA sécrétée par le T3SS-1.(b) révélation à l'aide d'un anticorps anti-H :gm reconnaissant les protéines flagellaires (dont FliC et FliD). Expérience effectuée une seule fois sur deux clones (Δ*bamB*+*bamB*Δ*ps* clones 1 et 2) qui sont issus de deux transformations indépendantes.

Δ*bamB+bamB*Δ*ps* peut être la conséquence d'une acquisition de mutation(s) ponctuelle(s) soit spontanées et non liées à la surexpression de BamB sans son peptide signal soit provoquées par la surexpression de cette protéine dans le cytoplasme.

II.2. Impact de la séquestration cytoplasmique de BamB sur l'expression et la fonctionnalité du T3SS-1 et l'expression des protéines flagellaires de S. Enteritidis

Afin d'étudier la fonctionnalité des T3SS, les protéines secrétées ont été analysées (Figure 31A). Parallèlement, les protéines totales ont été extraites et afin de voir spécifiquement l'expression de SipA et de la flagelline, des western-blots anti-SipA et anti-H :g,m ont également été réalisés sur ces extraits (Figure 31B). Ces expériences ont été effectuées une unique fois mais sur 2 clones issus de deux transformations indépendantes du mutant Δ*bamB* par le plasmide recombinant produisant BamBΔps.

Les souches témoins utilisées lors de cette expérience se comportent comme attendu. Chez le mutant *ΔbamB*, les effecteurs du T3SS-1 SipA et SipC et les protéines flagellaires FliC et FliD sont faiblement exprimées et sécrétées en comparaison avec la souche sauvage. De la même manière, ce qui est en accord avec les résultats publiés (Fardini *et al.*, 2007; Fardini *et al.*, 2009) nous retrouvons ces mêmes résultats pour le mutant *ΔbamB* qui ne porte que le plasmide pACYC177 vide (Figure 31). Comme attendu, le mutant *ΔbamB+bamBsauvage* présente un niveau d'expression de SipA, FliC, FliD et un profil de protéines secrétées identique à la souche sauvage LA5.

Les deux clones indépendants *ΔbamB+bamBΔps* présentent un profil de sécrétion et un niveau d'expression de FliC et FliD intermédiaire entre la souche sauvage LA5 et le mutant *ΔbamB*. Ces deux clones présentent également une expression de SipA qui était absente chez le mutant *ΔbamB*. Si l'on étudie cette fois les capacités de sécrétion des colonies résistantes isolées à l'intérieur des zones d'inhibition de la rifampicine ou de la vancomycine, une restauration complète de la sécrétion des protéines par le T3SS-1 et des protéines flagellaires est observée. Nous remarquons également un niveau d'expression de SipA, FliC et FliD identique à la souche sauvage (Figure 31).

En conclusion, la protéine BamB sans son peptide signal semble permettre une complémentation faible du défaut d'expression et de fonctionnalité du T3SS-1 et du flagelle chez le mutant *ΔbamB*, ce qui pourrait suggérer un rôle cytoplasmique de BamB. Cependant, il faut garder à l'esprit que dans la culture des clones *ΔbamB+bamBΔps*, il est possible qu'il y

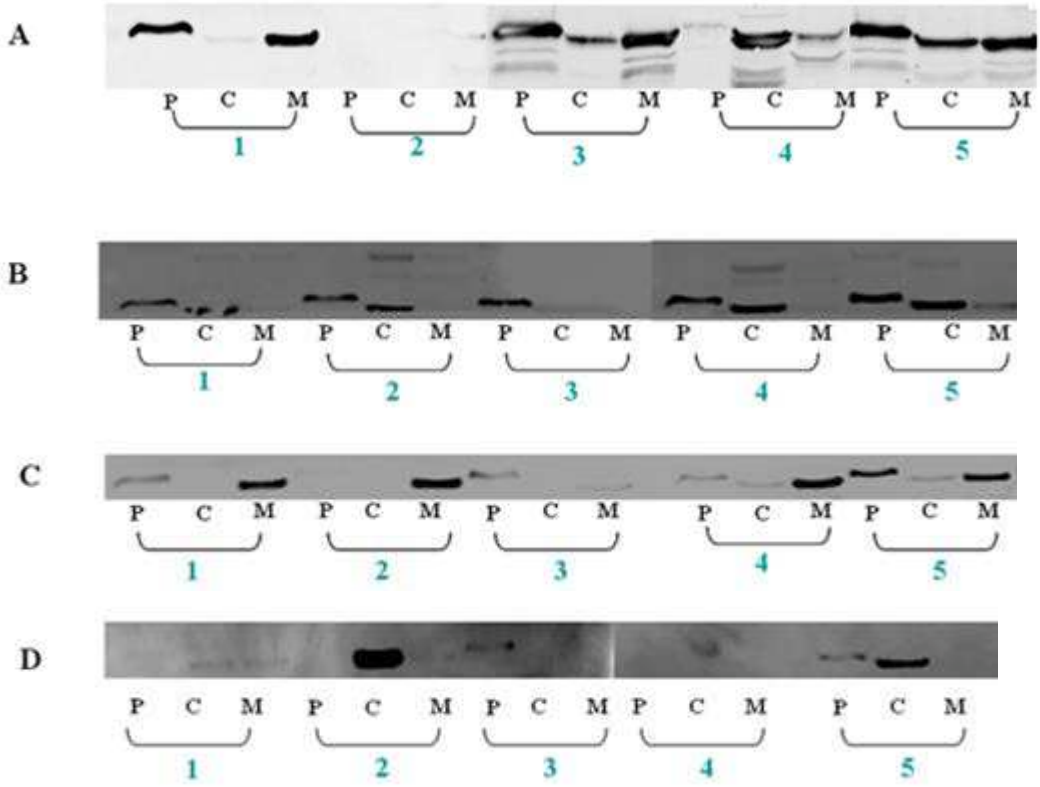


Figure 32 : Fractionnement cellulaire pour les différentes souches étudiées

Les western-blots ont été révélés avec un anticorps : anti-BamB **(A)**, anti-MalE **(B)**, anti-OmpA **(C)** et anti-Hsp60 **(D)**.
P : fraction périplasmique ; C : fraction cytoplasmique ; M : fraction membranaire

1 : LA5
2 : LA5*ΔbamB*
3 : LA5*ΔbamB*+*bamB sauvage*
4 : LA5*ΔbamB*+*bamBΔps*
5 : LA5*ΔbamB*+*bamBΔps* RIF^R

ait une proportion de bactéries qui ont « récupéré » un phénotype sauvage comme les colonies *ΔbamB+bamΔps* RIF^R et *ΔbamB+bamΔps* VAN^R, ce qui pourrait expliquer la détection d'une expression des protéines flagellaires et des protéines du T3SS-1 par les clones *ΔbamB+bamBΔps*.

II.3. Localisation de BamB sans son peptide signal chez S. Enteritidis

Une expérience de fractionnement cellulaire a été effectuée pour vérifier que, dans la souche qui produit BamBΔps, la protéine BamB est bien présente uniquement dans le cytoplasme. Nous avons récupéré les extraits membranaires (membrane interne + membrane externe), périplasmique et cytoplasmique séparément et les avons analysés par western-blot à l'aide d'un antisérum anti-BamB. Comme contrôles pour ce fractionnement, les protéines Hsp60 (protéine cytoplasmique de 60 kDa), MalE (protéine périplasmiquede 43 kDa), OmpA (protéine de membrane externe de 37 kDa) ont été détectées dans les différentes fractions à l'aide d'antisera dirigés contre ces protéines (Figure 32). Notons que la protéine BamB entière est détectée à une masse moléculaire théorique de 42 kDa et la protéine BamBΔps de 40 kDa. Deux expériences indépendantes ont été réalisées. Les fractionnements ont été réalisés sur les souches LA5**,** LA5*ΔbamB***,** LA5*ΔbamB+bamB sauvage***,** LA5*ΔbamB+bamBΔps* et LA5*ΔbamB+bamBΔps* RIF^R .

L'analyse des résultats montre clairement que le fractionnement n'a pas été parfait. Les protéines Hsp60, MalE et OmpA sont retrouvées majoritairement dans les fractions cytoplasmiques, périplasmiques et membranaires respectivement. On observe cependant une légère contamination des fractions périplasmiques chez les souches LA5*ΔbamB+bamB sauvage* et LA5*ΔbamB+bamBΔps* RIF^R (Figure 32D pistes 3P et 5P) et des fractions membranaires chez les souches LA5 et LA5*ΔbamB* (Figure 32D pistes 1M et 2M) par des protéines cytoplasmiques, puisque l'on détecte Hsp60 dans ces fractions. De plus, les extractions correspondant aux fractions cytoplasmiques des souches LA5, LA5*ΔbamB+bamB sauvage* et LA5*ΔbamB+bamBΔps* sont mauvaises car on détecte très peu voire pas du tout la protéine Hsp60 en comparaison avec les autres souches. Il existe également un problème d'extraction de la fraction membranaire pour la souche LA5*ΔbamB+bamB sauvage* dans laquelle le signal de la protéine OmpA est plus faible que pour les autres souches. Cependant, quelques éléments peuvent être mentionnés.

En accord avec la littérature, le western-blot anti-BamB révèle cette protéine dans les fractions périplasmiques et membranaires pour la souche sauvage et BamB est bien absente

dans les fractions du mutant *ΔbamB*. Dans la souche *ΔbamB+bamBΔps* testée, BamB est détectée de manière intense dans le cytoplasme et légèrement dans la fraction périplasmique contrairement à la souche complémentée LA5*ΔbamB+bamB* sauvage où BamB est retrouvée en quantité faible dans le cytoplasme proportionnellement aux autres fractions. Il est par ailleurs important de noter que dans la fraction cytoplasmique de la souche *ΔbamB+bamBΔps*, BamB est présente à 2 tailles différentes (Figure 32A piste 4C), ce qui n'est pas observé pour les autres souches. La souche *ΔbamB+bamBΔps* résistante à l'intérieur de la zone d'inhibition de la rifampicine présente la même localisation de BamB que la souche complémentée *ΔbamB+bamB* et la souche sauvage LA5. Pour cette souche, on détecte en effet BamB dans les fractions membranaire et périplasmique et de façon moins importante, dans la fraction cytoplasmique.

En conclusion, on ne peut pas affirmer que la protéine BamB délétée de son peptide signal soit présente uniquement dans le cytoplasme de la souche *ΔbamB+bamBΔps* à partir de nos expériences. Afin de trancher, il est nécessaire de refaire une expérience dans laquelle l'ensemble des résultats des protéines témoins est analysable, notamment pour être sûr d'une absence de contamination du périplasme par la fraction cytoplasmique. Ceci permettra ensuite d'interpréter correctement les résultats obtenus pour les antibiogrammes et l'étude des protéines flagellaires et du T3SS-1. Par contre, il apparaît clairement que chez le clone LA5*ΔbamB+bamBΔps* RIF^R, la protéine BamB est présente dans le périplasme et dans la membrane externe de ces bactéries comme chez la souche sauvage, ce qui explique que ce clone ait un profil sauvage de susceptibilité aux antibiotiques et d'expression des protéines flagellaires et du T3SS-1 (Figures 29 et 31). L'apparition de ces clones LA5*ΔbamB+bamBΔps* résistants à la rifampicine, la vancomycine ou la bacitracine ne peut s'expliquer par des mutations ponctuelles spontanées, et ce, pour au moins deux raisons : d'une part, la fréquence d'apparition de ces clones résistants est environ de 10^{-4}, fréquence donc beaucoup plus élevée que la fréquence d'apparition d'une mutation spontanée et, d'autre part, les clones étant résistants à des antibiotiques de classes différentes, il faudrait que l'on ait simultanément plusieurs mutations spontanées touchant différents mécanismes de résistance aux antibiotiques et que ces mutations soient communes entre les différents clones résistants afin que chaque clone soit résistant aux trois antibiotiques simultanément. Par ailleurs, on ne peut parler d'un phénotype de résistance de type « hétérogène » puisque chacun de ces clones présente un profil d'antibiorésistance de type sauvage, qui est donc stable. Au vu des résultats de fractionnement cellulaire, l'hypothèse la plus probable est que ces clones aient acquis une mutation compensatrice permettant d'exporter la protéine BamB délétée de son peptide signal

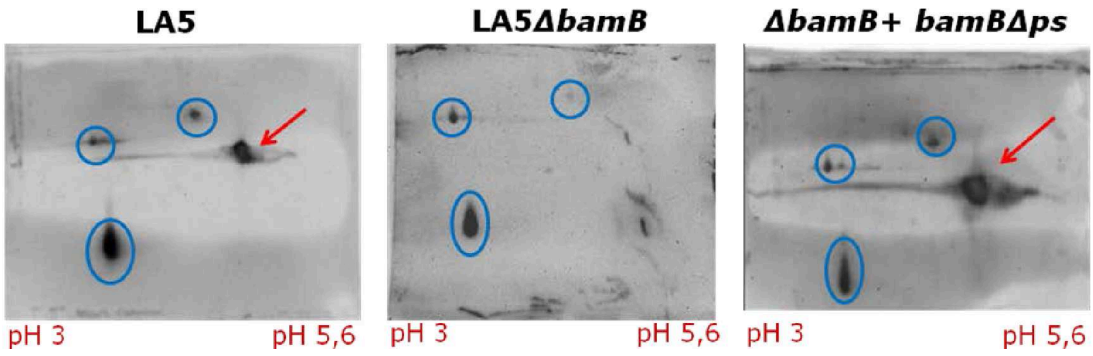


Figure 33. Etude des 2 formes de BamB identifiées par western-blot anti-BamB dans la fraction cytoplasmique de la souche LA5Δ*bamB*+*bamB*Δ*ps*

Après électrophorèse bidimensionnelle, un western-blot anti-BamB a été effectué après transfert de chaque gel sur membrane de nitrocellulose sur les souches *S.* Enteritidis LA5, Δ*bamB* seul ou produisant BamBΔps. Les cercles bleus indiquent les protéines détectées de manière aspécifique par l'anticorps anti-BamB. Les flèches rouges correspondent à la protéine BamB.

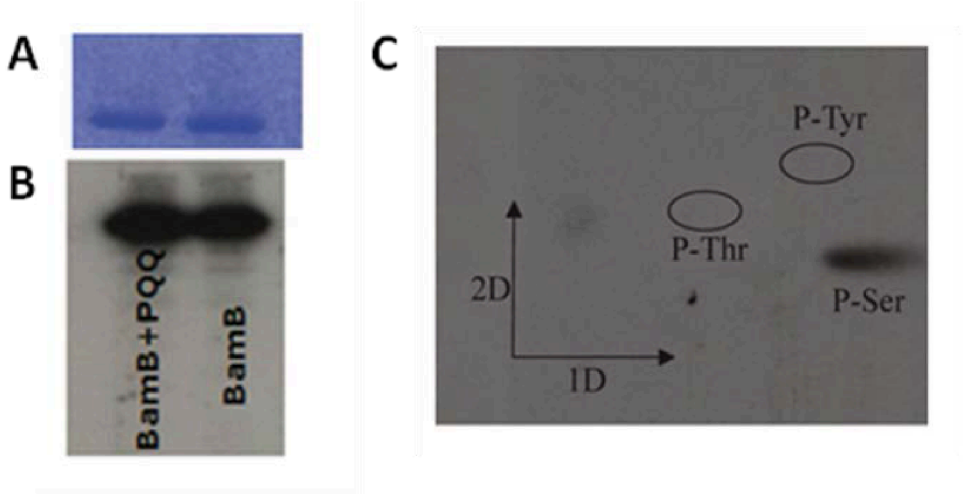


Figure 34. Etude de l'activité d'auto-phosphorylation de 6His-BamB de *Salmonella*
(résultats Pr. B. Duclos)

A : Gel coloré au bleu de Coomassie présentant la quantité de 6His-BamB utilisé pour le test d'autophosphorylation dans chaque puits
B : Autoradiographie en présence ou absence de PQQ
C : Autoradiographie après hydrolyse acide de 6His-BamB et électrophorèse bi-dimensionnelle.

à travers la membrane interne, mutation dont la fréquence pourrait être augmentée en présence d'antibiotique pour lequel le mutant *ΔbamB* est sensible.

III. Recherche d'une activité kinase de BamB de Salmonella

La fonction kinase de BamB décrite chez *E. coli* étant la seule fonction cytoplasmique connue à l'heure actuelle pour cette protéine, nous avons recherché par différentes approches une phosphorylation ou une autophosphorylation de BamB. Nous avons souhaité étudier d'une part, les deux formes que l'on voit dans les clones exprimant BamB*Δps*, par une approche d'électrophorèse bidimensionnelle afin de voir si l'une de ces formes pourrait correspondre à BamB phosphorylée (Figure 33). D'autre part, nous avons souhaité déterminer si BamB présente une activité d'autophosphorylation chez *Salmonella* par un test d'autophosphorylation *in vitro* en présence d'ATP radioactif.

III.1. BamB est-elle capable de s'autophosphoryler?

Pour les tests d'autophosphorylation, nous avons tout d'abord purifié la protéine BamB sous forme native. Pour cela, nous avons induit l'expression de BamB chez une souche d' *E. coli* portant le plasmide pTRC-HisA-*bamB* par addition d'IPTG à la culture, puis purifié la protéine grâce à des billes couplées au Ni^{2+}. En collaboration avec le Pr B. Duclos (IBCP de Lyon), des tests d'autophosphorylation ont été effectués sur la protéine purifiée. Les tests d'autophosphorylation ont été réalisés à 37°C avec environ 1µg de protéine purifiée en présence d'ATP radioactif ou d'ATP froid. Après une migration sur gel SDS-PAGE et une fixation des protéines, les protéines radiomarquées ont été visualisées par autoradiographie. Il a été mis en évidence une protéine phosphorylée à une masse moléculaire proche de celle de BamB uniquement lorsque le test d'autophosphorylation était réalisé après déphosphorylation de BamB purifiée (donnée non montrée). Cette auto-phosphorylation est indépendante de la présence de la molécule PQQ (Figure 34B) contrairement à ce qu'avaient observé Khairnar *et al.* (Khairnar *et al.*, 2007) chez *E. coli* où la phosphorylation de BamB dépend de la présence de PQQ. Une analyse bidimensionnelle de la protéine marquée au [γ-^{32}P] et hydrolysée a ensuite été effectuée afin de déterminer les acides aminés phosphorylés. La localisation des phosphotyrosines, phosphosérines et phosphothréonines est indiquée (Figure 34C). Seules des phosphosérines ont été détectées après autoradiographie. Cependant, un résultat est venu contrarier ces résultats positifs. En effet, le Pr B. Duclos avait, en parallèle de ces tests, réalisé

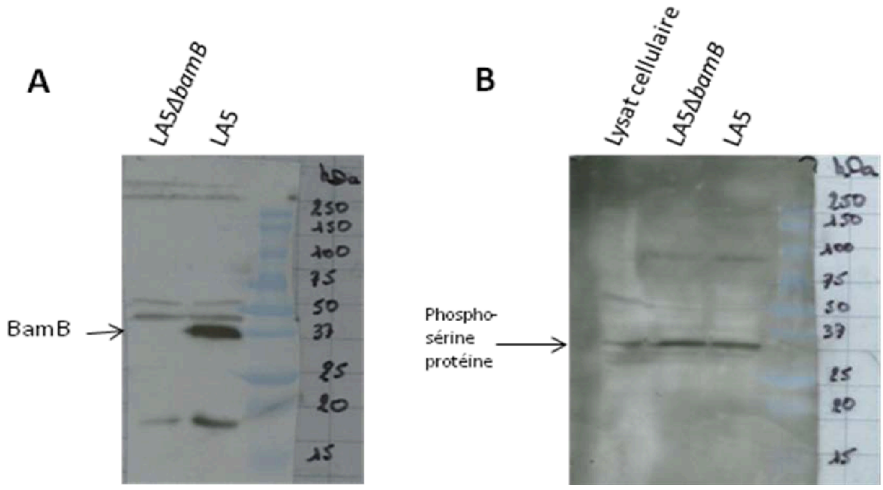


Figure 35. Recherche de protéines de *S.* Enteritidis phosphorylées sur un résidu sérine par western-blot sur les protéines du culot.

A : Western-blot anti-BamB sur les protéines de LA5 et LA5Δ*bamB*
B : Western-blot anti-sérine phosphorylée sur les protéines de LA5 et LA5Δ*bamB* et un lysat cellulaire eucaryote comme contrôle positif.

un test avec la même purification de BamB mais en présence d'ATP froid et envoyé l'échantillon (bande à la même masse moléculaire que BamB) au spectromètre de masse. Or, la protéine BamB n'a pas été retrouvée dans l'échantillon. Les protéines identifiées dans l'échantillon ne nous ont pas été communiquées. Plusieurs explications pouvaient être avancées : (i) le signal détecté lors des tests en présence d'ATP radioactif correspond à une autre protéine que BamB contaminant notre purification et n'ayant aucun lien avec BamB, (ii) l'échantillon analysé au spectromètre de masse n'est pas le bon, (iii) le signal détecté lors des tests en présence d'ATP radioactif correspond à une protéine de masse moléculaire proche de BamB qui co-purifirait avec celle-ci.

Pour essayer de mieux comprendre ces résultats, nous avons recherché au laboratoire une éventuelle phosphorylation de BamB par western-blot comme l'avaient fait Khairnar *et al*. (Khairnar *et al.*, 2007) pour démontrer l'activité kinase de BamB d'*E. coli*. Nous avons utilisé un anticorps anti-sérine phosphorylée (puisque seules les sérines phosphorylées avaient été détectées lors de l'expérience précédente) sur un extrait protéique total de la souche sauvage LA5 ou du mutant LA5Δ*bamB* et un extrait de lysat cellulaire eucaryote comme contrôle positif (Figure 35). Cette expérience a été réalisée deux fois. De plus, nous avons effectué, sur les mêmes extraits protéiques de LA5 et du mutant LA5Δ*bamB*, un western-blot anti-BamB. BamB est bien exprimée chez la souche sauvage contrairement au mutant (Figure 35A). L'anticorps anti-sérine phosphorylée détecte deux bandes à environ 35kDa et 90kDa chez LA5 et chez le mutant LA5Δ*bamB*.

En parallèle, nous avons souhaité étudié les deux « formes » de BamB que nous avons détectées dans la fraction cytoplasmique des clones Δ*bamB* exprimant BamB*Δps*, par une approche d'électrophorèse bidimensionnelle afin de voir si l'une de ces formes pourrait correspondre à BamB phosphorylée (Figure 33). La présence d'une forme phosphorylée de BamB aurait pour conséquence un pI de la protéine plus basique. Malheureusement, le signal pour BamB détecté chez les souches LA5 et LA5Δ*bamB*+*bamB*Δ*ps* est à la même position et ne semble pas présenter un décalage vers un pH plus basique (Figure 33), avec la différence que BamB est présente en quantité plus importante, car surexprimée dans la souche LA5Δ*bamB*+*bamB*Δ*ps*. Ce test a été effectué au moins deux fois sur chaque souche et les mêmes résultats ont été obtenus.

Nous concluons donc de ces tests complémentaires qu'il semble bien y avoir une protéine phosphorylée sur un ou plusieurs résidu(s) sérine dans nos souches, mais il ne s'agit pas de BamB mais d'une protéine de masse moléculaire proche de BamB.

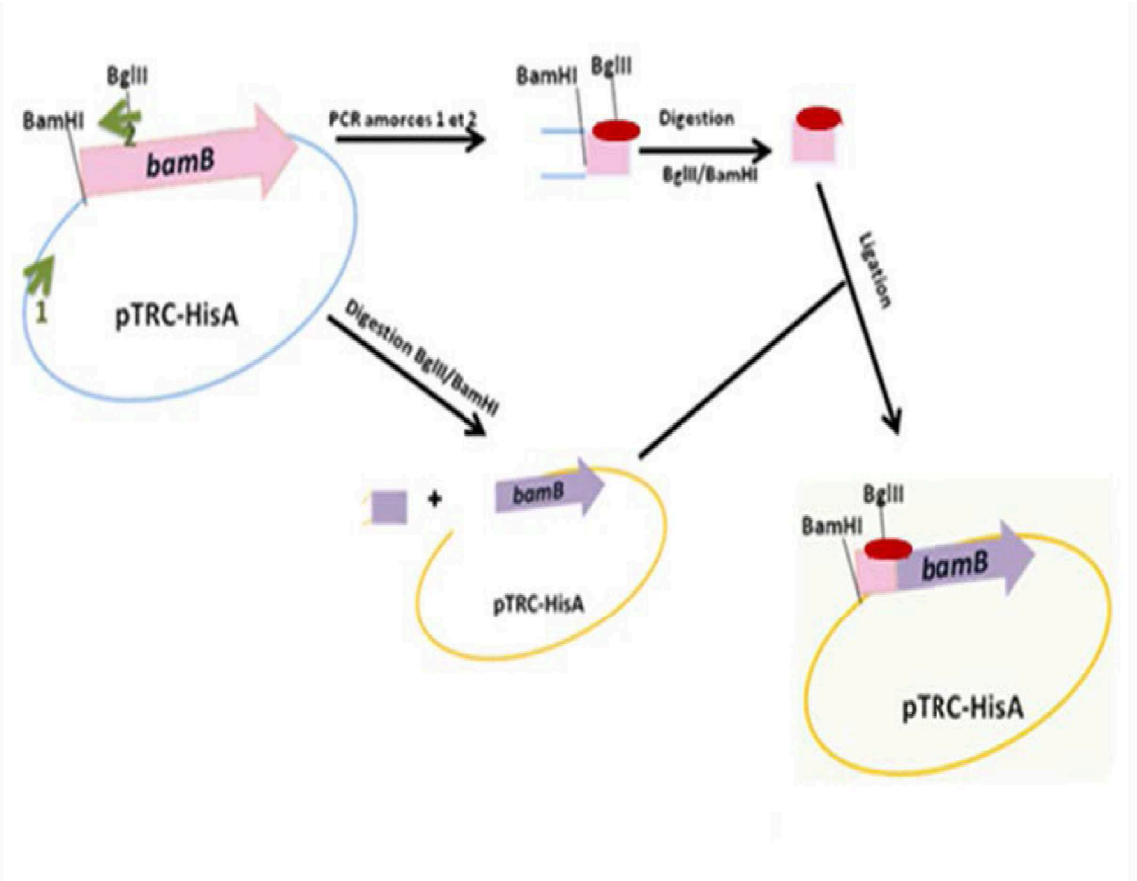


Figure 36. Stratégie de construction du plasmide recombinant exprimant BamBK82A.

Les flèches vertes 1 et 2 représentent les amorces pTRC-His-for et bamB-K82A-clonage-mut, respectivement, utilisées pour le clonage. L'amorce 2 porte la mutation donnant lieu à une alanine en position 82 de la protéine BamB au lieu d'une lysine. La mutation **GC**A dans le gène *bamB* (aboutissant à la protéine BamBK82A) est représentée par un ovale rouge.

III.2. Implication du résidu K82 de BamB dans la perméabilité membranaire, l'expression flagellaire et la fonctionnalité du T3SS-1 chez S. Enteritidis

BamB ne présente pas de séquence spécifique des protéines kinases bactériennes mais elle présente 7 domaines potentiels d'interaction avec la molécule PQQ. Un des motifs conservés décrit chez les sérine/thréonine kinases bactériennes est Dx**K**PxN (Av-Gay et Everett, 2000), présent dans une hélice α hydrophobe au sein de la protéine kinase. Ce motif est essentiel au squelette protéique et donc à la fonction kinase, bien que ne correspondant ni au site de fixation de l'ATP, ni au site de fixation du substrat. Le Pr B. Duclos (IBCP de Lyon) a mis en évidence un résidu lysine en position 82 (K82) de la pré-protéine BamB qui appartient à un motif ressemblant au motif conservé décrit précédemment (VV**K**ALN chez BamB de *Salmonella*). Dans le but de savoir si K82 de BamB est importante pour la fonction de BamB, nous avons souhaité substituer la lysine 82 de BamB en alanine. L'ADN matrice qui nous a servi pour cette mutation est le plasmide recombinant pTRC-HisA-BamB.

Nous avons adopté une stratégie par clonage (Figure 36). Sur le gène *bamB,* le codon AAA (correspondant au résidu K82 de la protéine) se trouve juste en amont du site de restriction BglII. Le plasmide pTRC-HisA-BamB a servi de matrice pour une amplification par deux amorces: l'amorce 1, pTRC-HisA-for, qui est complémentaire d'une région sur le plasmide pTRC-HisA et l'amorce 2, bamB-K82A-clonage-mut, qui a donc été dessinée de façon à contenir à la fois le site de restriction BglII en 5' et la substitution AAA →**GC**A (aboutissant à la mutation ponctuelle K82A dans la protéine finale). Après digestion de l'amplicon ainsi obtenu par les enzymes de restriction BamHI (présent sur le vecteur) et BglII, nous avons effectué cette même digestion sur le plasmide de départ pTRC-HisA-BamB. S'en sont suivis la ligation des produits digérés et la transformation du produit de ligation dans une souche de *E. coli* MC1061. Les clones obtenus après transformation ont été vérifiés par séquençage et se sont avérés corrects (données non montrées). Nous avons souhaité, en première intention, savoir si la mutation K82A avait un impact sur les différents rôles de BamB étudiés. Nous avons choisi de tester la capacité de BamBK82A à complémenter la sensibilité aux antibiotiques et l'expression des protéines flagellaires et du T3SS-1 du mutant Δ*bamB*. L'assemblage des PME n'a pas été testé car nous ne savions pas, à cette époque qu'il serait possible de dissocier l'assemblage des PME de la perméabilité aux antibiotiques. Les plasmides ont donc été introduits dans le mutant et l'expression de la protéine BamBK82A a été induite par l'ajout de 1 mM final d'IPTG. Concernant la sensibilité aux antibiotiques, le

Table 8. Impact de la substitution K82A de BamB sur la sensibilité aux antibiotiques du mutant Δ*bamB* de *S.* Enteritidis

	AMX	VAN	ERY	RIF	BAC
LA5Δ*bamB*	30	14	12	27	13
LA5Δ*bamB*+BamB sauvage	6	6	9	16	6
LA5Δ*bamB*+BamBK82A	6	6	6	16	6

La sensibilité aux antibiotiques suivants : l'amoxicilline (AMX), la vancomycine (VAN), l'éythromycine (ERY), la rifampicine (RIF) et la bacitracine (BAC) a été déterminée par diffusion à partir de disques d'antibiotiques en milieu gélosé, sur le mutant LA5Δ*bamB* seul ou complémenté par la protéine BamB sauvage ou le plasmide recombinant produisant BamBK82A (expérience effectuée sur deux clones indépendants présentant les mêmes résultats). Les diamètres de chaque zone d'inhibition sont présentés en mm (diamètre d'un disque=6mm).

mutant LA5Δ*bamB* exprimant BamBK82A restaure le niveau de résistance de la souche LA5Δ*bamB* à un niveau identique à la souche contrôle produisant BamB sauvage (Table 8).
En conclusion, le résidu K82 n'est pas important pour le rôle de BamB dans la perméabilité aux antibiotiques.
Afin d'étudier la fonctionnalité du T3SS-1, nous avons utilisé les mêmes témoins que précédemment pour vérifier que les dépôts de protéines étaient équivalents et que la protéine BamB était bien exprimée par les différentes souches excepté le mutant (Figure 37). Notons que le signal visible dans la piste correspondant au mutant LA5Δ*bamB* est dû à une quantité importante de BamB dans la piste correspondant au contrôle positif surexprimant BamB sauvage (Figure 37). Comme attendu, le mutant LA5Δ*bamB* exprime et sécrète moins de protéines effectrices du T3SS-1 SipA et SipC et également moins de protéines flagellaires FliC et FliD, par rapport à la souche sauvage LA5. L'expression de BamB en *trans* permet une restauration complète du phénotype du mutant LA5Δ*bamB*. L'expression de BamBK82A permet une complémentation partielle du mutant LA5Δ*bamB* concernant l'expression de FliC dans le culot bactérien et la sécrétion de SipA, SipC, FliC et FliD mais cette complémentation est plus faible que celle observée avec BamB sauvage alors que les deux protéines (BamB et BamBK82A) semblent exprimées à des niveaux similaires par le vecteur pTRC-HisA.

En conclusion, BamBK82 restaure partiellement les capacités d'expression des protéines flagellaires et la fonctionnalité du T3SS-1 du mutant Δ*bamB*. Le résidu K82 pourrait jouer un rôle dans la fonctionnalité de BamB dans ce phénotype.

IV. Autres expériences

Dans le cadre de la caractérisation fonctionnelle de BamB, en début de thèse, différentes expériences ont été réalisées mais n'ont pas eu de suite car elles n'ont pas donné de résultats encourageants. Tout d'abord, nous avons voulu savoir si les fonctions accomplies par BamB sont exclusives de cette protéine. En effet, il a préalablement été montré dans l'équipe que, contrairement à *E. coli*, chez qui BamD est une protéine essentielle, chez *S.* Enteritidis un mutant de délétion *bamD* est viable. Cependant, un mutant Δ*bamD* de *S.* Enteritidis est affecté dans sa croissance, ce qui n'est pas le cas des mutants de délétion partielle Δ$bamD_{172}$ et Δ$bamD_{227}$ (Fardini *et al.*, 2009). Par ailleurs, la délétion de *bamB* ou la délétion partielle de *bamD* implique une augmentation de la sensibilité à certains antibiotiques, un défaut d'assemblage des porines majeures par rapport à une souche sauvage ainsi qu'une diminution

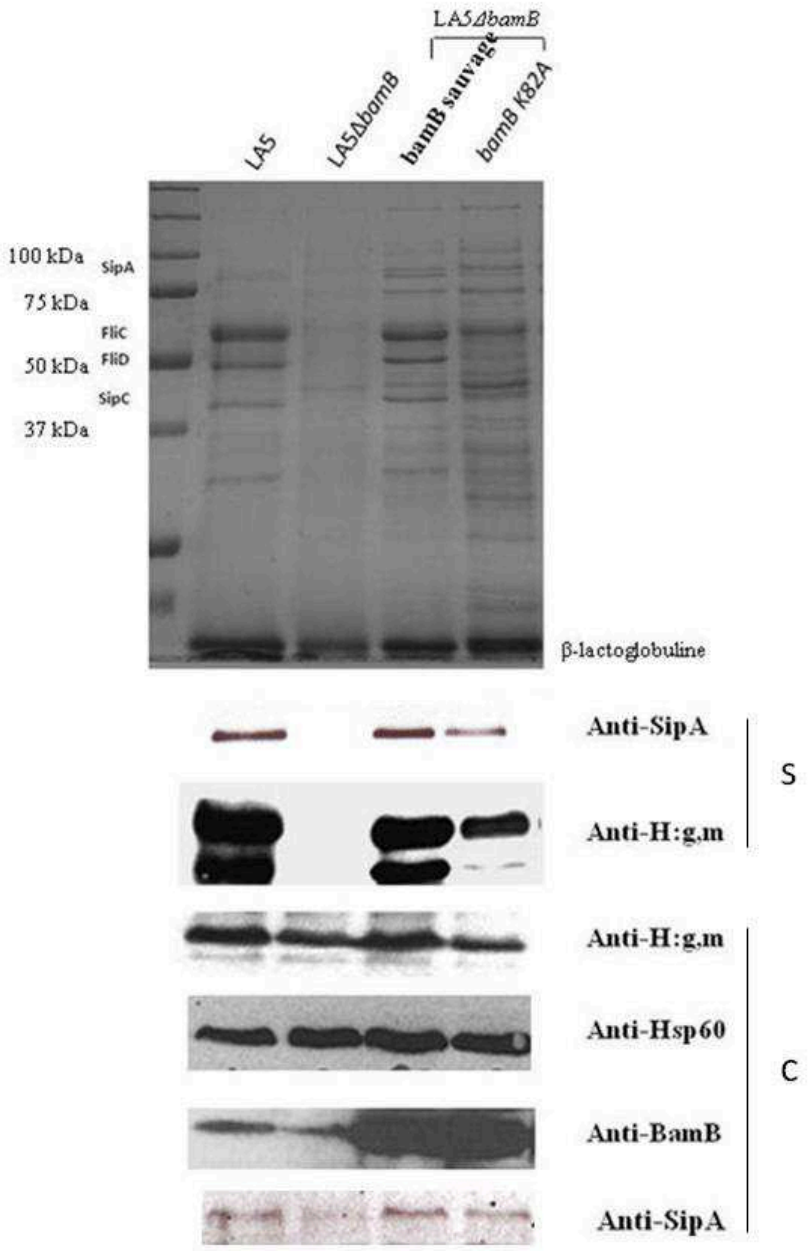


Figure 37. Impact de la substitution K82A de BamB sur l'expression du T3SS-1 et des flagelles et la fonctionnalité du T3SS-1.

Les protéines sécrétées par la souche sauvage *S.* Enteritidis LA5 et le mutant LA5Δ*bamB* seul ou exprimant BamB sauvage ou la protéine BamBK82A cultivés en LB NaCl 0,3M ont été analysées. Les protéines du surnageant ont été précipitées avec du TCA, puis séparées par SDS-PAGE 10%. Le gel a été soit coloré au bleu de Coomassie G250 soit transféré sur une membrane de nitrocellulose et incubée avec les anticorps anti-SipA ou anti-H:g,m qui reconnaît les protéines flagellaires. A partir des mêmes cultures, les bactéries ont été culotées et resuspendues dans du tampon de Laemmli. Après SDS-PAGE et transfert sur une membrane de nitrocellulose, des western-blots utilisant les anticorps anti-H:g,m, anti-Hsp60 ou anti-BamB ont été effectués sur ces derniers échantillons. S : surnageant ; c : culot. Ces résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

de l'expression des gènes codant les T3SS. Nous nous sommes donc demandés si BamB pouvait complémenter un mutant *bamD* et inversement. Nous avons tout d'abord réalisé des antibiogrammes en utilisant les antibiotiques suivants : la rifampicine, la bacitracine, l'érythromycine et la vancomycine auxquels les mutants Δ*bamB,* Δ$bamD_{172}$ et Δ$bamD_{227}$ présentent une augmentation de sensibilité, conformément aux résultats obtenus précédemment au laboratoire (Fardini *et al.*, 2009) (Table 9). Pour chacune des complémentations, 2 clones issus de transformations indépendantes ont été sélectionnés, mais l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Aucune complémentation n'a été observée. Nous avons ensuite décidé de comparer le profil de protéines secrétées des souches LA5, LA5Δ*bamB* et LA5Δ*bamB* exprimant BamD. La complémentation du mutant LA5Δ*bamB* par le plasmide exprimant BamD n'a pas permis de restaurer le défaut de sécrétion du mutant. L'étude des protéines sécrétées dans le cas des complémentations réciproques (c'est-à-dire dans les souches Δ$bamD_{172}$ et Δ$bamD_{227}$ exprimant BamB) n'a pas été effectuée. Nous en concluons donc que la protéine BamD ne peut pas complémenter le défaut de perméabilité aux antibiotiques du mutant LA5Δ*bamB* et inversement.

Par ailleurs, dans l'optique de dissocier les phénotypes d'assemblage des PME et de régulation de l'expression des T3SS, nous nous sommes penchés sur les mutants *ΔbamC* et *ΔbamE*. BamC et BamE appartiennent au complexe BAM et il a été montré que la délétion de *bamC* ou *bamE* entraîne un phénotype de très léger défaut d'assemblage des PME au sein de la membrane externe mais aucune modification de l'expression des gènes des T3SS. Nous avons construit, le double mutant *ΔbamC ΔbamE* en pensant obtenir un phénotype plus aggravé au niveau de l'assemblage des PME, et sur lequel des études d'expression des gènes des T3SS auraient été réalisées, mais ce dernier s'est avéré non viable chez *S.* Enteritidis.

Enfin, nous avons construit chez *S.* Enteritidis, les doubles mutants *ΔompC/ΔompA*, *ΔompC/ΔompD* et *ΔompC/ΔompF*, afin de voir si, une diminution de deux classes de porines majeures pouvait entraîner un phénotype de perméabilité membranaire proche de celui du mutant LA5Δ*bamB*. Nous souhaitions voir ainsi l'impact d'une diminution de ces porines, indépendamment du complexe BAM sur les différents phénotypes étudiés (dans le cas où on assisterait à une augmentation de la sensibilité aux antibiotiques). Nous avons constaté, pour les antibiotiques testés (VAN, RIF, ERY et BAC), que les simples mutants *ΔompA, ΔompC*, *ΔompD* et *ΔompF* ainsi que les doubles mutants *ΔompC/ΔompA*, *ΔompC/ΔompD* et *ΔompC/ΔompF* présentaient tous un niveau de résistance aux antibiotiques identique à la

Table 9. Impact de la complémentation du mutant LA5Δ*bamB* par le plasmide recombinant pAC*bamD* et des mutants LA5Δ$bamD_{172}$ et LA5Δ$bamD_{227}$ par le plasmide recombinant pAC*bamB* sur la perméabilité aux antibiotiques de *S.* Enteritidis

	RIF	BAC	ERY	VAN
LA5	16	6	6	6
ΔbamB	24	11	14	14
***ΔbamB+p bamD* Clone 1**	24	19	22	16
***ΔbamB+p bamD* Clone 2**	24	14	20	15
***ΔbamD*$_{227}$**	23	11	13	14
***ΔbamD*$_{227}$*+p bamB* Clone 1**	21	11	12	12
***ΔbamD*$_{227}$*+p bamB* Clone 2**	23	11	12	13
***ΔbamD*$_{172}$**	27	19	23	16
***ΔbamD*$_{172}$*+p bamB* Clone 1**	31	17	30	21
***ΔbamD*$_{172}$*+p bamB* Clone 2**	30	17	30	21

Les diamètres de chaque zone d'inhibition sont présentés en mm (diamètre d'un disque=6mm).

souche sauvage LA5 (données non montrées). Devant l'absence d'une sensibilité accrue aux antibiotiques, nous n'avons pas étudié le phénotype d'expression des gènes du T3SS chez ces mutants.

DISCUSSION

Table 10. Récapitulatif des caractères phénotypiques des mutants *S.* Enteritidis LA5Δ*bamB* exprimant les différents variants de BamB

	LA5	LA5Δ*bamB*	LA5Δ*bamB* exprimant protéine BamB					
			BamB sauvage	L173S	R176A	D227A	D229A	L173S,L175S,R176A
Interaction BamB/BamA	+	-	+	+	+	+	-	-
Résistance aux antibiotiques	+	-	+	+	+	-	+/-	-
Assemblage des PME	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-
Expression flagellaire / Expression et fonctionnalité T3SS-1	+++	+/-	+++	+++	+++	++	+++	+
Virulence chez la souris	++	+/-	++	++	+	++	++	+/-

Plus la couleur est claire, plus la différence phénotypique est importante en comparaison avec la souche sauvage.
-, +/-, +, ++, +++ correspondent à une évaluation arbitraire de l'intensité de chaque phénotype pour le mutant LA5Δ*bamB* exprimant les différents variants de BamB en comparaison avec les souches *S.* Enteritidis LA5 et LA5Δ*bamB*.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus concernant les phénotypes des différents variants de BamB dans l'assemblage des PME, la perméabilité membranaire aux antibiotiques, l'expression des gènes des T3SS et la virulence chez la souris (Table 10) nous ont permis de renforcer l'idée que BamB peut remplir ses fonctions en dehors du complexe BAM. Ils nous ont également permis de dissocier certains rôles de BamB. Nous n'avons, par contre, pas pu mettre en évidence de rôle cytoplasmique ni d'activité kinase de BamB chez *Salmonella*. Les principaux points de discussion sont décrits dans ce chapitre.

- Il existe des différences entre l'étude des variants de BamB chez *E. coli* et *Salmonella*

Vuong *et al*. ont mis en évidence que, chez *E. coli*, les variants BamB pouvaient être classés en deux groupes : Le groupe constitué des variants BamB L173S, BamB L175S et BamB R176A qui sont très peu voire pas altérés dans leur interaction avec la protéine BamA et le groupe formé des variants BamB L173S,R176A, BamB L175S,R176A, BamB L173S,L175S,R176A, BamB D227A et BamB D229A qui sont incapables d'interagir avec la protéine BamA. Dans cette étude, les phénotypes étudiés ont été l'expression de la protéine LamB, la sensibilité à la vancomycine ainsi que la capacité à former des colonies isolées dans un mutant Δ*degP* à 30°C. Il a été observé que seuls les variants BamB L173S,R176A, BamB L175S,R176A, BamB L173S,L175S,R176A et BamB D227A présentent des défauts phénotypiques (Vuong *et al.*, 2008).

En comparaison avec l'étude de Vuong *et al*. chez *E. coli* (Vuong *et al.*, 2008), nous avons obtenu deux différences majeures dans notre étude des variants de BamB chez *Salmonella*. Tout d'abord, chez *Salmonella*, seuls les variants BamB D229A et L173S,L175S,R176A présentent une altération importante de l'interaction avec BamA tandis qu'en plus de ces variants, chez *E. coli*, le variant BamB D227A est également très altéré dans son interaction avec la protéine BamA. Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation d'anticorps différents lors des expériences de co-immunoprécipitation dans les deux études : Un anticorps monoclonal anti-histidine dans l'étude de Vuong *et al.* et un anticorps polyclonal anti-BamB dans notre étude. En effet, l'anticorps monoclonal anti-histidine ne peut reconnaître que la queue histidique des variants BamB. En fonction de la conformation adoptée par le variant $BamB_{6His}$, une reconnaissance plus ou moins bonne de la queue $_6$His par l'anticorps monoclonal peut être envisagée. Par contre, dans notre étude, nous avons utilisé un anticorps polyclonal anti-BamB de *Salmonella* qui reconnaît de fait un plus grand nombre d'épitopes de

la protéine BamB. Cependant, on ne peut pas exclure que cette différence observée avec le variant BamB D227A soit due à une différence entre *E. coli* et *Salmonella*. En effet, bien que les protéines BamB de *Salmonella* et *E. coli* présentent 90,6% d'identité en acides aminés et que le résidu D227 soit conservé entre les deux genres bactériens, on ne peut exclure une différence structurale entre BamB d'*E. coli* et de *S*. Enteritidis. De plus, BamA d'*E. coli* présente 810 acides aminés alors que BamA de *S*. Enteritidis n'en présente que 804. On peut donc également envisager une différence structurale de ces deux protéines engageant ou non le résidu D227 dans l'interaction avec la protéine BamB. Afin de pouvoir trancher entre ces différentes hypothèses, nous avons effectué un test de co-immunoprécipitation utilisant notre anticorps polyclonal anti-BamB, sur des mutants Δ*bamB* d'*E. coli* (fournis par Mourad-Agha, Université de Reading, Royaume Uni) exprimant les différents variants *E. coli* de BamB. Une interaction du variant BamB D227A avec la protéine BamA aurait confirmé que la différence était due à l'utilisation d'anticorps différents. Malheureusement, notre expérience préliminaire n'a pas pu être correctement interprétée en raison d'une co-immunoprécipitation de la protéine BamA chez le mutant Δ*bamB* d'*E. coli* (données non présentées). Un contrôle du mutant Δ*bamB* d'*E. coli* est donc nécessaire avant de refaire ces expériences.

La seconde différence entre les deux études concerne le phénotype de sensibilité aux antibiotiques du mutant Δ*bamB* exprimant le variant BamB D227A. Chez *E. coli,* ce mutant présente une CMI à la vancomycine intermédiaire entre la souche sauvage et le mutant Δ*bamB* (Vuong *et al.*, 2008). Chez le mutant Δ*bamB* de *Salmonella,* le variant BamB D227A ne permet pas de complémenter la sensibilité du mutant de délétion et on assiste à une sensibilité aussi grande que le mutant Δ*bamB* à tous les antibiotiques testés. A nouveau, nous ne pouvons exclure le fait que cette différence soit due à une différence de fond génétique entre *E. coli* et *Salmonella*.

Enfin, chez *E. coli*, au sein de la souche exprimant le variant BamB D229A, Vuong *et al.* n'ont observé aucun défaut phénotypique malgré une absence d'interaction avec la protéine BamA. Vuong *et al.* ont alors suggéré qu'afin qu'un défaut phénotypique soit observable, il y avait la nécessité de cumuler au moins deux résidus altérés au sein de la protéine BamB. Or, chez *Salmonella*, nous montrons qu'une seule mutation dans BamB peut suffire pour observer un défaut phénotypique : c'est le cas de la mutation R176A qui entraîne un défaut de virulence chez la souris ou de la mutation D227A qui entraîne un défaut de perméabilité aux antibiotiques.

- L'association des résidus L173,L175,R176 est importante pour tous les rôles de BamB : utilisation de ce site pour le développement d'inhibiteurs anti-*Salmonella* ?

La résistance aux antimicrobiens est reconnue comme un problème majeur de santé publique partout dans le monde; ceci entrave la lutte contre de nombreuses maladies infectieuses à la fois chez l'Homme et chez les animaux. De part son rôle important dans la biogénèse de la membrane, la susceptibilité aux antibiotiques et la virulence de *Salmonella,* BamB est une cible thérapeutique potentielle. L'étude de Vuong *et al.* (Vuong *et al.*, 2008) et la nôtre montrons que les résidus L173, L175 et R176 jouent un rôle essentiel dans tous les rôles de BamB. En effet, chez *E. coli*, l'équipe de Vuong *et al.* a montré que le mutant Δ*bamB* exprimant BamB L173S,L175S,R176 n'est pas capable d'interagir avec BamA, présente une sensibilité augmentée aux antibiotiques identique au mutant Δ*bamB* et présente une diminution de la quantité totale de la protéine membranaire LamB (Vuong *et al.*, 2008). De manière similaire, nos résultats chez *Salmonella* montrent que cette souche est la plus altérée sur tous les phénotypes étudiés, y compris en virulence. La protéine BamB mutée sur les acides aminés L173, L175 et R176 a perdu entièrement ses capacités de complémentation d'un mutant Δ*bamB*. Ces trois résidus sont situés au niveau de la boucle 4 qui relie les pales 4 et 5 du β-propeller BamB. Cette boucle semble importante pour l'interaction de BamB avec le POTRA 3 de BamA (Noinaj *et al.*, 2011). Au vu de l'ensemble des phénotypes altérés que présente la souche exprimant BamB L173S,L175S,R176, ce mutant seul ne permet pas de décrypter la relation entre les différents rôles de BamB mais les résidus L173, L175 et R176 pourraient constituer une cible intéressante pour la création de molécules anti-*Salmonella*. Une approche de conception d'inhibiteurs assistée par ordinateur utilisant la structure cristallographique de BamB pourrait être utilisée.

- L'interaction BamA/BamB ne semble pas absolument requise pour les différents rôles de BamB

Le mutant exprimant le variant BamB D229A présente un niveau sauvage de PME à la membrane, d'expression du T3SS-1 et du flagelle et de virulence chez la souris. Cependant, ce variant est incapable d'interagir avec BamA. Ces résultats suggèrent donc que l'interaction de BamB avec BamA n'est pas absolument nécessaire pour que les PME soient correctement assemblées à la membrane, pour une expression optimale des protéines du T3SS-1 et du

flagelle ainsi que pour la virulence chez la souris. Néanmoins, une grande altération de l'interaction BamA/BamB *in vitro*, c'est-à-dire une absence de signal détecté pour BamA en co-immunoprécipitation dans nos expériences, n'exclut pas que dans les conditions *in vivo* au sein de la bactérie, une faible interaction BamA/BamB D229A puisse exister et être suffisante pour permettre à BamB d'accomplir ses fonctions dans l'assemblage des PME, l'expression du T3SS-1 et du flagelle et la virulence.

Dans l'hypothèse où l'interaction BamA/BamB n'est pas absolument requise pour 3 des rôles décrits pour BamB dans la littérature, cela laisse penser que BamB pourrait être fonctionnelle en dehors du complexe BAM. Dans la littérature, deux études renforcent cette hypothèse, même si elles suggèrent chacune un compartiment bactérien différent dans lequel la protéine BamB serait active. Ieva *et al.* ont décrit un rôle de BamB et de BamD plus tardif que BamA dans l'assemblage de l'autotransporteur EspP chez *E. coli* en montrant que ces lipoprotéines interagissent avec un domaine de la protéine EspP après que cette dernière ait interagi avec la protéine BamA (Ieva *et al.*, 2011). Ce rôle de BamB « post-BamA » se déroulerait dans le périplasme ou dans la membrane externe. Khairnar *et al.* ont, quant à eux, décrit une activité kinase de la protéine BamB chez *E. coli*, activité qui ne peut avoir lieu que dans le cytoplasme puisque le périplasme est dépourvu d'ATP (Khairnar *et al.*, 2007). Nos travaux sur la séquestration de BamB dans le cytoplasme devraient permettre de documenter ce rôle potentiel de BamB en dehors du complexe BAM. Cependant, à l'heure actuelle, nos résultats ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer un rôle de BamB dans le cytoplasme du fait de l'absence de démonstration d'une localisation exclusive de BamB dans le cytoplasme de la souche exprimant BamBΔps. Des expériences de fractionnement cellulaires supplémentaires devront être réalisées. En complément, il serait intéressant de voir l'impact d'une localisation exclusivement périplasmique ou associée à la membrane interne de BamB sur la capacité de cette protéine à remplir ces différents rôles.

Un des résultats les plus étonnants est que l'interaction BamA/BamB ne soit pas absolument requise pour l'assemblage des PME à la membrane (résultats obtenus avec le mutant exprimant le variant BamB D229A chez *E. coli* et *Salmonella*), puisque le complexe BAM joue un rôle essentiel dans l'assemblage de ces protéines. Une hypothèse consiste à dire que l'interaction BamA/BamB serait transitoire puisque BamB peut être co-immunoprécipitée avec BamA mais que cette interaction serait non essentielle à la fonctionnalité du complexe BAM puisque le variant BamB D229A permet la mise en place des porines majeures à la membrane du mutant Δ*bamB* alors qu'il est incapable d'interagir avec BamA.

- Le rôle de BamB dans la perméabilité membranaire ne s'explique pas uniquement par son rôle dans l'assemblage des PME

Jusqu'à présent, les études sur le complexe BAM considéraient que la délétion du gène *bamB* induisait un défaut important d'assemblage des PME à la membrane, suggérant un défaut d'intégrité membranaire. Ce défaut d'intégrité membranaire pouvait expliquer l'augmentation de la perméabilité aux antibiotiques de grande taille tels que la vancomycine ou la bacitracine (Onufryk *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2005; Vuong *et al.*, 2008). Nos résultats remettent en question cette vision puisque les variants BamB D227A et BamB D229A permettent un assemblage correct des PME à la membrane alors qu'ils ne permettent pas de complémenter la sensibilité aux antibiotiques du mutant Δ*bamB*. Une des hypothèses qui peut être émise est que la complémentation du mutant Δ*bamB* par les variants BamB D227A et BamB D229A ne concerne pas l'ensemble des PME à la membrane, mais seulement une partie d'entre elles dont les PME majeures, donnant ainsi l'impression d'un profil membranaire de type sauvage chez le mutant Δ*bamB* exprimant l'un de ces deux variants. Une explication simple peut être proposée pour la complémentation du niveau des porines majeures. En effet, chez un mutant Δ*bamB* d'*E. coli* ou de *Salmonella*, le système de réponse au stress σE est activé (Fardini *et al.*, 2007; Onufryk *et al.*, 2005) ce qui conduit à l'activation de la transcription de plusieurs petits ARN, tels que MicA et RybB, qui vont réprimer l'expression des porines majeures (Papenfort *et al.*, 2006). Cette activation de σE sert à contrecarrer l'accumulation dans le périplasme des PME. Chez le mutant Δ*bamB* exprimant BamB D227A ou BamB D229A, le système σE n'est probablement pas activé, en raison de l'expression de la protéine BamB, pouvant ainsi expliquer l'expression et l'assemblage des porines majeures dans la membrane de ces souches. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait mesurer la transcription de *rpoE* chez ces souches en comparaison du mutant Δ*bamB* et de la souche sauvage. Comment expliquer que le mutant Δ*bamB* exprimant le variant BamB D227A ou BamB D229A demeurent plus sensible aux antibiotiques que la souche sauvage alors que ces souches ne présentent pas de défaut majeur d'assemblage des PME ? Une hypothèse que l'on peut émettre est un changement de conformation d'une ou plusieurs pompe d'efflux induisant un changement du diamètre de la pompe permettant ainsi l'entrée de larges molécules telles que la vancomycine ou la bacitracine dans la bactérie comme cela a pu être montré pour la pompe MtrCDE de *Neisseria gonorrhoeae* (Janganan *et al.*, 2011).

Mais alors, une question subsiste : comment expliquer que la diminution de l'expression et donc de l'assemblage des PME majeures observée chez le mutant Δ*bamB* ne rende pas ce mutant plus résistant aux molécules antibiotiques ? De manière intéressante, une étude a décrit que le mutant *ΔbamB* chez *E. coli*, présente une plus grande quantité de LPS dans sa membrane externe (Charlson *et al.*, 2006). Par ailleurs, d'autres études portant sur le gène essentiel *imp* ont mis en évidence qu'une souche d'*E. coli imp4213* déplétée du gène *imp* présente un défaut de composition lipidique à la membrane externe qui rend la bactérie sensible à des antibiotiques, détergents et sels biliaires. L'inactivation du gène *bamB* rend le mutant *imp4213* résistant à ces molécules (Bos *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2005). Nous pouvons alors imaginer que BamB soit impliquée directement ou indirectement *via* Imp dans la distribution de LPS au sein de la membrane externe. Ainsi, en plus de l'activation du système σ^E, le mutant *ΔbamB* pourrait présenter un défaut de distribution du LPS au sein de sa membrane externe.

- Le rôle de BamB dans le contrôle de l'expression des T3SS : conséquence d'un défaut d'assemblage du T3SS à la membrane ?

Les études réalisées au laboratoire préalablement à ma thèse suggéraient que la diminution de transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des T3SS chez un mutant *ΔbamB* n'était pas une conséquence d'un défaut d'assemblage des PME, et par conséquent des T3SS, dans la membrane externe. En effet, en forçant l'expression du régulateur central de l'îlot de pathogénicité SPI-1 de *Salmonella,* HilA, un mutant Δ*bamB* arrive à mettre en place un T3SS-1 fonctionnel dans sa membrane externe. Réciproquement, dans un mutant Δ*invA* qui est incapable de mettre en place un T3SS-1 fonctionnel au sein de la membrane externe, on n'observe pas de rétrocontrôle de la transcription des gènes du T3SS-1 (Fardini *et al.*, 2007). De la même manière, le contrôle de l'expression des T3SS ne semble pas être la conséquence d'une activation des systèmes de réponse aux stress membranaire chez le mutant Δ*bamB* suite au défaut d'assemblage des PME. En effet, l'équipe n'a pas observé d'activation du système de réponse au stress CpxA/R dans un mutant Δ*bamB*. De plus, il a été montré d'une part qu'un double mutant Δ*bamB*Δ*rpoE* n'est pas viable démontrant ainsi que l'activation du système de réponse au stress σ^E est essentielle à la survie du mutant Δ*bamB* et d'autre part que la surexpression de σ^E dans une souche sauvage ne diminue pas l'expression du T3SS-1 suggérant ainsi que ce n'est pas l'activation de σ^E qui est responsable du contrôle de l'expression des T3SS chez un mutant Δ*bamB* (A. Carpentier, Y. Fardini, données non

publiées). Nous espérions que notre étude des mutants ponctuels de BamB altérant ou non l'interaction de cette protéine avec BamA aurait pu nous aider à répondre à cette question ce qui n'a pas été le cas. En effet, nos résultats ne nous permettent pas de dissocier les rôles de BamB dans l'expression/fonctionnalité des T3SS et l'assemblage des PME. Tous nos mutants exprimant les variants de BamB (à l'exception de celui qui exprime le variant L173S,L175S,R176A qui est altére dans tous les phénotypes étudiés) ne présentent ni d'altération de l'assemblage de leur PME majeures ni d'altération de l'expression et de la fonctionnalité du T3SS-1 et du flagelle.

- Quel est le rôle de BamB dans la virulence de *Salmonella* ?

BamB joue un rôle majeur dans la virulence de *Salmonella* en modèle murin d'infection systémique létale puisque 60% des souris inoculées avec un mutant Δ*bamB* survivent à l'infection par *Salmonella* alors que toutes les souris inoculées avec la souche parentale meurent entre 6 et 10 jours post-inoculation (Fardini *et al.*, 2007). Pour tenter d'expliquer cet important défaut de virulence du mutant Δ*bamB* chez la souris, nous avons étudié la virulence de ce mutant exprimant les différents variants de BamB puisque nous avions pu mettre en évidence des différences phénotypiques in vitro entre ces différents variants.

Nos résultats ne permettent pas de prouver que le rôle de BamB dans le contrôle de l'expression des gènes codant les T3SS est important *in* vivo puisque tous les mutants *ΔbamB* exprimant les variants de BamB complémentent le défaut d'expression et de fonctionnalité du T3SS-1 et flagelle du mutant *ΔbamB* (toujours à l'exception du mutant exprimant le variant BamB L173S,L175S,R176A qui est altéré sur tous les phénoypes étudiés). Cependant, l'implication des T3SS comme facteurs majeurs de la virulence de *Salmonella,* notamment en modèle murin, a été décrite largement dans la littérature (Galan et Curtiss, 1989; Hensel *et al.*, 1995; Wallis et Galyov, 2000).

Une des hypothèses que l'on pouvait émettre pour expliquer la virulence atténuée du mutant *ΔbamB* était que l'augmentation de perméabilité membranaire pouvait le rendre plus sensible à l'environnement gastrique et aux peptides antimicrobiens. En observant les résultats obtenus pour le mutant exprimant le variant BamB D227A, nous pouvons remarquer que cette souche est aussi virulente que la souche sauvage alors qu'elle présente un niveau de sensibilité aux antibiotiques similaire à celui du mutant de délétion *ΔbamB*. De plus, des données non publiées de notre équipe montrent qu'après inoculation par voie orale, un mutant *ΔbamB* colonise l'iléon des souris à 3 jours post-inoculation et qu'il persiste dans les caeca de

poussins pendant plusieurs semaines aussi bien que la souche sauvage. Ces résultats montrent, que l'augmentation de la perméabilité membranaire du mutant *ΔbamB* à des molécules antimicrobiennes n'explique pas la faible virulence *in vivo* du mutant. De plus, ils suggèrent que l'intégrité membranaire du mutant *ΔbamB* n'est pas aussi défectueuse que pouvait laisser penser le résultat d'une sensibilité augmentée du mutant *ΔbamB* à la large molécule qu'est la vancomycine. Ces résultats sont en accord avec le faible nombre d'antibiotiques auxquels le mutant *ΔbamB* présente une augmentation de sensibilité.

De manière intéressante, les résultats concernant le mutant exprimant le variant BamB R176A montrent que malgré un phénotype sauvage pour les phénotypes étudiés *in vitro*, ce mutant présente une virulence atténuée chez la souris. Il colonise les rates à un niveau intermédiaire entre la souche sauvage et le mutant de délétion. Cela suggère un autre rôle de BamB dans la virulence. Une des explications de ce phénomène peut être l'implication de BamB dans la résistance au stress oxydatif dans les cellules phagocytaires (van der Straaten *et al.*, 2001; van Diepen *et al.*, 2002). En effet, ces études ont montré qu'un mutant de *S.* Typhimurium n'exprimant plus la protéine BamB (nommée SspJ dans ces études) présente une virulence atténuée *in vivo* chez la souris due à une sensibilité du mutant aux ions superoxydes que la bactérie rencontre lors de son internalisation dans les macrophages. Ce même mutant présente une virulence similaire à celle de la souche sauvage après infection de souris p47phox$^{-/-}$ qui sont incapables de synthétiser la NADPH oxydase dans leurs cellules phagocytaires et qui ne peuvent de ce fait plus produire d'ions superoxydes. On peut également envisager une diminution d'expression ou de fonctionnalité du T3SS-2 que nous n'avons pas étudié au cours de ma thèse. En effet, on peut imaginer que le résidu R176 de BamB soit particulièrement important dans l'induction d'une éventuelle cascade de signalisation aboutissant à l'activation de l'expression des gènes du T3SS-2.

- BamB a-t-elle une activité kinase ?

En considérant, la description d'une activité kinase pour BamB chez *E. coli* et son implication dans la réparation de l'ADN et la recombinaison homologue (Khairnar *et al.*, 2007), il était légitime de rechercher une activité kinase de BamB et de voir si cette protéine présente une activité dans le cytoplasme de *Salmonella*. En compilant les résultats des expériences que nous avons réalisées, il ne nous est pas possible de trancher sur une activité kinase de BamB chez *Salmonella*.

Un argument en faveur d'une activité kinase de BamB de *Salmonella* est l'expérience d'autophosphorylation utilisant de l'ATP radioactif, effectuée en collaboration avec le Pr. B. Duclos (IBCP, Lyon) qui a permis de mettre en évidence un signal positif pour une protéine présentant une masse moléculaire similaire à la protéine BamB. L'autophosphorylation a lieu sur un ou plusieurs résidus sérine (Figure 34). Il est important de spécifier que cette activité n'a pu être visualisée qu'après une déphosphorylation de la protéine BamB purifiée, préalablement au test, de manière similaire à l'étude de Khairnar *et al*. (Khairnar *et al.*, 2007).
Cependant, certains résultats obtenus lors de ma thèse vont à l'encontre d'une activité kinase de BamB chez *Salmonella*. En effet, à l'issue de l'expérience réalisée par le Pr. B. Duclos (IBCP, Lyon), la protéine contenue dans l'échantillon en présence d'ATP froid, envoyé au spectromètre de masse, n'a pas été identifiée comme étant BamB, mais une autre protéine dont l'identité ne nous a pas été fournie. De plus, les seuls signaux positifs révélés (dont une bande à une masse moléculaire proche de celle de BamB) sur le western-blot que nous avons réalisé en utilisant un anticorps anti-phospho-sérine sont présents chez la souche sauvage et chez le mutant Δ*bamB* de *Salmonella*, signifiant que *Salmonella* présente au moins deux protéines phosphorylées en des résidus sérine mais qu'il ne s'agit pas de la protéine BamB. Par ailleurs, l'équipe du Pr C. Roumestand (CNRS, Montpellier) n'a pas pu mettre en évidence par RMN de fixation d'ATP jusqu'à des concentrations élevées sur la protéine BamB purifiée de *Salmonella*.
En considérant les données contradictoires dont nous disposions, nous avons souhaité après l'arrêt des manipulations de ma thèse, refaire les expériences d'autophosphorylation sur la protéine BamB purifiée. Dans cette optique, l'équipe du Dr C. Grangeasse (IBCP, Lyon) a testé l'activité d'autophosphorylation de BamB. Des signaux faibles, dont un lorsque la réaction est réalisée en présence de poly-lysine qui « dope » la phosphorylation, ont été observés sur les autoradiogrammes à une masse moléculaire proche de celle de BamB mais uniquement après une surexposition de 32h alors que 15min à 2h suffisent généralement dans le cas de protéines kinases purifiées. Ce signal disparait chez la souche exprimant BamBK82A. A noter la détection d'un signal à environ 80 kDa pour tous les échantillons testés, ce qui est troublant puisque la protéine ainsi révélée présente une masse moléculaire proche de celle révélée en western-blot avec l'anti-phosphosérine. De plus, une analyse de la protéine BamB purifiée en spectrométrie de masse n'a pas permis de mettre en évidence de site de phosphorylation. L'ensemble de ces résultats n'est pas en faveur d'une activité kinase de BamB.

- BamB serait-elle impliquée dans une cascade de signalisation ?

Des arguments récents issus de la littérature peuvent nous laisser penser que BamB puisse être impliquée dans une cascade de signalisation. En effet, le gène *bamB* appartient au régulon σ^E, et ce gène est situé entre les cadres ouverts de lecture *yfgM* et *engA*. Ces 3 ORFs sont co-transcrits chez *Salmonella* (S. Elis, résultats non publiés). Chez *E. coli*, YfgM est une protéine de fonction encore inconnue qui est présente à la membrane interne et possède des motifs d'interaction protéine-protéine. Elle forme un complexe avec la chaperone périplasmique PpiD (Maddalo *et al.*, 2011). EngA (également nommée Der), quant à elle, est une GTPase cytoplasmique capable d'interagir avec les ribosomes lorsqu'elle lie le GTP (Lamb, 2007). Récemment une association de cette protéine à la membrane en complexe avec les protéines OmpA et OmpC a été suggérée (Lee *et al.*, 2011). Il est alors tentant de penser que BamB puisse être impliquée dans une voie de transduction du signal impliquant les protéines YfgM et EngA.

De plus, une récente étude chez *Salmonella* a montré qu'en l'absence de MreC, une protéine du cytosquelette bactérien interagissant avec une autre protéine du cytosquelette, MreB qui est un homologue de l'actine, on assiste à une diminution de l'expression des gènes du T3SS-1 et du flagelle mais pas du T3SS-2. De plus, en forçant, dans ce mutant, l'expression des gènes de SPI-1, en apportant en *trans*, les gènes codant les régulateurs du T3SS-1 et du flagelle, HilA et FlhD4C2 respectivement, la transcription des gènes du T3SS-1 et du flagelle se voit augmentée et l'assemblage du T3SS-1 se fait de manière correcte. Ces résultats signifient que la protéine du cytosquelette MreC n'est pas requise pour l'assemblage des facteurs de virulence que sont le T3SS-1 et le flagelle mais est essentielle à leur expression (Bulmer *et al.*, 2012). Les systèmes à deux composants étant impliqués dans la transduction du signal en réponse à un stimulus à la surface bactérienne, Bulmer *et al.* ont construit des double mutants en délétant *mreC* ainsi que le gène codant la protéine senseur ou régulatrice de chacun des systèmes à deux composants décrits chez *Salmonella.* Ils ont ainsi pu mettre en évidence l'implication de la protéine kinase senseur RcsC (du système Rcs) dans les phénotypes observés chez le mutant Δ*mreC*. Il serait intéressant de se pencher sur ces travaux dans le cadre de la caractérisation du rôle de BamB dans l'expression des T3SS et dans la virulence puisqu'un mutant Δ*bamB* présente le même défaut d'expression des gènes des T3SS pouvant être restauré en *trans* avec le gène *hilA*, avec cette différence qu'il y a également une diminution de l'expression des gènes du T3SS-2. Il serait, de ce fait, intéressant de voir d'une

part, si le cytosquelette bactérien est altéré dans un mutant Δ*bamB* et d'autre part, de voir si le système à deux composants RcsBC est impliqué dans les phénotypes que l'on observe.

Une des surprises de la thèse a été la mise en évidence d'une dissociation du rôle de BamB dans la perméabilité aux antibiotiques de son rôle dans l'assemblage des PME ainsi qu'une dissociation du rôle de BamB dans son interaction avec le complexe BAM de son rôle dans la virulence chez la souris.

Une piste de recherche sur laquelle j'aurais aimé me pencher si j'avais à poursuivre ce projet aurait été de voir si BamB s'inscrit dans une cascade de signalisation impliquant les protéines PpiD, YfgM et EngA et/ou une ou plusieurs protéines du cytosquelette bactérien.

Bibliographie

Akbar, S., Schechter, L.M., Lostroh, C.P., and Lee, C.A. (2003) AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* **47**: 715-728.

Akeda, Y., and Galan, J.E. (2004) Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J Bacteriol* **186**: 2402-2412.

Akeda, Y., and Galan, J.E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911-915.

Albrecht, R., and Zeth, K. (2011) Structural basis of outer membrane protein biogenesis in bacteria. *J Biol Chem* **286**: 27792-27803.

Altier, C. (2005) Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* **43**: 85-92.

Amy, M., Velge, P., Senocq, D., Bottreau, E., Mompart, F., and Virlogeux-Payant, I. (2004) Identification of a new Salmonella enterica serovar Enteritidis locus involved in cell invasion and in the colonisation of chicks. *Res Microbiol* **155**: 543-552.

Anderson, R.P., and Roth, J.R. (1978) Tandem chromosomal duplications in *Salmonella* Typhimurium: fusion of histidine genes to novel promoters. *J Mol Biol* **119**: 147-166.

Anonymous (2012) The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA journal* **10**.

Anwari, K., Webb, C.T., Poggio, S., Perry, A.J., Belousoff, M., Celik, N., Ramm, G., Lovering, A., Sockett, R.E., Smit, J., Jacobs-Wagner, C., and Lithgow, T. (2012) The evolution of new lipoprotein subunits of the bacterial outer membrane BAM complex. *Mol Microbiol* **84**: 832-844.

Arricau, N., Hermant, D., Waxin, H., Ecobichon, C., Duffey, P.S., and Popoff, M.Y. (1998) The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella* Typhi differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol Microbiol* **29**: 835-850.

Av-Gay, Y., and Everett, M. (2000) The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **8**: 238-244.

Babu, M.M., Priya, M.L., Selvan, A.T., Madera, M., Gough, J., Aravind, L., and Sankaran, K. (2006) A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J Bacteriol* **188**: 2761-2773.

Bakowski, M.A., Braun, V., and Brumell, J.H. (2008) *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic* **9**: 2022-2031.

Bakowski, M.A., Braun, V., Lam, G.Y., Yeung, T., Heo, W.D., Meyer, T., Finlay, B.B., Grinstein, S., and Brumell, J.H. (2010) The phosphoinositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Host Microbe* **7**: 453-462.

Baxter, M.A., Fahlen, T.F., Wilson, R.L., and Jones, B.D. (2003) HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* **71**: 1295-1305.

Baxter, M.A., and Jones, B.D. (2005) The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infect Immun* **73**: 1377-1385.

Bayer, M.E. (1968) Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **53**: 395-404.

Bayer, M.E. (1991) Zones of membrane adhesion in the cryofixed envelope of *Escherichia coli*. *J Struct Biol* **107**: 268-280.

Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F.X., and Gross, C.A. (2001) The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J* **20**: 285-294.

Bennion, D., Charlson, E.S., Coon, E., and Misra, R. (2010) Dissection of beta-barrel outer membrane protein assembly pathways through characterizing BamA POTRA 1 mutants of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **77**: 1153-1171.

Bernal-Bayard, J., and Ramos-Morales, F. (2009) *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* **284**: 27587-27595.

Beuchat, L.R., Ryu, J.H., Adler, B.B., and Harrison, M.D. (2006) Death of *Salmonella, Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in shelf-stable, dairy-based, pourable salad dressings. *J Food Prot* **69**: 801-814.

Bijlsma, J.J., and Groisman, E.A. (2005) The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **57**: 85-96.

Bishop, R.E. (2008) Structural biology of membrane-intrinsic beta-barrel enzymes: sentinels of the bacterial outer membrane. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1881-1896.

Bodelon, G., Marin, E., and Fernandez, L.A. (2009) Role of periplasmic chaperones and BamA (YaeT/Omp85) in folding and secretion of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* **191**: 5169-5179.

Bohez, L., Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Dewulf, J., Haesebrouck, F., and Van Immerseel, F. (2008) The *Salmonella* Pathogenicity Island 2 regulator *ssrA* promotes reproductive tract but not intestinal colonization in chickens. *Vet Microbiol* **126**: 216-224.

Bos, M.P., Tefsen, B., Geurtsen, J., and Tommassen, J. (2004) Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9417-9422.

Brawn, L.C., Hayward, R.D., and Koronakis, V. (2007) *Salmonella SPI1* effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe* **1**: 63-75.

Briggs, M.S., Cornell, D.G., Dluhy, R.A., and Gierasch, L.M. (1986) Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export. *Science* **233**: 206-208.

Browne, S.H., Hasegawa, P., Okamoto, S., Fierer, J., and Guiney, D.G. (2008) Identification of *Salmonella* SPI-2 secretion system components required for SpvB-mediated cytotoxicity in macrophages and virulence in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**: 194-201.

Brumell, J.H., Kujat-Choy, S., Brown, N.F., Vallance, B.A., Knodler, L.A., and Finlay, B.B. (2003) SopD2 is a novel type III secreted effector of *Salmonella* Typhimurium that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. *Traffic* **4**: 36-48.

Bullmann, L., Haarmann, R., Mirus, O., Bredemeier, R., Hempel, F., Maier, U.G., and Schleiff, E. (2010) Filling the gap, evolutionarily conserved Omp85 in plastids of chromalveolates. *J Biol Chem* **285**: 6848-6856.

Bulmer, D.M., Kharraz, L., Grant, A.J., Dean, P., Morgan, F.J., Karavolos, M.H., Doble, A.C., McGhie, E.J., Koronakis, V., Daniel, R.A., Mastroeni, P., and Khan, C.M. (2012) The bacterial cytoskeleton modulates motility, type 3 secretion, and colonization in *Salmonella*. *PLoS Pathog* **8**: e1002500.

Burgess, N.K., Dao, T.P., Stanley, A.M., and Fleming, K.G. (2008) Beta-barrel proteins that reside in the *Escherichia coli* outer membrane in vivo demonstrate varied folding behavior in vitro. *J Biol Chem* **283**: 26748-26758.

Calenge, F., Kaiser, P., Vignal, A., and Beaumont, C. (2010) Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. *Genet Sel Evol* **42**: 11.

Callaway, T.R., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Byrd, J.A., and Nisbet, D.J. (2008) Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *J Anim Sci* **86**: E163-172.

Cao, T.B., and Saier, M.H., Jr. (2003) The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochim Biophys Acta* **1609**: 115-125.

Carrol, M.E., Jackett, P.S., Aber, V.R., and Lowrie, D.B. (1979) Phagolysosome formation, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and the fate of *Salmonella* Typhimurium within mouse peritoneal macrophages. *J Gen Microbiol* **110**: 421-429.

Castillo, N.A., Perdigon, G., and de Moreno de Leblanc, A. (2011) Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol* **11**: 177.

Charlson, E.S., Werner, J.N., and Misra, R. (2006) Differential effects of *yfgL* mutation on *Escherichia coli* outer membrane proteins and lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **188**: 7186-7194.

Chilcott, G.S., and Hughes, K.T. (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 694-708.

Chng, S.S., Ruiz, N., Chimalakonda, G., Silhavy, T.J., and Kahne, D. (2010) Characterization of the two-protein complex in *Escherichia coli* responsible for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 5363-5368.

Clantin, B., Delattre, A.S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A.C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., and Villeret, V. (2007) Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* **317**: 957-961.

Clegg, S., and Hughes, K.T. (2002) FimZ is a molecular link between sticking and swimming in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**: 1209-1213.

Collin, S., Guilvout, I., Chami, M., and Pugsley, A.P. (2007) YaeT-independent multimerization and outer membrane association of secretin PulD. *Mol Microbiol* **64**: 1350-1357.

Collins, R.F., and Derrick, J.P. (2007) Wza: a new structural paradigm for outer membrane secretory proteins? *Trends Microbiol* **15**: 96-100.

Coombes, B.K., Coburn, B.A., Potter, A.A., Gomis, S., Mirakhur, K., Li, Y., and Finlay, B.B. (2005) Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* **73**: 7161-7169.

Crhanova, M., Malcova, M., Mazgajova, M., Karasova, D., Sebkova, A., Fucikova, A., Bortlicek, Z., Pilousova, L., Kyrova, K., Dekanova, M., and Rychlik, I. (2011) LPS structure influences protein secretion in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* **152**: 131-137.

Darwin, K.H., and Miller, V.L. (1999) InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* **181**: 4949-4954.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.

de Cock, H., Struyve, M., Kleerebezem, M., van der Krift, T., and Tommassen, J. (1997) Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **269**: 473-478.

Deane, J.E., Abrusci, P., Johnson, S., and Lea, S.M. (2010) Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell Mol Life Sci* **67**: 1065-1075.

Dekker, N. (2000) Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. *Mol Microbiol* **35**: 711-717.

Desin, T.S., Lam, P.K., Koch, B., Mickael, C., Berberov, E., Wisner, A.L., Townsend, H.G., Potter, A.A., and Koster, W. (2009) *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island 1 is not essential for but facilitates rapid systemic spread in chickens. *Infect Immun* **77**: 2866-2875.

Dibb-Fuller, M.P., Allen-Vercoe, E., Thorns, C.J., and Woodward, M.J. (1999) Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella* Enteritidis. *Microbiology* **145 (Pt 5)**: 1023-1031.

Dibb-Fuller, M.P., and Woodward, M.J. (2000) Contribution of fimbriae and flagella of *Salmonella* Enteritidis to colonization and invasion of chicks. *Avian Pathol* **29**: 295-304.

Dieye, Y., Ameiss, K., Mellata, M., and Curtiss, R., 3rd (2009) The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol* **9**: 3.

Doyle, M.P., and Erickson, M.C. (2006) Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poult Sci* **85**: 960-973.

Drecktrah, D., Knodler, L.A., Howe, D., and Steele-Mortimer, O. (2007) *Salmonella* trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic* **8**: 212-225.

du Plessis, D.J., Nouwen, N., and Driessen, A.J. (2011) The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta* **1808**: 851-865.

Duclos, B., Marcandier, S., and Cozzone, A.J. (1991) Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis. *Methods Enzymol* **201**: 10-21.

Ellermeier, C.D., and Slauch, J.M. (2003) RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **185**: 5096-5108.

Endo, T., Kawano, S., and Yamano, K. (2011) BamE structure: the assembly of beta-barrel proteins in the outer membranes of bacteria and mitochondria. *EMBO Rep* **12**: 94-95.

Fahlen, T.F., Mathur, N., and Jones, B.D. (2000) Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella* Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**: 25-35.

Fardini, Y., Chettab, K., Grepinet, O., Rochereau, S., Trotereau, J., Harvey, P., Amy, M., Bottreau, E., Bumstead, N., Barrow, P.A., and Virlogeux-Payant, I. (2007) The YfgL lipoprotein is essential for type III secretion system expression and virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infect Immun* **75**: 358-370.

Fardini, Y., Trotereau, J., Bottreau, E., Souchard, C., Velge, P., and Virlogeux-Payant, I. (2009) Investigation of the role of the BAM complex and SurA chaperone in outer-membrane protein biogenesis and type III secretion system expression in *Salmonella*. *Microbiology* **155**: 1613-1622.

Fierer, J., Okamoto, S., Banerjee, A., and Guiney, D.G. (2012) Diarrhea and colitis in mice require the *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded secretion function but not SifA or Spv effectors. *Infect Immun* **80**: 3360-3370.

Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Watthey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., and Venter, J.C. (1997) Genomic sequence of a Lyme disease Spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**: 580-586.

Fraser, C.M., Norris, S.J., Weinstock, G.M., White, O., Sutton, G.G., Dodson, R., Gwinn, M., Hickey, E.K., Clayton, R., Ketchum, K.A., Sodergren, E., Hardham, J.M., McLeod, M.P., Salzberg, S., Peterson, J., Khalak, H., Richardson, D., Howell, J.K., Chidambaram, M., Utterback, T., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Cotton, M.D., Fujii, C., Garland, S., Hatch, B., Horst, K., Roberts, K., Sandusky, M., Weidman, J., Smith, H.O., and Venter, J.C. (1998) Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* **281**: 375-388.

Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W., and Hardt, W.D. (2001) SopE and SopE2 from *Salmonella* Typhimurium activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* **276**: 34035-34040.

Frobel, J., Rose, P., and Muller, M. (2012) Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**: 1029-1046.

Galan, J.E., and Curtiss, R., 3rd (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6383-6387.

Galan, J.E., and Wolf-Watz, H. (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.

Gatsos, X., Perry, A.J., Anwari, K., Dolezal, P., Wolynec, P.P., Likic, V.A., Purcell, A.W., Buchanan, S.K., and Lithgow, T. (2008) Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 995-1009.

Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J., and Madara, J.L. (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* **167**: 1882-1885.

Gopinath, S., Carden, S., Monack, D. (2012) Shedding light on *Salmonella* carriers. *Trends Microbiol* **7:** 320-327.

Groisman, E.A. (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**: 1835-1842.

Gronow, S., and Brade, H. (2001) Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive? *J Endotoxin Res* **7**: 3-23.

Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemuhl, J., Grimont, P.A., and Weill, F.X. (2010) Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* **161**: 26-29.

Guignot, J., Caron, E., Beuzon, C., Bucci, C., Kagan, J., Roy, C., and Holden, D.W. (2004) Microtubule motors control membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *J Cell Sci* **117**: 1033-1045.

Hagan, C.L., Kim, S., and Kahne, D. (2010) Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components. *Science* **328**: 890-892.

Hagan, C.L., Silhavy, T.J., and Kahne, D. (2011) beta-Barrel membrane protein assembly by the Bam complex. *Annu Rev Biochem* **80**: 189-210.

Han, W., Wu, B., Li, L., Zhao, G., Woodward, R., Pettit, N., Cai, L., Thon, V., and Wang, P.G. (2012) Defining function of lipopolysaccharide O-antigen ligase WaaL using chemoenzymatically synthesized substrates. *J Biol Chem* **287**: 5357-5365.

Hayward, R.D., Cain, R.J., McGhie, E.J., Phillips, N., Garner, M.J., and Koronakis, V. (2005) Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol Microbiol* **56**: 590-603.

Hendriksen, R.S., Le Hello, S., Bortolaia, V., Pulsrikarn, C., Nielsen, E.M., Pornruangmong, S., Chaichana, P., Svendsen, C.A., Weill, F.X., and Aarestrup, F.M. (2012) Characterization of isolates of *Salmonella enterica* serovar Stanley, a serovar endemic to Asia and associated with travel. *J Clin Microbiol* **50**: 709-720.

Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., and Holden, D.W. (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**: 400-403.

Heuck, A., Schleiffer, A., and Clausen, T. (2011) Augmenting beta-augmentation: structural basis of how BamB binds BamA and may support folding of outer membrane proteins. *J Mol Biol* **406**: 659-666.

Hoffmann, C., Galle, M., Dilling, S., Kappeli, R., Muller, A.J., Songhet, P., Beyaert, R., and Hardt, W.D. (2010) In macrophages, caspase-1 activation by SopE and the type III secretion system-1 of *S.* Typhimurium can proceed in the absence of flagellin. *PLoS One* **5**: e12477.

Holden, D.W. (2002) Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic* **3**: 161-169.

Hu, Q., Coburn, B., Deng, W., Li, Y., Shi, X., Lan, Q., Wang, B., Coombes, B.K., and Finlay, B.B. (2008) *Salmonella enterica* serovar Senftenberg human clinical isolates lacking SPI-1. *J Clin Microbiol* **46**: 1330-1336.

Huijbregts, R.P., de Kroon, A.I., and de Kruijff, B. (2000) Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1469**: 43-61.

Humphreys, D., Hume, P.J., and Koronakis, V. (2009) The *Salmonella* effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche. *Cell Host Microbe* **5**: 225-233.

Ieva, R., and Bernstein, H.D. (2009) Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19120-19125.

Ieva, R., Tian, P., Peterson, J.H., and Bernstein, H.D. (2011) Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter beta domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: E383-391.

Inoue, K., and Potter, D. (2004) The chloroplastic protein translocation channel Toc75 and its paralog OEP80 represent two distinct protein families and are targeted to the chloroplastic outer envelope by different mechanisms. *Plant J* **39**: 354-365.

Janganan, T.K., Zhang, L., Bavro, V.N., Matak-Vinkovic, D., Barrera, N.P., Burton, M.F., Steel, P.G., Robinson, C.V., Borges-Walmsley, M.I., and Walmsley, A.R. (2011) Opening of the outer membrane protein channel in tripartite efflux pumps is induced by interaction with the membrane fusion partner. *J Biol Chem* **286**: 5484-5493.

Jones, M.A., Hulme, S.D., Barrow, P.A., and Wigley, P. (2007) The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *Avian Pathol* **36**: 199-203.

Justice, S.S., Hunstad, D.A., Harper, J.R., Duguay, A.R., Pinkner, J.S., Bann, J., Frieden, C., Silhavy, T.J., and Hultgren, S.J. (2005) Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 7680-7686.

Karasova, D., Sebkova, A., Havlickova, H., Sisak, F., Volf, J., Faldyna, M., Ondrackova, P., Kummer, V., and Rychlik, I. (2010) Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity

islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *BMC Microbiol* **10**: 75.

Khairnar, N.P., Kamble, V.A., Mangoli, S.H., Apte, S.K., and Misra, H.S. (2007) Involvement of a periplasmic protein kinase in DNA strand break repair and homologous recombination in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **65**: 294-304.

Khandavilli, S., Homer, K.A., Yuste, J., Basavanna, S., Mitchell, T., and Brown, J.S. (2008) Maturation of *Streptococcus pneumoniae* lipoproteins by a type II signal peptidase is required for ABC transporter function and full virulence. *Mol Microbiol* **67**: 541-557.

Kim, K.H., Aulakh, S., Tan, W., and Paetzel, M. (2011a) Crystallographic analysis of the C-terminal domain of the *Escherichia coli* lipoprotein BamC. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **67**: 1350-1358.

Kim, K.H., Kang, H.S., Okon, M., Escobar-Cabrera, E., McIntosh, L.P., and Paetzel, M. (2011b) Structural characterization of *Escherichia coli* BamE, a lipoprotein component of the beta-barrel assembly machinery complex. *Biochemistry* **50**: 1081-1090.

Kim, K.H., and Paetzel, M. (2011) Crystal structure of *Escherichia coli* BamB, a lipoprotein component of the beta-barrel assembly machinery complex. *J Mol Biol* **406**: 667-678.

Kim, K.H., Aulakh, S., and Paetzel, M. (2012) The bacterial outer membrane beta-barrel assembly machinery. *Protein Sci* **21**: 751-768.

Kim, S., Malinverni, J.C., Sliz, P., Silhavy, T.J., Harrison, S.C., and Kahne, D. (2007) Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* **317**: 961-964.

King, G., and Sharom, F.J. (2012) Proteins that bind and move lipids: MsbA and NPC1. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **47**: 75-95.

Kleinschmidt, J.H. (2003) Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1547-1558.

Knowles, T.J., Jeeves, M., Bobat, S., Dancea, F., McClelland, D., Palmer, T., Overduin, M., and Henderson, I.R. (2008) Fold and function of polypeptide transport-associated domains responsible for delivering unfolded proteins to membranes. *Mol Microbiol* **68**: 1216-1227.

Knowles, T.J., Sridhar, P., Rajesh, S., Manoli, E., Overduin, M., and Henderson, I.R. (2010) Secondary structure and 1H, 13C and 15N resonance assignments of BamE, a component of the outer membrane protein assembly machinery in *Escherichia coli*. *Biomol NMR Assign* **4**: 179-181.

Knowles, T.J., Browning, D.F., Jeeves, M., Maderbocus, R., Rajesh, S., Sridhar, P., Manoli, E., Emery, D., Sommer, U., Spencer, A., Leyton, D.L., Squire, D., Chaudhuri, R.R., Viant, M.R., Cunningham, A.F., Henderson, I.R., and Overduin, M. (2011) Structure and function of BamE within the outer membrane and the beta-barrel assembly machine. *EMBO Rep* **12**: 123-128.

Kol, M.A., van Dalen, A., de Kroon, A.I., and de Kruijff, B. (2003) Translocation of phospholipids is facilitated by a subset of membrane-spanning proteins of the bacterial cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* **278**: 24586-24593.

Kovacs-Simon, A., Titball, R.W., and Michell, S.L. (2011) Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect Immun* **79**: 548-561.

Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **278**: 48520-48523.

Krojer, T., Sawa, J., Schafer, E., Saibil, H.R., Ehrmann, M., and Clausen, T. (2008) Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* **453**: 885-890.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laird, M.W., Kloser, A.W., and Misra, R. (1994) Assembly of LamB and OmpF in deep rough lipopolysaccharide mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **176**: 2259-2264.

Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X., and Galan, J.E. (2011) A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science* **331**: 1188-1191.

Lee, A.H., Zareei, M.P., and Daefler, S. (2002) Identification of a NIPSNAP homologue as host cell target for *Salmonella* virulence protein SpiC. *Cell Microbiol* **4**: 739-750.

Lee, R., Aung-Htut, M.T., Kwik, C., and March, P.E. (2011) Expression phenotypes suggest that Der participates in a specific, high affinity interaction with membranes. *Protein Expr Purif* **78**: 102-112.

Lehr, U., Schutz, M., Oberhettinger, P., Ruiz-Perez, F., Donald, J.W., Palmer, T., Linke, D., Henderson, I.R., and Autenrieth, I.B. (2010) C-terminal amino acid residues of the trimeric autotransporter adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica* are decisive for its recognition and assembly by BamA. *Mol Microbiol* **78**: 932-946.

Lewis, C., Skovierova, H., Rowley, G., Rezuchova, B., Homerova, D., Stevenson, A., Sherry, A., Kormanec, J., and Roberts, M. (2008) Small outer-membrane lipoprotein, SmpA, is regulated by sigmaE and has a role in cell envelope integrity and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **154**: 979-988.

Li, L., Cheng, C.K., Cheung, M.K., Law, P.T., Ling, J.M., Kam, K.M., Cheung, W.M., and Kwan, H.S. (2012) Draft genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ST1660/06, a multidrug-resistant clinical strain isolated from a diarrheic patient. *J Bacteriol* **194**: 6319-6320.

Linehan, S.A., Rytkonen, A., Yu, X.J., Liu, M., and Holden, D.W. (2005) SlyA regulates function of *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. *Infect Immun* **73**: 4354-4362.

Lober, S., Jackel, D., Kaiser, N., and Hensel, M. (2006) Regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by independent environmental signals. *Int J Med Microbiol* **296**: 435-447.

Lucas, R.L., and Lee, C.A. (2001) Roles of HilC and HilD in regulation of *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **183**: 2733-2745.

Luirink, J., and Sinning, I. (2004) SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 17-35.

Macnab, R.M. (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 207-217.

Maddalo, G., Stenberg-Bruzell, F., Gotzke, H., Toddo, S., Bjorkholm, P., Eriksson, H., Chovanec, P., Genevaux, P., Lehtio, J., Ilag, L.L., and Daley, D.O. (2011) Systematic analysis of native membrane protein complexes in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* **10**: 1848-1859.

Malik-Kale, P., Winfree, S., and Steele-Mortimer, O. (2012) The bimodal lifestyle of intracellular *Salmonella* in epithelial cells: replication in the cytosol obscures defects in vacuolar replication. *PLoS One* **7**: e38732.

Malinverni, J.C., Werner, J., Kim, S., Sklar, J.G., Kahne, D., Misra, R., and Silhavy, T.J. (2006) YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **61**: 151-164.

Malinverni, J.C., and Silhavy, T.J. (2009) An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the gram-negative outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 8009-8014.

Marlovits, T.C., and Stebbins, C.E. (2010) Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr Opin Microbiol* **13**: 47-52.

Matern, Y., Barion, B., and Behrens-Kneip, S. (2010) PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* **10**: 251.

Mattei, P.J., Faudry, E., Job, V., Izore, T., Attree, I., and Dessen, A. (2011) Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J* **278**: 414-426.

McCormick, B.A. (2007) Bacterial-induced hepoxilin A3 secretion as a pro-inflammatory mediator. *FEBS J* **274**: 3513-3518.

Miao, E.A., Brittnacher, M., Haraga, A., Jeng, R.L., Welch, M.D., and Miller, S.I. (2003) *Salmonella* effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* **48**: 401-415.

Minamino, T., Moriya, N., Hirano, T., Hughes, K.T., and Namba, K. (2009) Interaction of FliK with the bacterial flagellar hook is required for efficient export specificity switching. *Mol Microbiol* **74**: 239-251.

Minamino, T., Imada, K., Kinoshita, M., Nakamura, S., Morimoto, Y.V., and Namba, K. (2011) Structural insight into the rotational switching mechanism of the bacterial flagellar motor. *PLoS Biol* **9**: e1000616.

Miyadai, H., Tanaka-Masuda, K., Matsuyama, S., and Tokuda, H. (2004) Effects of lipoprotein overproduction on the induction of DegP (HtrA) involved in quality control in the *Escherichia coli* periplasm. *J Biol Chem* **279**: 39807-39813.

Mota, L.J., Ramsden, A.E., Liu, M., Castle, J.D., and Holden, D.W. (2009) SCAMP3 is a component of the *Salmonella*-induced tubular network and reveals an interaction between bacterial effectors and post-Golgi trafficking. *Cell Microbiol* **11**: 1236-1253.

Muller, C., Bang, I.S., Velayudhan, J., Karlinsey, J., Papenfort, K., Vogel, J., and Fang, F.C. (2009) Acid stress activation of the sigma(E) stress response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **71**: 1228-1238.

Murray, R.A., and Lee, C.A. (2000) Invasion genes are not required for Salmonella enterica serovar typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that salmonella pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. *Infect Immun* **68**: 5050-5055.

Narita, S., and Tokuda, H. (2007) Amino acids at positions 3 and 4 determine the membrane specificity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. *J Biol Chem* **282**: 13372-13378.

Narita, S., and Tokuda, H. (2009) Biochemical characterization of an ABC transporter LptBFGC complex required for the outer membrane sorting of lipopolysaccharides. *FEBS Lett* **583**: 2160-2164.

Narita, S. (2011) ABC transporters involved in the biogenesis of the outer membrane in gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 1044-1054.

Natale, P., Bruser, T., and Driessen, A.J. (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1735-1756.

Navarre, W.W., Halsey, T.A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J.L., Kenney, L.J., Gunn, J.S., Fang, F.C., and Libby, S.J. (2005) Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol Microbiol* **56**: 492-508.

Neelakanta, G., Li, X., Pal, U., Liu, X., Beck, D.S., DePonte, K., Fish, D., Kantor, F.S., and Fikrig, E. (2007) Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within Ixodes ticks. *PLoS Pathog* **3**: e33.

Nesper, J., Hill, C.M., Paiment, A., Harauz, G., Beis, K., Naismith, J.H., and Whitfield, C. (2003) Translocation of group 1 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* serotype

K30. Structural and functional analysis of the outer membrane lipoprotein Wza. *J Biol Chem* **278**: 49763-49772.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.

Nichols, C.D., and Casanova, J.E. (2010) *Salmonella*-directed recruitment of new membrane to invasion foci via the host exocyst complex. *Curr Biol* **20**: 1316-1320.

Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 593-656.

Noinaj, N., Fairman, J.W., and Buchanan, S.K. (2011) The crystal structure of BamB suggests interactions with BamA and its role within the BAM complex. *J Mol Biol* **407**: 248-260.

Onufryk, C., Crouch, M.L., Fang, F.C., and Gross, C.A. (2005) Characterization of six lipoproteins in the sigmaE regulon. *J Bacteriol* **187**: 4552-4561.

Osborne, S.E., and Coombes, B.K. (2011) Transcriptional priming of *Salmonella* Pathogenicity Island-2 precedes cellular invasion. *PLoS One* **6**: e21648.

Papenfort, K., Pfeiffer, V., Mika, F., Lucchini, S., Hinton, J.C., and Vogel, J. (2006) SigmaE-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Mol Microbiol* **62**: 1674-1688.

Papp-Wallace, K.M., and Maguire, M.E. (2006) Manganese transport and the role of manganese in virulence. *Annu Rev Microbiol* **60**: 187-209.

Pardon, P., Popoff, M.Y., Coynault, C., Marly, J., and Miras, I. (1986) Virulence-associated plasmids of *Salmonella* serotype Typhimurium in experimental murine infection. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **137B**: 47-60.

Patel, J.C., and Galan, J.E. (2006) Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* **175**: 453-463.

Phillips, G.J., and Silhavy, T.J. (1992) The *E. coli ffh* gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature* **359**: 744-746.

Poh, J., Odendall, C., Spanos, A., Boyle, C., Liu, M., Freemont, P., and Holden, D.W. (2008) SteC is a *Salmonella* kinase required for SPI-2-dependent F-actin remodelling. *Cell Microbiol* **10**: 20-30.

Popoff, M.Y., Bockemuhl, J., and Gheesling, L.L. (2004) Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* **155**: 568-570.

Prouty, A.M., Brodsky, I.E., Falkow, S., and Gunn, J.S. (2004) Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology* **150**: 775-783.

Purdy, G.E., Fisher, C.R., and Payne, S.M. (2007) IcsA surface presentation in *Shigella flexneri* requires the periplasmic chaperones DegP, Skp, and SurA. *J Bacteriol* **189**: 5566-5573.

Qu, J., Behrens-Kneip, S., Holst, O., and Kleinschmidt, J.H. (2009) Binding regions of outer membrane protein A in complexes with the periplasmic chaperone Skp. A site-directed fluorescence study. *Biochemistry* **48**: 4926-4936.

Queiroz, M.H., Madrid, C., Paytubi, S., Balsalobre, C., and Juarez, A. (2011) Integration host factor alleviates H-NS silencing of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium master regulator of SPI1, HilA. *Microbiology* **157**: 2504-2514.

Rabasseda, X. (2010) A report from the 20th European congress of clinical microbiology and infectious diseases (April 10-13, 2010 - Vienna, Austria). *Drugs Today (Barc)* **46**: 533-542.

Raetz, C.R., and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**: 635-700.

Ramos-Morales, F., Prieto, A.I., Beuzon, C.R., Holden, D.W., and Casadesus, J. (2003) Role for *Salmonella enterica* enterobacterial common antigen in bile resistance and virulence. *J Bacteriol* **185**: 5328-5332.

Ramos-Morales, F. (2012) Acidic pH: enemy or ally for enteric bacteria? *Virulence* **3**: 103-106.

Rathinavelan, T., Tang, C., and De Guzman, R.N. (2011) Characterization of the interaction between the *Salmonella* type III secretion system tip protein SipD and the needle protein PrgI by paramagnetic relaxation enhancement. *J Biol Chem* **286**: 4922-4930.

Rathman, M., Sjaastad, M.D., and Falkow, S. (1996) Acidification of phagosomes containing *Salmonella* Typhimurium in murine macrophages. *Infect Immun* **64**: 2765-2773.

Reeves, M.W., Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D., and Farmer, J.J., 3rd (1989) Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol* **27**: 313-320.

Reumann, S., Davila-Aponte, J., and Keegstra, K. (1999) The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: identification of a cyanobacterial homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 784-789.

Rhodius, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., and Gross, C.A. (2006) Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol* **4**: e2.

Ricci, D.P., Hagan, C.L., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2012) Activation of the *Escherichia coli* beta-barrel assembly machine (Bam) is required for essential components to interact properly with substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 3487-3491.

Ricci, D.P., and Silhavy, T.J. (2012) The Bam machine: A molecular cooper. *Biochim Biophys Acta* **1818**: 1067-1084.

Robert, V., Volokhina, E.B., Senf, F., Bos, M.P., Van Gelder, P., and Tommassen, J. (2006) Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol* **4**: e377.

Rolhion, N., Barnich, N., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2005) Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the *yfgL* gene deleted. *J Bacteriol* **187**: 2286-2296.

Rouviere, P.E., and Gross, C.A. (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* **10**: 3170-3182.

Ruiz-Perez, F., Henderson, I.R., Leyton, D.L., Rossiter, A.E., Zhang, Y., and Nataro, J.P. (2009) Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *J Bacteriol* **191**: 6571-6583.

Ruiz, N., Falcone, B., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2005) Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. *Cell* **121**: 307-317.

Ruiz, N., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2006) Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **4**: 57-66.

Rychlik, I., Karasova, D., Sebkova, A., Volf, J., Sisak, F., Havlickova, H., Kummer, V., Imre, A., Szmolka, A., and Nagy, B. (2009) Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. *BMC Microbiol* **9**: 268.

Saini, S., Floess, E., Aldridge, C., Brown, J., Aldridge, P.D., and Rao, C.V. (2011) Continuous control of flagellar gene expression by the sigma28-FlgM regulatory circuit in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **79**: 264-278.

Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Genevrois, S., Vicente, M., and Valencia, A. (2003) POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem Sci* **28**: 523-526.

Sandoval, C.M., Baker, S.L., Jansen, K., Metzner, S.I., and Sousa, M.C. (2011) Crystal structure of BamD: an essential component of the beta-Barrel assembly machinery of gram-negative bacteria. *J Mol Biol* **409**: 348-357.

Santos, R.L., Schoffelmeer, J.A., Tsolis, R.M., Gutierrez-Pabello, J.A., Baumler, A.J., and Adams, L.G. (2002) *Salmonella* serotype Typhimurium infection of bovine Peyer's patches down-regulates plasma membrane calcium-transporting ATPase expression. *J Infect Dis* **186**: 372-378.

Saul, F.A., Arie, J.P., Vulliez-le Normand, B., Kahn, R., Betton, J.M., and Bentley, G.A. (2004) Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J Mol Biol* **335**: 595-608.

Sauri, A., Soprova, Z., Wickstrom, D., de Gier, J.W., Van der Schors, R.C., Smit, A.B., Jong, W.S., and Luirink, J. (2009) The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology* **155**: 3982-3991.

Schikora, A., Virlogeux-Payant, I., Bueso, E., Garcia, A.V., Nilau, T., Charrier, A., Pelletier, S., Menanteau, P., Baccarini, M., Velge, P., and Hirt, H. (2011) Conservation of *Salmonella* infection mechanisms in plants and animals. *PLoS One* **6**: e24112.

Schleiff, E., Maier, U.G., and Becker, T. (2011) Omp85 in eukaryotic systems: one protein family with distinct functions. *Biol Chem* **392**: 21-27.

Schraidt, O., and Marlovits, T.C. (2011) Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science* **331**: 1192-1195.

Schroeder, N., Henry, T., de Chastellier, C., Zhao, W., Guilhon, A.A., Gorvel, J.P., and Meresse, S. (2010) The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *PLoS Pathog* **6**: e1001002.

Shotland, Y., Kramer, H., and Groisman, E.A. (2003) The *Salmonella* SpiC protein targets the mammalian Hook3 protein function to alter cellular trafficking. *Mol Microbiol* **49**: 1565-1576.

Silhavy, T.J., Kahne, D., and Walker, S. (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000414.

Silva-Herzog, E., Ferracci, F., Jackson, M.W., Joseph, S.S., and Plano, G.V. (2008) Membrane localization and topology of the *Yersinia pestis* YscJ lipoprotein. *Microbiology* **154**: 593-607.

Sklar, J.G., Wu, T., Gronenberg, L.S., Malinverni, J.C., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2007a) Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 6400-6405.

Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2007b) Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **21**: 2473-2484.

Sperandeo, P., Villa, R., Martorana, A.M., Samalikova, M., Grandori, R., Deho, G., and Polissi, A. (2011) New insights into the Lpt machinery for lipopolysaccharide transport to the cell surface: LptA-LptC interaction and LptA stability as sensors of a properly assembled transenvelope complex. *J Bacteriol* **193**: 1042-1053.

Stamm, L.M., and Goldberg, M.B. (2011) Microbiology. Establishing the secretion hierarchy. *Science* **331**: 1147-1148.

Steeghs, L., den Hartog, R., den Boer, A., Zomer, B., Roholl, P., and van der Ley, P. (1998) Meningitis bacterium is viable without endotoxin. *Nature* **392**: 449-450.

Steeghs, L., de Cock, H., Evers, E., Zomer, B., Tommassen, J., and van der Ley, P. (2001) Outer membrane composition of a lipopolysaccharide-deficient *Neisseria meningitidis* mutant. *EMBO J* **20**: 6937-6945.

Stegmeier, J.F., and Andersen, C. (2006) Characterization of pores formed by YaeT (Omp85) from *Escherichia coli*. *J Biochem* **140**: 275-283.

Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, S.L., Robinson, C.V., Ilag, L.L., von Heijne, G., and Daley, D.O. (2005) Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. *J Biol Chem* **280**: 34409-34419.

Szeto, J., Namolovan, A., Osborne, S.E., Coombes, B.K., and Brumell, J.H. (2009) *Salmonella*-containing vacuoles display centrifugal movement associated with cell-to-cell transfer in epithelial cells. *Infect Immun* **77**: 996-1007.

Tamm, L.K., Hong, H., and Liang, B. (2004) Folding and assembly of beta-barrel membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1666**: 250-263.

Tefsen, B., Geurtsen, J., Beckers, F., Tommassen, J., and de Cock, H. (2005) Lipopolysaccharide transport to the bacterial outer membrane in spheroplasts. *J Biol Chem* **280**: 4504-4509.

Thomas, K.L., Leduc, I., Olsen, B., Thomas, C.E., Cameron, D.W., and Elkins, C. (2001) Cloning, overexpression, purification, and immunobiology of an 85-kilodalton outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun* **69**: 4438-4446.

Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M., and Euzeby, J.P. (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 521-524.

Tischler, A.D., and McKinney, J.D. (2010) Contrasting persistence strategies in *Salmonella* and *Mycobacterium*. *Curr Opin Microbiol* **13**: 93-99.

Tsukahara, J., Mukaiyama, K., Okuda, S., Narita, S., and Tokuda, H. (2009) Dissection of LolB function--lipoprotein binding, membrane targeting and incorporation of lipoproteins into lipid bilayers. *FEBS J* **276**: 4496-4504.

Ulbrandt, N.D., Newitt, J.A., and Bernstein, H.D. (1997) The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell* **88**: 187-196.

Ureta, A.R., Endres, R.G., Wingreen, N.S., and Silhavy, T.J. (2007) Kinetic analysis of the assembly of the outer membrane protein LamB in *Escherichia coli* mutants each lacking a secretion or targeting factor in a different cellular compartment. *J Bacteriol* **189**: 446-454.

van der Straaten, T., van Diepen, A., Kwappenberg, K., van Voorden, S., Franken, K., Janssen, R., Kusters, J.G., Granger, D.L., and van Dissel, J.T. (2001) Novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protein that is indispensable for virulence and intracellular replication. *Infect Immun* **69**: 7413-7418.

van Diepen, A., van der Straaten, T., Holland, S.M., Janssen, R., and van Dissel, J.T. (2002) A superoxide-hypersusceptible *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutant is attenuated but regains virulence in p47(*phox-/-*) mice. *Infect Immun* **70**: 2614-2621.

Verma, A., Brissette, C.A., Bowman, A., and Stevenson, B. (2009) *Borrelia burgdorferi* BmpA is a laminin-binding protein. *Infect Immun* **77**: 4940-4946.

Vertommen, D., Ruiz, N., Leverrier, P., Silhavy, T.J., and Collet, J.F. (2009) Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics* **9**: 2432-2443.

Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**: 262-265.

Vuong, P., Bennion, D., Mantei, J., Frost, D., and Misra, R. (2008) Analysis of YfgL and YaeT interactions through bioinformatics, mutagenesis, and biochemistry. *J Bacteriol* **190**: 1507-1517.

Wallis, T.S., and Galyov, E.E. (2000) Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol* **36**: 997-1005.

Walthers, D., Carroll, R.K., Navarre, W.W., Libby, S.J., Fang, F.C., and Kenney, L.J. (2007) The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* **65**: 477-493.

Warner, L.R., Varga, K., Lange, O.F., Baker, S.L., Baker, D., Sousa, M.C., and Pardi, A. (2011) Structure of the BamC two-domain protein obtained by Rosetta with a limited NMR data set. *J Mol Biol* **411**: 83-95.

Watts, K.M., and Hunstad, D.A. (2008) Components of SurA required for outer membrane biogenesis in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One* **3**: e3359.

Whitfield, C., and Naismith, J.H. (2008) Periplasmic export machines for outer membrane assembly. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 466-474.

Wisner, A.L., Desin, T.S., Koch, B., Lam, P.K., Berberov, E.M., Mickael, C.S., Potter, A.A., and Koster, W. (2010) *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system: role in intestinal colonization of chickens and systemic spread. *Microbiology* **156**: 2770-2781.

Worley, M.J., Ching, K.H., and Heffron, F. (2000) *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol Microbiol* **36**: 749-761.

Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T.J., and Kahne, D. (2005) Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121**: 235-245.

Wu, T., McCandlish, A.C., Gronenberg, L.S., Chng, S.S., Silhavy, T.J., and Kahne, D. (2006) Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11754-11759.

Yakushi, T., Tajima, T., Matsuyama, S., and Tokuda, H. (1997) Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 2857-2862.

Yamaguchi, K., Yu, F., and Inouye, M. (1988) A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* **53**: 423-432.

Yu, X.J., McGourty, K., Liu, M., Unsworth, K.E., and Holden, D.W. (2010) pH sensing by intracellular *Salmonella* induces effector translocation. *Science* **328**: 1040-1043.

Yuan, J., Zweers, J.C., van Dijl, J.M., and Dalbey, R.E. (2010) Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cell Mol Life Sci* **67**: 179-199.

Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B.B., and Strynadka, N.C. (2007) Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 131-137.

Publications et communications scientifiques

Deciphering the Roles of BamB and Its Interaction with BamA in Outer Membrane Biogenesis, T3SS Expression and Virulence in *Salmonella*.
Fatemeh Namdari, Genaro Hurtado-Escobar, Nadia Abed, Jerome Trotereau, Yann Fardini, Etienne Giraud, Philippe Velge, Isabelle Virlogeux-Payant, *PloSOne*, 2012; 7(11):e46050.

Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis.
Philippe Velge, Agnes Wiedemann, Manon Rosselin, Nadia Abed, Zineb Boumart, Anne-Marie Chausse, Olivier Grepinet, Fatemeh Namdari, Sylvie Roche, Aurore Rossignol, Isabelle Virlogeux-Payant, *Microbiologyopen*, 2012; 1(3):243-58.

The different strategies used by *Salmonella* to invade host cells.
Rosselin Manon, Abed Nadia, Namdari Fatemeh, Virlogeux-Payant Isabelle, Velge Philippe, Wiedemann Agnes, *InTech,* 2011; DOI: 10.5772/29979

Communications orales:

→***PhD students day***
INRA de Tours, unité ISP, octobre 2010.
« Role of BamB in T3SS expression and outer-membrane biogenesis in Salmonella: which relationship with its cellular localization and its interaction with BamA? »

→***International Symposium Salmonella and Salmonellosis (I3S)***
Saint-Malo, juin 2010.
« Role of BamB in T3SS expression and outer-membrane biogenesis in Salmonella: which relationship with its cellular localization and its interaction with BamA? »

→***22ème colloque Biotechnocentre***
Domaine de Seillac, octobre 2009.
« BamB : une lipoprotéine de la membrane externe de Salmonella possédant également une fonction dans le cytoplasme ? »

Présentations de posters:

→***Gordon Research Conferences***
Newport, USA, juillet 2011.
« Dissociation of the roles of Salmonella BamB protein in outer membrane permeability and T3SS expression »

→***Journées des microbiologistes de l'INRA (JMI)***
Poitiers, mai 2010.
« Role of BamB in T3SS expression and outer-membrane biogenesis in Salmonella »

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Deciphering the Roles of BamB and Its Interaction with BamA in Outer Membrane Biogenesis, T3SS Expression and Virulence in *Salmonella*

Fatémeh Namdari[1,2], Genaro Alejandro Hurtado-Escobar[1,2], Nadia Abed[1,2], Jérôme Trotereau[1,2], Yann Fardini[1,2], Etienne Giraud[1,2], Philippe Velge[1,2], Isabelle Virlogeux-Payant[1,2]*

1 INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France, **2** Université François Rabelais de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Tours, France

Abstract

The folding and insertion of β-barrel proteins in the outer membrane of Gram-negative bacteria is mediated by the BAM complex, which is composed of the outer membrane protein BamA and four lipoproteins BamB to BamE. In *Escherichia coli* and/or *Salmonella,* the BamB lipoprotein is involved in (i) β-barrel protein assembly in the outer membrane, (ii) outer membrane permeability to antibiotics, (iii) the control of the expression of T3SS which are major virulence factors and (iv) the virulence of *Salmonella*. In *E. coli,* this protein has been shown to interact directly with BamA. In this study, we investigated the structure-function relationship of BamB in order to assess whether the roles of BamB in these phenotypes were inter-related and whether they require the interaction of BamB with BamA. For this purpose, recombinant plasmids harbouring point mutations in *bamB* were introduced in a Δ*Salmonella bamB* mutant. We demonstrated that the residues L173, L175 and R176 are crucial for all the roles of BamB and for the interaction of BamB with BamA. Moreover, the results obtained with a D229A BamB variant, which is unable to immunoprecipitate BamA, suggest that the interaction of BamB with BamA is not absolutely necessary for BamB function in outer-membrane protein assembly, T3SS expression and virulence. Finally, we showed that the virulence defect of the Δ*bamB* mutant is not related to its increased susceptibility to antimicrobials, as the D227A BamB variant fully restored the virulence of the mutant while having a similar antibiotic susceptibility to the Δ*bamB* strain. Overall, this study demonstrates that the different roles of BamB are not all inter-related and that L173, L175 and R176 amino-acids are privileged sites for the design of BamB inhibitors that could be used as alternative therapeutics to antibiotics, at least against *Salmonella*.

Citation: Namdari F, Hurtado-Escobar GA, Abed N, Trotereau J, Fardini Y, et al. (2012) Deciphering the Roles of BamB and Its Interaction with BamA in Outer Membrane Biogenesis, T3SS Expression and Virulence in *Salmonella*. PLoS ONE 7(11): e46050. doi:10.1371/journal.pone.0046050

Editor: Rajeev Misra, Arizona State University, United States of America

Received June 6, 2012; **Accepted** August 27, 2012; **Published** November 5, 2012

Copyright: © 2012 Namdari et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: *ipayant@tours.inra.fr

Introduction

The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria are synthesized in the cytoplasm and have to cross the inner membrane before being assembled into a correctly folded state in the outer membrane. The β-barrel assembly machinery (BAM) is an outer membrane complex responsible for recognition, folding and insertion of outer-membrane β-barrel proteins in the outer membrane (For a review, see [1]. In *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia coli* and *Salmonella*, the BAM complex is composed of the essential outer membrane protein, BamA (formerly YaeT), and four lipoproteins, BamB to BamE (formerly YfgL, NlpB, YfiO and SmpA respectively) [2,3], but this composition can differ in other bacteria [4,5]. BamA is conserved among bacteria, and homologues of the BAM complex are found in chloroplasts and mitochondria where they also assemble β-barrel proteins [6,7,8]. This essential protein interacts with the other Bam proteins via five POTRA (polypeptide transport-associated) domains present in its N-terminal periplasmic part. BamC, BamD and BamE proteins form a subcomplex that interacts with BamA *via* POTRA 5 while BamB/BamA interaction involves POTRA 2, 3, 4 and 5 domains [9]. The BAM complex has been shown to be involved in the assembly of integral outer membrane proteins (OMP) such as OmpA, LamB and the fimbrial usher protein FimD [10,11]. This complex is also required for autotransporter biogenesis in several organisms [12–15]. Moreover, mutants unable to synthesize one or several Bam proteins have been shown to be more susceptible to different antibiotics including vancomycin, thus suggesting increased outer membrane permeability due to a defect in outer membrane integrity [11,16].

In the BAM complex, BamB is not essential for bacterial viability but is required to maintain a wild-type level of OMP and correct outer-membrane permeability of the bacterium to antibiotics [11,17,18]. It is also involved in the assembly and secretion of some autotransporters, such as the extracellular serine protease P (EspP) autotransporter of *E. coli* O157 H7 [15,19]. Moreover, previous studies in our laboratory have shown that the *bamB* gene plays an important role in the virulence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis (*S.* Enteritidis) in mice and in one-day-old chicks [18,20]. The virulence defect of a *bamB* mutant may, at least in part, be related to the down-regulated transcription of most flagellar, T3SS-1- and T3SS-2- related genes, which encode major virulence factors [18]. A role of BamB in the invasion capability of an adherent invasive *E. coli* strain has

also been described [21]. Recent studies have provided new data on the BamB protein and its putative role in the BAM complex. By reconstructing the BAM complex in proteoliposomes, Hagan *et al.* [22,23] confirmed that this protein, although not essential in *E. coli*, is important for the assembly of OMPs, and they demonstrated that its absence greatly impaired the activity of the two essential proteins of the complex, BamA and BamD. Moreover, Ieva *et al.* [19] showed that BamB (and BamD) remained bound to the C-terminal β-domain of the EspP autotransporter longer than BamA, suggesting that this lipoprotein plays a direct role in the assembly of β-barrel proteins at a later stage than BamA. Structural studies show that BamB is an eight-bladed β-propeller protein that contains WD40 repeat-like domains which are usually found in scaffolding proteins [24,25,26]. Some specific residues of BamB (L173, L175, R176, D227 and D229), which are important for its interaction with BamA and for outer-membrane permeability, have already been identified in *E. coli* [16]. These residues are conserved in *Salmonella*. Although they are distant in the amino-acid sequence, these residues form a continuous solvent-exposed surface on the β-propeller [25].

These data show that BamB is involved in different bacterial functions: β-barrel protein assembly, outer membrane permeability to antibiotics, T3SS expression and virulence. However, despite an increasing number of papers on this protein, it is currently not known whether the functions of BamB are inter-related or whether all of them require the interaction of BamB with the BAM complex. In order to answer these questions, we characterized, in *Salmonella*, BamB point mutants previously shown to alter or not the outer membrane permeability and the interaction of BamB with BamA in *E. coli* [16]. We chose to work on the BamB point mutants showing the least (L173S and R176A BamB variants) and the most altered (L173S,L175S,R176A triple-mutated BamB) phenotypes tested in *E. coli*. We also tested D227A and D229A BamB variants that were only impaired in their interaction with BamA in *E. coli*. The impact of these mutations on all the phenotypes previously described for the BamB protein, i.e. its interaction with BamA and its role in OMP biogenesis, outer membrane permeability, T3SS expression/functionality and virulence was investigated. Our results demonstrate that the different roles of BamB are not all inter-related and suggest that the interaction of BamB with BamA is not absolutely necessary in *Salmonella* for correct OMP biogenesis, optimal T3SS expression and virulence in mice.

Results

Influence in *Salmonella* of amino-acid substitutions in BamB protein on its interaction with BamA

Previous mutational and biochemical studies have shown that D227A or D229A single substitutions of the residue or the simultaneous L173S, L175S, R176A substitutions of the residues in BamB, produce a defective interaction with BamA in *E. coli*. By contrast, single L173S or R176A substitution only weakens the interaction between BamA and BamB in this bacterium [16]. In order to determine whether these residues are involved in the interaction of BamB with BamA in *S.* Enteritidis, recombinant plasmids encoding wild-type BamB-His_6 or BamB-His_6 variants were introduced in the *S.* Enteritidis LA5Δ*bamB* mutant and co-immunoprecipitation experiments were performed using a BamB antiserum. Under our conditions, we were not able to detect a protein with the molecular mass reported for the BamA protein (≈90 kDa) after SDS-PAGE of the samples and silver-staining of the gel (data not shown). Thus, we performed western-blot analyses on the same samples (Figure 1). The signal obtained for heavy IgG immuno-globulin chains testified an equivalent antibody precipitation and loading for each sample in our experiments. As expected, in the presence of anti-BamB antibodies, the BamB protein was detected in all the samples except for the LA5Δ*bamB* mutant. Moreover, BamA was found to co-immunoprecipitate in the strain expressing the wild-type BamB protein, but not in the Δ*bamB* mutant. When co-immunoprecipitation experiments were performed with the BamB variants harboring the single substitution L173S, R176A or D227A, BamA was detected at a level similar to that observed for the strain expressing the wild-type BamB protein. By contrast, BamA was not detected in the samples corresponding to the strain expressing the D229A or the triple mutated BamB proteins (Figure 1).

Therefore, no involvement of the L173, R176 or D227 residue alone was observed. Only the D229A substitution or the simultaneous L173S, L175S and R176A substitutions in BamB dramatically impaired the BamB/BamA interaction in *Salmonella*.

Influence of *bamB* point mutations on the susceptibility of *Salmonella* to various antibiotics

BamB has previously been shown to be involved in outer-membrane biogenesis of *E. coli* and *S.* Enteritidis. It has been shown that a Δ*bamB* mutant presents a decrease in β-barrel protein assembly in the outer membrane and increased susceptibility to several antibiotics: vancomycin, rifampin, erythromycin, novobiocin and bacitracin, which belong to various antibiotic families and have different solubilities and molecular sizes [11,18,27]. However, *in vivo* experiments in mice and chickens suggest that the susceptibility to antimicrobials of a *Salmonella* Δ*bamB* mutant is not as affected as would be expected. Indeed, after oral inoculation, this mutant was able to persist as well as the wild-type strain in the animal intestine where the bacteria

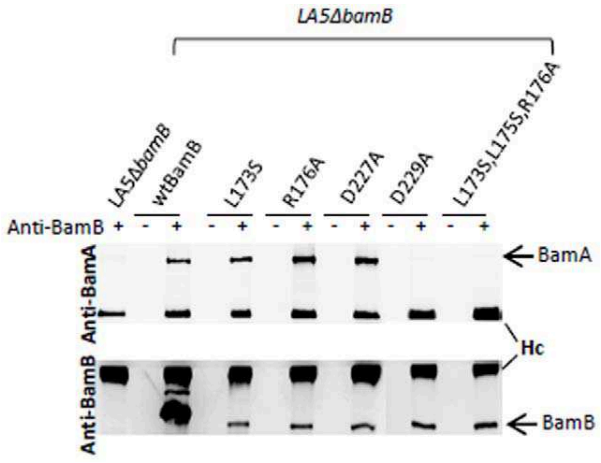


Figure 1. Effect of amino-acid substitutions in BamB proteins on the interaction of BamB with BamA. Co-immunoprecipitation of BamA with histidine-tagged BamB proteins was performed. Whole-cell lysates of the *S.* Enteritidis LA5Δ*bamB* mutant or the LA5Δ*bamB* mutant expressing wild-type BamB protein, BamB with the single L173S, R176A, D227A, D229A substitution or the triple-mutated L173S,L175S,R176A BamB protein were immunoprecipitated with (+) or without (−) polyclonal anti-BamB antibodies. Immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane and the presence of BamB or BamA in the samples was visualized by western-blots using polyclonal anti-BamB or anti-BamA antibodies. Hc: immunoglobulin G heavy chain. These results are representative of three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0046050.g001

encounter many molecules with antimicrobial properties (unpublished results). Thus, we first investigated the susceptibility of the *S.* Enteritidis LA5Δ*bamB* to a larger panel of antibiotics belonging to the main antibiotic families, using a disk diffusion assay. We found that the deletion of *bamB* clearly had no impact on the resistance level of *Salmonella* to most of the antibiotics tested (Table S1). The Δ*bamB* mutant of *Salmonella* was more susceptible than the wild-type strain to only vancomycin, rifampin, erythromycin and bacitracin as previously described, and to a lesser extent to two fluoroquinolones: flumequin and enrofloxacin. Interestingly, the susceptibility of the mutant was not related to the molecular size, the solubility or the family of the molecules tested. In a second step, we investigated the roles of the BamB L173, L175, R176, D227, D229 residues in the susceptibility of the LA5Δ*bamB* mutant, expressing a wild-type or a mutated BamB protein in trans, to these six antibiotics (Table 1). Amoxicillin was also added to demonstrate the presence of the recombinant plasmids in the different strains. L173S and R176A BamB variants were able to restore the susceptibility of the LA5Δ*bamB* mutant to the same level as that of the wild-type BamB protein, whereas the strains expressing the D227A or the triple L173S,L175S,R176A BamB variant were not. Lastly, the D229A BamB variant was shown to confer an intermediate phenotype to the Δ*bamB* mutant. Indeed, while this variant restored the level of susceptibility to vancomycin, erythromycin and bacitracin to that of the wild-type BamB, it did not fully restore the level of susceptibility to rifampin, flumequin or enrofloxacin. Such selective sensitivity to rifampin has previously been described in *E. coli* for a *bamC* mutant [28].

In conclusion, these results suggest that the L173 or R176 residue of BamB alone does not play a major role in the intrinsic level of antibiotic susceptibility. By contrast, the D229 residue is important in this susceptibility, but to a lesser extent than the D227 residue, while the triple L173,L175,R176 residues of BamB are essential.

Influence of *bamB* point mutations on OMP biogenesis in *Salmonella*

In order to observe the influence of the different amino-acid substitutions in BamB on β-barrel protein assembly, the membrane protein profile of our strains was analyzed by SDS-PAGE and western-blot using an anti-OmpA serum. As expected, the LA5Δ*bamB* mutant showed a lower amount of β-barrel proteins such as OmpA, OmpC/F and OmpD than its parental strain (Figure 2A and 2B). Similar results were obtained for the strain producing the L173S,L175S,R176A BamB variant for which a decrease in all these major porins and in the OmpA level was noticed (Figure 2). Surprisingly, we observed that the Δ*bamB* strains producing the BamB variants with single residue substitution had wild-type level of OMP in their respective outer-membranes. This included the D227A variant which was not able to restore the antibiotic susceptibility of the Δ*bamB* mutant and the D229A variant whose interaction with BamA was greatly impaired. Indeed, compared to the wild-type strain, these strains showed the same amount of OmpC/F, OmpD and OmpA on the Coomassie Brilliant blue stained gel and the same amount of OmpA on the anti-OmpA western-blot (Figure 2). These data clearly show that the alteration of the OMP assembly in a Δ*bamB*

Table 1. Impact of *bamB* point mutations on antibiotic susceptibility of *S.* Enteritidis.

	AMX	VAN	ERY	RIF	BAC	UB	ENR
LA5	33	6	9	17	6	14	22
LA5Δ*bamB*	34	12	15	28	14	22	29
wtBamB	6	6	9	17	6	16	25
L173S	6	6	6	17	6	17	25
R176A	6	6	6	18	6	17	25
D227A	6	12	15	26	13	20	27
D229A	6	6	6	21	6	19	25
L173S,L175S,R176A	6	14	15	32	16	25	30

Susceptibility to amoxicillin (AMX), vancomycin (VAN), erythromycin (ERY), rifampin (RIF), bacitracin (BAC), flumequine (UB) and enrofloxacin (ENR) was determined using a disk diffusion assay on *S. enterica* serovar Enteritidis LA5Δ*bamB* mutant strain, and the LA5Δ*bamB* mutant complemented with the wild-type BamB protein (wtBamB) or BamB variants. Inhibition zones are given in mm (disk diameter = 6 mm).
doi:10.1371/journal.pone.0046050.t001

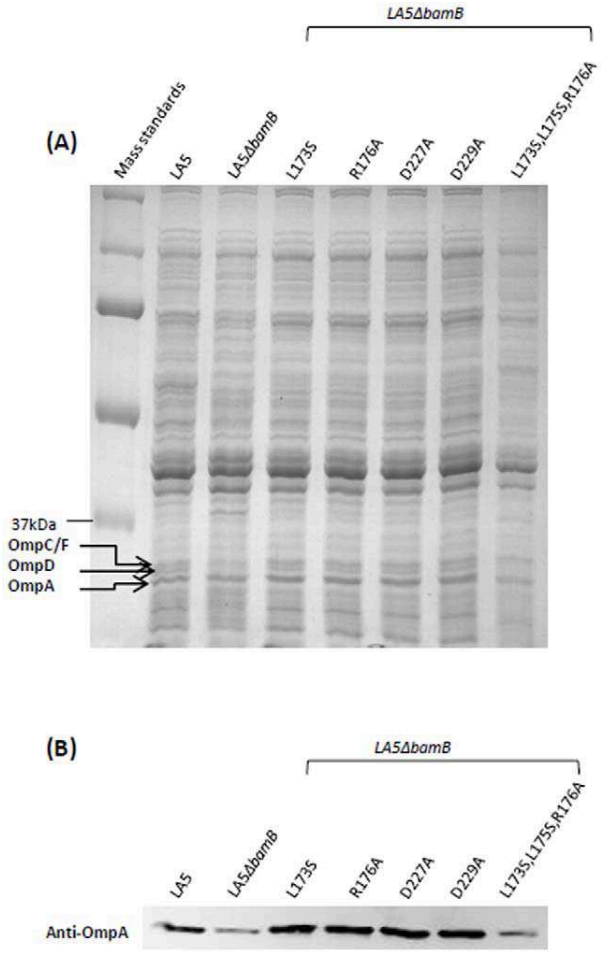


Figure 2. Influence of *bamB* point mutations on outer-membrane protein level. After culture in LB broth, total membrane proteins of the *S.* Enteritidis wild-type strain LA5, the LA5Δ*bamB* mutant, or the LA5Δ*bamB* mutant expressing BamB variants were extracted. Membrane proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE and either stained with colloidal Coomassie brilliant blue G250 (A) or transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with an anti-OmpA serum (B). The positions of OmpC/F, OmpD and OmpA are indicated. Results shown are representative of at least three independent culture and protein extractions.
doi:10.1371/journal.pone.0046050.g002

strain can be complemented by the expression of all our BamB variants except the L173S,L175S,R176A BamB protein.

Influence of *bamB* point mutations on the expression of T3SS-1 and flagella

Genes related to T3SS-1 and flagella biosynthesis are transcribed less in a *Salmonella* Δ*bamB* mutant than in the wild-type strain. Consequently, the expression of T3SS-1 effectors and flagellar proteins and their secretion in culture supernatant are reduced [18]. In order to determine whether the BamB variants were able to complement a Δ*bamB* mutant, i.e. to restore its ability to synthesize and assemble functional T3SS-1 and flagella, we investigated the expression and secretion of T3SS-1 effectors and flagellar proteins in the pellet and in the supernatant from each bacterial culture grown in LB medium containing NaCl 0.3 M. This culture condition is known to favor the expression of T3SS-1 related genes and to allow flagellar gene expression [29]. To ensure that precipitation of the secreted proteins and the loading of the different samples on the gel were similar, β-lactoglobulin was added to each culture supernatant. In the pellet samples, loading was checked by detecting the constitutively expressed cytoplasmic protein Hsp60. In addition and as expected, a western-blot against BamB confirmed the correct expression of BamB and its variant in all the strains except the deletion mutant (Figure 3A and 3B). Consistent with our previous results, the LA5Δ*bamB* mutant expressed and secreted less SipA and SipC, which are two T3SS-1 effectors, and less FliC and FliD flagellar proteins than the LA5 strain. Furthermore, single amino-acid BamB variants L173S, R176A or D229A were able to completely restore the expression and secretion abilities of the Δ*bamB* mutant. The corresponding strains were all able to express and secrete SipA, SipC, FliC and FliD proteins at similar or even higher levels than those observed with the wild-type strain (Figure 3A and 3B). The last single amino-acid variant, i.e. the D227A BamB variant, was shown to restore the secretion ability of the Δ*bamB* mutant to the wild-type level. However, a lower level of SipA, and to a lesser extent of FliC, were detected by western-blot on the pellet sample of the mutant expressing D227A BamB compared to the other strains which express the same level of BamB variants. As the total amount of these proteins synthesized by the bacteria corresponds to the amount of proteins in the supernatant plus those in the pellet, these results may reflect a slightly lower expression of T3SS-related proteins in the Δ*bamB* mutant expressing BamB D227A than in the wild-type strain, which is, however, sufficient to fully restore T3SS ability to secrete the synthesized effectors. By contrast, the levels of these proteins in the supernatant and pellet greatly decreased for the sample corresponding to the Δ*bamB* mutant expressing the L173S,L175S,R176A BamB protein, thus demonstrating that this protein is not able to complement the Δ*bamB* mutant (Figure 3A and 3B).

Overall, these results demonstrate that the single amino-acid substitutions L173S, R176A, D227A or D229A in BamB have little or no influence on the role of this protein in flagellar expression, or T3SS-1 expression or functionality. By contrast, the simultaneous substitution of the residues L173,L175,R176 plays a crucial part in this control of T3SS expression.

Influence of *bamB* point mutations on the virulence of *Salmonella* in mice

As the BamB variants displayed different phenotypes *in vitro*, we focused our study on the virulence of the Δ*bamB* mutant expressing these BamB variants in order to understand the relative importance of each phenotype in the strong virulence defect of

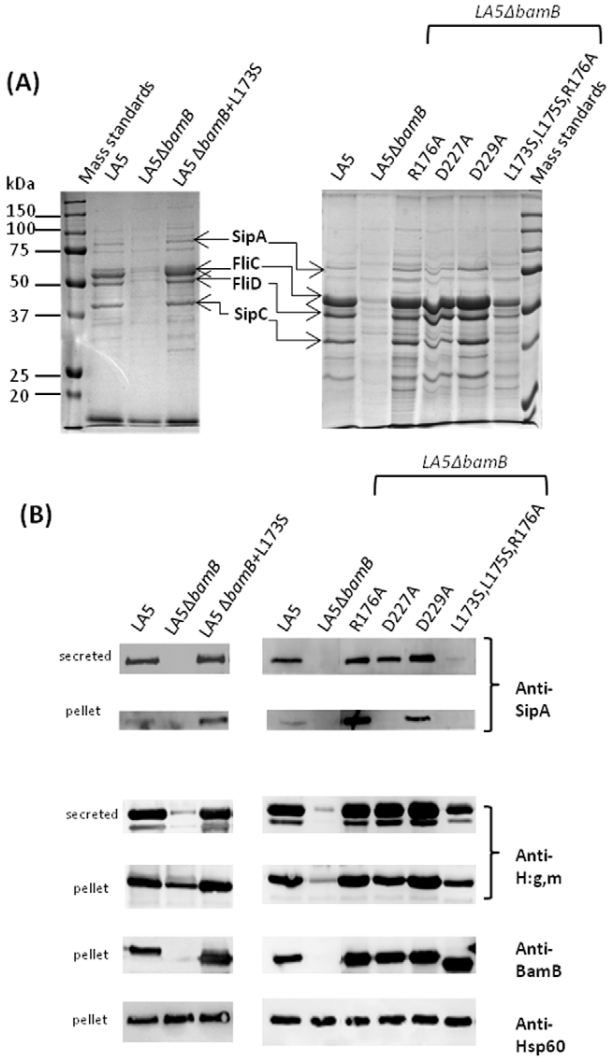


Figure 3. Influence of *bamB* point mutations on T3SS-1 and flagella expression and functionality. Protein secretion by the *S.* Enteritidis wild-type strain LA5, the LA5Δ*bamB* mutant, or the LA5Δ*bamB* mutant expressing BamB variants grown in LB supplemented with 0.3M NaCl was analyzed. Proteins from culture supernatants were TCA precipitated, separated by 10% SDS-PAGE, and stained with colloidal Coomassie brilliant blue G250 (A) or transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with polyclonal antibodies raised against either SipA or H:g,m flagellin (B). From the same cultures, bacteria were pelleted and resuspended in Laemmli buffer. After SDS-PAGE and transfer of the samples onto a nitrocellulose membrane, western-blots were performed using anti-SipA, anti-H:g,m flagellin, anti-Hsp60 or anti-BamB sera (B).
doi:10.1371/journal.pone.0046050.g003

the Δ*bamB* mutant in mice [18]. For this purpose, BamB variants were expressed from the pACYC177 vector after cloning the corresponding *bamB* ORF under the control of the *aph* constitutive promoter present on this plasmid. This was performed to ensure correct expression of BamB proteins in mice. The pBAD24 vector was not used here since arabinose induction cannot occur *in vivo* as this sugar is not naturally present in mice. It is important to note that the *in vitro* phenotypes of the Δ*bamB* mutants harboring the different recombinant pAC*bamB* plasmids were shown to be

identical to those obtained with Δ*bamB* mutants expressing BamB variants from pBAD24 (data not shown).

BALB/c mice were inoculated by the oral route with the different *S.* Enteritidis strains and the spleen colonization level was determined (Figure 4). Significant differences are presented in Table S2. At six days postinoculation, the LA5Δ*bamB* mutant and the mutant harboring the empty pACYC177 vector colonized the mouse spleens significantly less than the wild-type or the deletion mutant complemented with the wild-type *bamB* gene ($P<0.0001$), as previously described (Figure 4) [18]. The strains expressing the L173S, D227A or D229A BamB variant were able to restore the virulence of the LA5Δ*bamB* mutant completely, which was not the case for the R176A or the L173S,L175S,R176A triple-mutated protein. The Δ*bamB* mutant, expressing either L173S, D227A or D229A BamB protein, was indeed able to colonize the spleens as the wild-type strain and the Δ*bamB* mutant complemented with the wild-type BamB protein (Figure 4). By contrast, the spleen colonization levels were greatly reduced for mice inoculated with the strain expressing BamB proteins with either the triple L173S,L175S,R176A or the single R176A mutation compared to the wild-type controls ($P<0.0001$). Interestingly, while the triple mutated BamB protein was unable to complement the Δ*bamB* mutant, the strain expressing the R176A protein colonized reproducibly and significantly more mouse spleens than the Δ*bamB* mutant ($P<0.0001$). This result indicates that the R176A BamB protein is able to restore partially the virulence of the Δ*bamB* mutant (Figure 4).

These data clearly show that the association of the three residues L173,L175,R176 is crucial for the role of BamB in the virulence of *Salmonella* and that the R176 residue is important for this phenotype. By contrast, no involvement of the L173, D227 or D229 residue of BamB alone was observed.

Discussion

In the literature, the BamB protein has been shown to interact with BamA in the BAM complex and to be involved in four different phenotypes. Both in *E. coli* and *Salmonella*, BamB has been shown to be involved in β-barrel protein assembly in the outer membrane and in the preservation of the outer membrane permeability to antibiotics [3,11,18,28]. In *Salmonella*, BamB is also important for optimal expression of the T3SS-1 and flagella

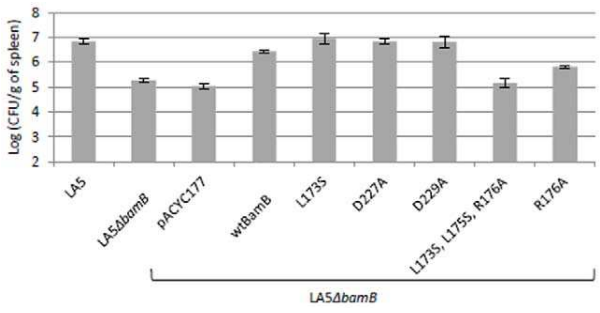


Figure 4. Influence of *bamB* point mutations on *Salmonella* virulence in mice. Groups of 10 six-week-old BALB/C mice were orally inoculated with about 5.10^8 CFU of the different *S.* Enteritidis strains. Spleen colonization was determined at six days post-inoculation. At least two independent experiments were performed for each strain. Results corresponding to the compilation of all experiments are shown. Results were compared by variance analysis followed by a Tukey-Kramer test (Systat 13, Systat software). Significant differences are presented in Table S2.
doi:10.1371/journal.pone.0046050.g004

related proteins and for bacterial virulence [18,20]. However, to date little was known about whether an interaction between BamB and BamA is required for BamB activity or the relationships between the different BamB-related phenotypes. Figure 5 summarizes the results obtained in this study.

In *E. coli,* a previous study by Vuong *et al.* [16] looked at the impact of the L173S, L175S, R176A, D227A, D229A single substitutions or the triple L173S,L175S,R176A substitutions in BamB. They analyzed the interaction of this protein with BamA and the ability of these mutated BamB proteins to restore the susceptibility of a *bamB* mutant to vancomycin and its defect in the assembly of the OMP LamB. Most of the results obtained in *Salmonella* are in line with those obtained in *E. coli*. Indeed, the L173S or R176A BamB variants were shown to behave as the wild-type BamB protein, while the triple-mutated BamB variant was not able to complement a *bamB* mutant for the phenotypes analyzed in either of these two bacteria. For example, western-blot analyses of total LamB proteins in *E. coli* [16] and of the amount of OmpA proteins on total *Salmonella* membrane proteins (Figure 2), showed in both cases an important defect in OMPs in the triple-mutated L173S,L175S,R176A BamB variant. Thus, our study confirms the importance of the association of L173, L175 and R176 amino-acids for BamB functions. Indeed, this variant was the only one unable to restore any of the phenotypes tested, including, for the first time, bacterial virulence. These three residues are present in the interconnecting loop 4 that connects blade 4 and 5 of the β-propeller and which seems important for BamB interaction with the POTRA 3 domain of BamA [26]. However, this involvement in the interaction with BamA is probably not the reason why these residues are so important for all BamB functions. In fact, other results of our study strongly suggest that this interaction is not necessary for at least some BamB functions (see below).

However, our study highlights two differences between *E. coli* and *Salmonella*. Firstly, in *Salmonella*, only D229A or the simultaneous L173S, L175S and R176A substitutions induced a marked alteration of BamB interaction with BamA (Figure 1), whereas in *E. coli* the D227A substitution also had an important effect on this interaction [16]. In our experiments, the D227A BamB variant was able to co-immunoprecipitate BamA at levels similar to that obtained for the wild-type BamB protein (Figure 1). The major difference between the procedures used in these two studies is the use of an anti-His tag serum in the study of Vuong *et al.* [16] and of a BamB antiserum in the present study. This result demonstrates that the residue D227 is not important for BamB interaction with BamA in *Salmonella*. The second difference concerns the ability of the BamB D227A variant to restore or not a wild-type level of antibiotic susceptibility in a *bamB* mutant. In *E. coli,* the *bamB* mutant expressing the D227A BamB variant had an intermediate minimal inhibitory concentration of vancomycin situated between that of the mutant and the wild-type strain. By contrast, in our experiments performed with *Salmonella*, no complementation was observed with the D227A variant of BamB for the six antibiotics tested, including vancomycin (Table 1). Recall that the plasmids used in our study are those of Vuong *et al.* [16] and thus the cloned *bamB* gene used for complementation analyses is that of *E. coli*. We therefore can not exclude that the two differences between *E. coli* and *Salmonella* we observed could be due to the fact that we did not use the *bamB* gene of *Salmonella* even if the two BamB proteins are very similar (94% of similarity and 91% of identity) and the amino-acids studied are conserved in the two bacteria.

In the literature, the BamB protein has until now been considered as a "permanent" member of the BAM complex,

	LA5	LA5Δ*bamB*	LA5Δ*bamB* expressing BamB protein					
			wtBamB	L173S	R176A	D227A	D229A	L173S,L175S,R176A
BamB/BamA interaction	+	-	+	+	+	+	-	-
Antibiotic resistance	+	-	+	+	+	-	+/-	-
OMP assembly	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-
Flagellar expression/T3SS-1 expression and functionality	+++	+/-	+++	+++	+++	++	+++	+
Virulence in mice	++	+/-	++	++	+	++	++	+/-

The lighter the color the greater the difference in phenotype is compared to the wild type- strain.
-, +/-, +, ++, +++ correspond to an arbitrary evaluation of each phenotype intensity for the LA5 Δ*bamB* mutant expressing the different BamB variants compared to the one of the wild-type *S.* Enteritidis LA5 strain and the LA5Δ*bamB* mutant.

Figure 5. Overview of phenotypic traits of S. Enteritidis LA5ΔbamB mutant strains expressing BamB proteins with point mutations.
doi:10.1371/journal.pone.0046050.g005

interacting only with the BamA protein in this complex [3,9]. Our results suggest that the interaction of BamB with BamA is not absolutely necessary for correct OMP biogenesis, optimal T3SS expression and virulence in mice, and therefore that BamB could be active "outside" the BAM complex. Indeed, while the D229A BamB variant was shown to restore a wild-type level of OMP in the outer membrane, T3SS-1/flagella expression and virulence in mice, it was unable to interact with BamA (Figures 2 and 3). Vuong *et al.* also previously found that this mutation did not affect the LamB level and the minimal inhibitory concentration of vancomycin [16]. However, we cannot exclude the hypothesis that a weak interaction of BamB with BamA in vivo could be sufficient to correctly assemble OMPs in the outer membrane, fully express T3SS and allow *Salmonella* to be fully virulent. If the BamB/BamA interaction is not absolutely required for BamB activity, it could explain the results of Ieva *et al.* [19] suggesting a direct role of BamB in β-barrel assembly at a later stage than BamA.

Overall, our results invoke a possibility that BamB can function in OMP assembly both in conjunction with the BAM complex and independent of the BAM complex. This hypothesis could explain why *bamB* and *surA* mutants have similar phenotypes [30]. Moreover, our results show that the antibiotic sensitivity phenotype of a Δ*bamB* mutant is not always associated with an OMP assembly defect. We conclude this from the observation that the BamB D227A and to a lesser extent the D229A BamB variants restore a wild-type level of the major OMP, but not of antibiotic susceptibility to a Δ*bamB* mutant.

BamB plays an essential role in *Salmonella* virulence in a lethal systemic infection model in mice, but the complete underlying mechanism remains to be elucidated. The attenuation of the virulence of a *Salmonella* Δ*bamB* mutant could be explained by an increase in outer-membrane permeability, making this mutant more susceptible to stomach acidity and to antimicrobial peptides, and/or decreased expression of T3SS and flagella [18,20]. From our results, it appears unlikely that the susceptibility of the mutant to antimicrobials can explain its virulence defect. While the Δ*bamB* mutant expressing the D227A BamB variant presents an alteration in outer-membrane permeability similar to the mutant, it remains as virulent as the wild-type *S.* Enteritidis LA5 strain. These data are in line with unpublished results from our laboratory which show that the Δ*bamB* mutant is able to persist as well as the wild-type strain in the caeca for several weeks after oral inoculation of chicks. By contrast, it is more than likely that the decreased expression of T3SS in the Δ*bamB* mutant plays an important role in the virulence defect of this strain *in vivo*. Indeed, compelling evidence highlights the major role of T3SS in the virulence of *Salmonella* [31,32,33]. However, currently no data from the present study support the *in vivo* importance of BamB in the control of T3SS expression. Indeed, the only BamB variant (L173S,L175S,R176A) impacting on the expression of T3SS-1 and flagella was also impaired in all the *in vitro* and *in vivo* phenotypes that were tested. Nevertheless, our results obtained in mice with the R176A BamB variant show that the virulence defect of a Δ*bamB* mutant could be linked not only to decreased expression of its T3SS, and thus suggest another role of BamB *in vivo*. The Δ*bamB* mutant expressing this mutated R176A protein, while expressing functional T3SS-1 and flagella, was clearly less virulent than the wild-type strain even though it colonized spleens significantly more than the Δ*bamB* mutant. According to van der Straaten *et al.* [34] and van Diepen *et al.* [35], a role of BamB (called SspJ in their paper) in bacterial resistance to oxidative stress could explain the *in vivo* attenuation that we observed for the Δ*bamB* mutant expressing R176A BamB.

Overall, our results show that in *Salmonella* the interaction of BamB with BamA is not absolutely required for most phenotypes in which BamB has previously been shown to be involved. Moreover, we have demonstrated that some of these phenotypes are independent, thus highlighting that the role of BamB is more complex than previously thought. Further functional experiments are required to understand the precise role of this protein, which is an interesting potential therapeutic target due to its role in several essential functions of *Salmonella*, including outer membrane biogenesis and virulence. On the basis of our present results, the association of L173, L175 and R176 amino-acids could be considered as candidate sites for the design of BamB inhibitors.

Materials and Methods

Ethics statement

Animal experiments were conducted in strict accordance with French recommendations (number 2001–131 from 4.02.2001 and number 2001–464 from 29.05.2001) and the protocol was approved by the Regional Ethics Committee for Animal Research "Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale - Centre Limousin", recognized by the French Ministry for Research and Education (file number 2011/10). All efforts were made to minimize suffering. We fixed a humane endpoint based on the ability of mice to feed and have a normal activity.

During the experiments, mice were monitored at least once a day and their behavior was noted. As soon as one animal in a group showed at least 2 of the following symptoms, they were monitored twice a day: bristly hairs, a round-shouldered back or conjunctivitis-like symptoms. At the end of the experiment, mice

showed the above symptoms but were all still able to feed and had a normal activity. Thus, the humane endpoint was not reached.

Carbone dioxide anesthesia was performed before mice euthanasia using cervical dislocation by trained individuals.

Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are presented in Table 2. The *S.* Enteritidis LA5 wild-type strain is a field isolate from infected chickens and is resistant to nalidixic acid (NAL): 20 $\mu g.mL^{-1}$ [36,37]. Bacteria were routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth with shaking (200 rpm) at 37°C overnight, except when specified. Carbenicillin (CAR): 100 $\mu g.mL^{-1}$ or NAL: 20 $\mu g.mL^{-1}$ were added to the culture medium when necessary. In order to induce BamB expression from pBAD24 or pTrcHisA plasmids, arabinose (0.2% [wt/vol]) or isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG 1 mM) was added respectively to the medium. The strains expressing a wild-type BamB and those expressing BamB with point mutations had similar growth curves under all culture conditions used in this study (data not shown).

Construction of plasmids pTrcHis*bamB* and pAC*bamB* mutants

The wild-type *bamB* ORF from the chromosomal DNA of *S.* Enteritidis LA5 strain was amplified by PCR, using primers 5′GCGAATTCCAGGAAAACGGCCCCTACACCAG-GAGC3′ and 5′ATCGAGCTCCAATTGCGTAAAT-TACTTCTGCCAGGG 3′. After restriction with the EcoRI and SacI restriction enzymes, the 1.2 kb PCR product was cloned into the same restriction sites of pTrcHisA vector (Invitrogen), generating pTrcHis*bamB*.

Using PCR, the different mutated *bamB* ORFs (coding for BamB variants with single L173S, R176A, D227A, D229A mutations or the triple L173S,L175S, R176A substitutions) were amplified from pBAD*bamB* plasmids with primers 5′TTGTACCCGGGCGAGAGGGACCCGATG3′ and 5′TA-GAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG3′. After restriction with the SmaI and HindIII restriction enzymes, the 1.2 kb PCR product was cloned into the same restriction sites of pACYC177 vector [38], generating plasmids pAC*bamB* expressing constitutively the different BamB variant proteins thanks to the promoter of the kanamycin resistance gene.

All constructions were checked by sequencing.

Co-immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation assays were performed in accordance with the protocol of Vuong *et al.* [16] with the following changes: cultures were made in LB medium and 40 mL of bacteria were pelleted and resuspended in 300 µl of lysis buffer (Tris-HCl pH 8, 50 mM; NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, Triton 0.1%, lysozyme 0.35 µM). After protein solubilization and centrifugation, the assays were performed with 11 mg of proteins for each strain using a polyclonal anti-BamB serum and sepharose beads coupled with protein G (Sigma-Aldrich) for immunoprecipitation. Five washes were performed on SigmaPrep spin columns (Sigma-Aldrich) with a solution containing 500 µl of a Tris-HCl 50 mM pH 8; NaCl 350 mM; EDTA 0.1 mM. Immunoprecipitates were eluted from columns by boiling for five minutes after the addition of 50 µL of Laemmli buffer [39]. Eluates were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were then either silver stained or transferred onto nitrocellulose membranes (Protran) and analyzed by western-blots with anti-BamA or anti-BamB antisera as described below. Three independent experiments were carried out for each strain.

Table 2. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or Plasmid	Relevant characteristic(s)	Source
Strains		
LA5	*S. enterica* serovar Enteritidis wild-type strain (NAL^R)	[36]
LA5Δ*bamB*	LA5 isogenic mutant with the *bamB* gene deleted (NAL^R)	[18]
Plasmids		
pACYC177	Cloning vector (CAR^R,KAN^R)	[38]
pTrcHis*A*	Expression vector (CAR^R) for His-tagged proteins	Invitrogen
pTrcHis*bamB*	*S.* Enteritidis *bamB* gene in plasmid pTrcHis*A* (CAR^R) producing wtBamB	This work
pBAD*bamB*(L173S)	Plasmid pBAD24 producing L173S BamB variant	[16]
pBAD*bamB*(R176A)	Plasmid pBAD24 producing R176A BamB variant	[16]
pBAD*bamB*(D227A)	Plasmid pBAD24 producing D227A BamB variant	[16]
pBAD*bamB*(D229A)	Plasmid pBAD24 producing D229A BamB variant	[16]
pBAD*bamB*(L173S,L175S,R176A)	Plasmid pBAD24 producing L173S,L175S,R176A BamB variant	[16]
pAC*bamB*	*S.* Enteritidis *bamB* gene in plasmid pACYC177 (CAR^R) producing wtBamB. Formerly pAC*yfgL*	[18]
pAC*bamB*(L173S)	Plasmid pACYC177 producing L173S BamB variant	This work
pAC*bamB*(R176A)	Plasmid pACYC177 producing R176A BamB variant	This work
pAC*bamB*(D227A)	Plasmid pACYC177 producing D227A BamB variant	This work
pAC*bamB*(D229A)	Plasmid pACYC177 producing D229A BamB variant	This work
pAC*bamB*(L173S,L175S,R176A)	Plasmid pACYC177 producing L173S,L175S,R176A BamB variant	This work

doi:10.1371/journal.pone.0046050.t002

Protein extractions

For secreted proteins and proteins from the pellet, bacteria were cultured in LB broth containing 0.3 M NaCl until the optical density at 600 nm ($O.D._{600}$) reached 1.8–2.0. Secreted bacterial proteins were then recovered as previously described by Arricau *et al.* [29]. β-lactoglobulin (0.5 $\mu g.mL^{-1}$; Sigma) was added to each culture supernatant to control for protein precipitation and sample loading. Bacterial pellet proteins were obtained after centrifugation of bacterial cultures and direct resuspension in Laemmli buffer [39]. Proteins were then separated using electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide gels and either stained with colloidal Coomassie brilliant blue G-250 [40] or transferred onto nitrocellulose membranes (Protran) for western-blotting. At least three independent experiments were carried out.

To recover membrane proteins, bacteria were grown in LB until $O.D._{600} = 1$ and total membrane protein extractions were performed as previously described [27]. Proteins then underwent electrophoresis on a 12% SDS-PAGE and were stained with colloïdal Coomassie brilliant blue G-250 [40]. At least three independent experiments were carried out for each strain.

Western-blot analyses

Proteins were analyzed through western-blots using, as primary antibodies, either a polyclonal rabbit anti-SipA serum (1:2000) [20], a polyclonal rabbit anti-H:g,m serum (1:500) (Biolabs), a polyclonal mouse anti-Hsp60 serum (1:6000) (Assaydesigns-Stressgen), a polyclonal rabbit anti-BamA serum (1:40000) [41], a polyclonal rabbit anti-BamB serum (1:6000) or a polyclonal rabbit anti-OmpA serum (1:6000). The anti-H:g,m serum recognizes flagellar proteins including FliC and FliD proteins. A goat peroxydase-labelled anti-rabbit IgG (1:10000, Dako) serum was used as secondary antibody except for Hsp60, for which a rabbit peroxidase-labelled anti-mouse serum (1:5000, Dako) was used. Proteins were revealed using the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific).

Antibiotic susceptibility

Strain susceptibilities to different antibiotics were assessed by a disk diffusion assay using 6-mm filter paper disks (Bio-Rad) as recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. From overnight cultures, bacterial suspensions were prepared at the 0.5 McFarland turbidimetric standard. They were then poured over a Mueller-Hinton (MH) agar plate containing arabinose (0.2% [wt/vol]) or IPTG (1 mM) when needed, and after drying, 6 mm disks containing the antibiotics were placed on the agar surface. After plate incubation for 20 h at 37°C, the diameter of the growth inhibition zone around each disk was measured. Two experiments were carried out for each strain. We checked that the addition of arabinose or IPTG in the preculture and in the MH agar plates had no impact on the diameter obtained for the wild-type or the *bamB* mutant strains (data not shown).

Infection of mice

Six to seven week-old female BALB/c mice were obtained from Janvier laboratories and maintained in our animal facilities at the Institut National de la Recherche Agronomique (Nouzilly, France) on a diet of mouse chow and water ad libitum. Groups of 10 mice were each inoculated orally with approximately 5.10^8 CFU of *S.* Enteritidis using the protocol described by Pardon *et al.* [42]. Spleen colonization was estimated at six days postinoculation by plating serial dilutions in phosphate-buffered saline on *Salmonella-Shigella* agar plates. Three independent experiments were carried out. Results were compared using analysis of variance and analyzed by the Tukey-Kramer test (Systat 13, Systat software).

Supporting Information

Table S1 Impact of *bamB* deletion on the antibiotic susceptibility of *S.* Enteritidis.
(DOC)

Table S2 Pairwise comparison of spleen colonization level by the different *S.* Enteritidis strains.
(DOC)

Acknowledgments

We are grateful to S. Baucheron and P. Germon for helpful discussions and also to I. Monchaux for expert technical assistance. We especially thank Dr Rajeev Misra for generously providing us with the pBAD*bamB* variants. We also thank Dr Lloubes, Dr Malinverni and Dr Silhavy for providing the anti-OmpA and anti-BamA antisera respectively.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FN GAHE PV IVP. Performed the experiments: FN GAHE JT EG IVP. Analyzed the data: FN GAHE NA EG PV IVP. Contributed reagents/materials/analysis tools: NA YF. Wrote the paper: FN IVP.

References

1. Hagan CL, Silhavy TJ, Kahne DE (2011) β-Barrel membrane protein assembly by the Bam complex. Annu Rev Biochem 80: 189–210.
2. Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D, et al. (2007) Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. PNAS 104: 6400–6405.
3. Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, et al. (2005) Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. Cell 121: 235–245.
4. Anwari K, Webb CT, Poggio S, Perry AJ, Belousoff M, et al. (2012) The evolution of new lipoprotein subunits of the bacterial outer membrane BAM complex. Mol Microbiol 84: 832–844.
5. Gatsos X, Perry AJ, Anwari K, Dolezal P, Wolynec PP, et al. (2008) Protein secretion and outer membrane assembly in *Alphaproteobacteria*. FEMS Microbiology Reviews 9999: 1–15.
6. Gentle I, Gabriel K, Beech P, Waller R, Lithgow T (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. J Cell Biol 164: 19–24.
7. Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, et al. (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. Nature 426: 862–866.
8. Walther D, Rapaport D, Tommassen J (2009) Biogenesis of β-barrel membrane proteins in bacteria and eukaryotes: evolutionary conservation and divergence. Cellular and Molecular Life Sciences 66: 2789–2804.
9. Kim S, Malinverni JC, Sliz P, Silhavy TJ, Harrison SC, et al. (2007) Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. Science 317: 961–964.
10. Palomino C, Marin E, Fernandez LÃ (2011) The fimbrial usher FimD follows the SurA-BamB pathway for its assembly in the outer membrane of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 193: 5222–5230.
11. Ruiz N, Falcone B, Kahne D, Silhavy TJ (2005) Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. Cell 121: 307–317.
12. Ieva R, Bernstein HD (2009) Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. Proceedings of the National Academy of Sciences 106: 19120–19125.
13. Lehr U, Schütz M, Oberhettinger P, Ruiz-Perez F, Donald J, et al. (2010) C-terminal amino acid residues of the trimeric autotransporter adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica* are decisive for its recognition and assembly by BamA. Molecular Microbiology 78: 932–946.
14. Rossiter AE, Leyton DL, Tveen-Jensen K, Browning DF, Sevastsyanovich Y, et al. (2011) The essential β-barrel assembly machinery complex components

BamD and BamA are required for autotransporter biogenesis. Journal of Bacteriology 193: 4250–4253.
15. Sauri A, Soprova Z, Wickstrom D, de Gier J-W, Van der Schors RC, et al. (2009) The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. Microbiology 155: 3982–3991.
16. Vuong P, Bennion D, Mantei J, Frost D, Misra R (2008) Analysis of YfgL and YaeT interactions through bioinformatics, mutagenesis, and biochemistry. J Bacteriol 190: 1507–1517.
17. Charlson ES, Werner JN, Misra R (2006) Differential effects of *yfgL* mutation on *Escherichia coli* outer membrane proteins and lipopolysaccharide. J Bacteriol 188: 7186–7194.
18. Fardini Y, Chettab K, Grepinet O, Rochereau S, Trotereau J, et al. (2007) The YfgL lipoprotein is essential for Type III secretion system expression and virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Infect Immun 75: 358–370.
19. Ieva R, Tian P, Peterson JH, Bernstein HD (2011) Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter β-domain. Proceedings of the National Academy of Sciences 108: E383–E391.
20. Amy M, Velge P, Senocq D, Bottreau E, Mompart F, et al. (2004) Identification of a new *Salmonella enterica* serovar Enteritidis locus involved in cell invasion and in the colonization of chicks. Research in Microbiology 155: 543–552.
21. Rolhion N, Barnich N, Claret L, Darfeuille-Michaud A (2005) Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the *yfgL* gene deleted. J Bacteriol 187: 2286–2296.
22. Hagan CL, Kahne D (2011) The reconstituted *Escherichia coli* Bam complex catalyzes multiple rounds of β-barrel assembly. Biochemistry 50: 7444–7446.
23. Hagan CL, Kim S, Kahne D (2010) Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components. Science 328: 890–892.
24. Heuck A, Schleiffer A, Clausen T (2011) Augmenting β-augmentation: structural basis of how BamB binds BamA and may support folding of outer membrane proteins. Journal of Molecular Biology 406: 659–666.
25. Kim KH, Paetzel M (2011) Crystal structure of *Escherichia coli* BamB, a lipoprotein component of the beta-barrel assembly machinery complex. J Mol Biol 406: 667–678.
26. Noinaj N, Fairman JW, Buchanan SK (2011) The crystal structure of BamB suggests interactions with BamA and its role within the BAM complex. Journal of Molecular Biology 407: 248–260.
27. Fardini Y, Trotereau J, Bottreau E, Souchard C, Velge P, et al. (2009) Investigation of the role of the BAM complex and SurA chaperone in outer-membrane protein biogenesis and type III secretion system expression in *Salmonella*. Microbiology 155: 1613–1622.
28. Onufryk C, Crouch M-L, Fang FC, Gross CA (2005) Characterization of six lipoproteins in the σE regulon. J Bacteriol 187: 4552–4561.
29. Arricau N, Hermant D, Waxin H, Ecobichon C, Duffey PS, et al. (1998) The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella* Typhi differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. Mol Microbiol 29: 835–850.
30. Ureta AR, Endres RG, Wingreen NS, Silhavy TJ (2007) Kinetic analysis of the assembly of the outer membrane protein LamB in *Escherichia coli* mutants each lacking a secretion or targeting factor in a different cellular compartment. J Bacteriol 189: 446–454.
31. Galan JE, Curtiss R III (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 6383–6387.
32. Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, et al. (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science 269: 400–403.
33. Wallis TS, Galyov EE (2000) Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. Mol Microbiol 36: 997–1005.
34. van der Straaten T, van Diepen A, Kwappenberg K, van Voorden S, Franken K, et al. (2001) Novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protein that is indispensable for virulence and intracellular replication. Infect Immun 69: 7413–7418.
35. van Diepen A, van der Straaten T, Holland SM, Janssen R, van Dissel JT (2002) A superoxide-hypersusceptible *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutant is attenuated but regains virulence in p47phox−/− mice Infect Immun 70: 2614–2621.
36. Allen-Vercoe E, Dibb-Fuller M, Thorns CJ, Woodward MJ (1997) SEF17 fimbriae are essential for the convoluted colonial morphology of *Salmonella* Enteritidis. FEMS Microbiol Lett 153: 33–42.
37. Grepinet O, Rossignol A, Loux V, Chiapello H, Gendrault A, et al. (2012) Genome sequence of the invasive *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis strain LA5. J Bacteriol 194: 2387–2388.
38. Chang AC, Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J Bacteriol 134: 1141–1156.
39. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680–685.
40. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9: 255–262.
41. Malinverni JC, Werner J, Kim S, Sklar JG, Kahne D, et al. (2006) YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology 61: 151–164.
42. Pardon P, Popoff MY, Coynault C, Marly J, Miras I (1986) Virulence-associated plasmids of *Salmonella* serotype Typhimurium in experimental murine infection. Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie 137B: 47–60.

MicrobiologyOpen

Open Access

Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis

P. Velge[1,2], A. Wiedemann[1,2], M. Rosselin[1,*], N. Abed[1], Z. Boumart[1,3], A. M. Chaussé[1,2], O. Grépinet[1,2], F. Namdari[1,2], S. M. Roche[1,2], A. Rossignol[1,2] & I. Virlogeux-Payant[1,2]

[1]INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380, Nouzilly, France
[2]Université François Rabelais de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000, Tours, France
[3]Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, 22440, Ploufragan, France

Keywords
Adhesion, invasin, invasion, *Salmonella*, Trigger, type III secretion system, Zipper

Correspondence
P. Velge, INRA of Tours, UMR 1282, ISP 37380 Nouzilly, France.
Tel: ++33-2 47 42 78 93;
Fax: +33-2 47 42 77 79;
E-mail: philippe.velge@tours.inra.fr

Funding Information
Work in the laboratory was funded by grants from the European EADGENE Network of Excellence, the European integrated project SABRE, the French project RESISAL, funded by Agenavi and Agence National pour la Recherche within the framework of the National Genanimal program.

Received: 20 February 2012; Revised: 4 May 2012; Accepted: 7 May 2012

MicrobiologyOpen **2012; 1(3): 243–258**

doi: 10.1002/mbo3.28

*Current address: Department of Microbiology and Immunology, F. Edward Hébert School of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland

Abstract

The *Salmonella enterica* species includes about 2600 diverse serotypes, most of which cause a wide range of food- and water-borne diseases ranging from self-limiting gastroenteritis to typhoid fever in both humans and animals. Moreover, some serotypes are restricted to a few animal species, whereas other serotypes are able to infect plants as well as cold- and warm-blooded animals. An essential feature of the pathogenicity of *Salmonella* is its capacity to cross a number of barriers requiring invasion of a large variety of phagocytic and nonphagocytic cells. The aim of this review is to describe the different entry pathways used by *Salmonella* serotypes to enter different nonphagocytic cell types. Until recently, it was accepted that *Salmonella* invasion of eukaryotic cells required only the type III secretion system (T3SS) encoded by the *Salmonella* pathogenicity island-1. However, recent evidence shows that *Salmonella* can cause infection in a T3SS-1-independent manner. Currently, two outer membrane proteins Rck and PagN have been clearly identified as *Salmonella* invasins. As Rck mediates a Zipper-like entry mechanism, *Salmonella* is therefore the first bacterium shown to be able to induce both Zipper and Trigger mechanisms to invade host cells. In addition to these known entry pathways, recent data have shown that unknown entry routes could be used according to the serotype, the host and the cell type considered, inducing either Zipper-like or Trigger-like entry processes. The new paradigm presented here should change our classic view of *Salmonella* pathogenicity. It could also modify our understanding of the mechanisms leading to the different *Salmonella*-induced diseases and to *Salmonella*-host specificity.

Salmonella and Salmonelloses

The bacteria and diseases

Salmonella is a member of the Enterobacteriaceae family, a large group of Gram-negative, facultative anaerobic and nonspore-forming bacilli. The genus *Salmonella* consists of only two species, *Salmonella bongori* and *Salmonella enterica*, and the latter is divided into six subspecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, and *indica* (Guibourdenche et al. 2010). The agglutinating properties of the somatic O, flagellar H, and capsular Vi antigens are used to differentiate more than 2600 serologically distinct *Salmonella* (Guibourdenche et al. 2010). Strains belonging to *S. enterica* subsp. *enterica* cause approximately 99% of *Salmonella* infections in humans and warm-blooded animals (McClelland et al. 2001). Moreover, this subspecies is able to infect plants and numerous international outbreaks of *S. enterica* have been linked to plant contamination (Pezzoli et al. 2007; Nygard

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

et al. 2008). Serotypes in other subspecies are usually isolated from cold-blooded animals and the environment, but rarely from humans (Uzzau et al. 2000). *Salmonella* nomenclature is now based on the name of serotypes belonging to subspecies. For example, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium is shortened to *Salmonella* Typhimurium (Brenner et al. 2000).

From a clinical perspective, *Salmonella* serotypes may be broadly grouped on the basis of host range and disease outcomes (Uzzau et al. 2000). Host-specific serotypes are associated with severe systemic disease in adults of a single species, which may seldom involve diarrhea (e.g., *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Gallinarum). For example, *S.* Typhi is a human-specific pathogen causing a septicaemic typhoid syndrome (enteric fever). *S.* Gallinarum has a host range restricted to birds and causes a severe systemic disease called fowl typhoid (Shivaprasad 2000). Host-restricted serotypes are primarily associated with systemic disease in few hosts (e.g., *Salmonella* Dublin in cattle, *Salmonella* Choleraesuis in pigs and humans), but may cause disease in a limited number of other species (Chiu et al. 2004). Broad host range serotypes, such as *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis cause the majority of human gastrointestinal salmonelloses (Velge et al. 2005). They are able to infect, among many other animal species, domestic livestock and fowl worldwide, resulting in a spectrum of outcomes ranging from severe systemic disease to asymptomatic carriage. For example, in contrast to *S.* Gallinarum, which induces a systemic infection only in fowl, *S.* Enteritidis and *S.* Typhimurium generate a subclinical intestinal infection in poultry after a short systemic infection, and infected hens can become chronic carriers and lay contaminated eggs (Shivaprasad 2000; Velge et al. 2005). In humans and cattle, infection with these broad host range serotypes manifests as enterocolitis, usually limited to the gastrointestinal tract and rarely spreads to systemic organs (Stevens et al. 2009). In susceptible mice, these serotypes cross the gut epithelium efficiently, colonize the spleen and the liver, and are consequently responsible for a typhoid-like disease (Santos et al. 2001). Moreover, even within the same serotype, different strains isolated from animals or humans exhibited different virulence levels (Heithoff et al. 2008), and host-restricted variants exist, such as pigeon-associated *S.* Typhimurium definitive type (DT)-2 and DT99 strains (Rabsch et al. 2002). Finally, for the same host, the different *Salmonella* serotypes can induce different pathologies. For example, oral inoculation of weaned calves with *S.* Dublin produces severe systemic infection, whereas *S.* Gallinarum is avirulent and *S.* Typhimurium elicits acute enteritis (Paulin et al. 2002). Pathogenesis is not only influenced by the dose and route of inoculation but also by the genetic background and immune status of the host (Calenge et al. 2009, 2010). In summary, no other bacterial pathogen belonging to a single species shows such a remarkable ability to infect different hosts and induce so many different diseases.

Host invasion pathways

Despite the availability of complete genome sequences of isolates representing several serotypes, the molecular mechanisms underlying *Salmonella* colonization, pathogenesis, and transmission have been described mainly in rodents, and thus little is known about these mechanisms in farm animals and humans.

Host infections are usually initiated by ingestion of contaminated food or water followed by the passage of the bacteria from the stomach to the intestine. There, the bacteria adhere to and enter the cells lining the intestinal epithelium. Passage of the bacteria through the intestinal wall is believed to be initiated by transcytosis, that is, invasion of either enterocytes or M cells at the apical side, migration to the basolateral side, and exocytosis into the interstitial space of the lamina propria (Takeuchi 1967; Clark et al. 1994; Muller et al. 2012). Direct capture by $CD18^{+}$ phagocytes and $CD11b^{+}$, $CD11c^{+}$, CX_3CR1^{high} phagocytes has also been observed (Vazquez-Torres et al. 1999; Muller et al. 2012). Within the lamina propria, *S.* Typhimurium is taken up randomly by the different phagocytes (macrophages, dendritic cells, and polymorphonuclear cells) and disseminates rapidly through efferent lymph in mesenteric lymph nodes and through the blood stream in spleen and liver (Salcedo et al. 2001). However, different behaviors have been observed depending on the serotype and the host. In cattle, *S.* Dublin transits rapidly through the epithelial layer and associates with MHC class II-positive cells in the lamina propria. These bacteria are predominantly extracellular within efferent lymph, but it remains unclear how they arrive in draining nodes or escape into an extracellular niche in this organ (Pullinger et al. 2007). *S.* Typhi, like *S.* Typhimurium, is capable of entering the murine intestinal epithelium via M cells. However, unlike *S.* Typhimurium, it does not destroy the epithelium and is cleared from the Peyer's patches soon after M-cell entry (Pascopella et al. 1995).

Cell invasion pathways

The reasons why some *Salmonella* serotypes are confined to the intestine while others translocate to distal organs remain unclear. An essential feature of the pathogenicity of *Salmonella* is its interaction with phagocytic and nonphagocytic cells, and *Salmonella* entry into host cells is known to be critical for bacterial survival and

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

establishment of disease in a host. In general, intracellular bacterial pathogens enter nonphagocytic eukaryotic cells via two mechanisms, which are initially differentiated according to morphological criteria based on membrane remodeling. The "Trigger" mechanism involves dramatic cytoskeletal rearrangements known as "membrane ruffles" (Fig. 1A and B). In contrast, in the "Zipper" mechanism, or "receptor-mediated entry," the invading bacteria are tightly bound to the host cell membrane, and only minor cytoskeletal protein rearrangements are initiated by specific contact between bacterial ligands (invasin) and host cell surface receptors (Fig. 1C and D). An important mechanistic difference between the Trigger and Zipper modes of entry is that the former is triggered from "inside" via the action of bacterial effectors delivered by secretion systems, whereas the latter is promoted from "outside" through activation of host cell receptors. However, in both cases, bacteria hijack the cell's physiological processes through the modulation of existing cell signaling cascades. It has recently been reported that *Salmonella* is the first bacteria shown to be able to enter cells using both these mechanisms (Rosselin et al. 2010). An emerging idea is that *Salmonella* strains can enter nonphagocytic cells by multiple pathways involving a Trigger or a Zipper mechanism. This is in contrast to the prevailing paradigm of *Salmonella* pathogenesis asserting that the *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system (SPI-1 T3SS or T3SS-1) is essential for bacterial invasion of host cells. The T3SS-1 and other cell invasion mechanisms are described below.

Role of T3SS-1 in Cell Invasion

The SPI-1 encodes the T3SS-1

Pathogenicity islands (PAIs) are genetic elements integrated into the core genome of bacteria, which confer a virulence phenotype on the bacteria that have acquired

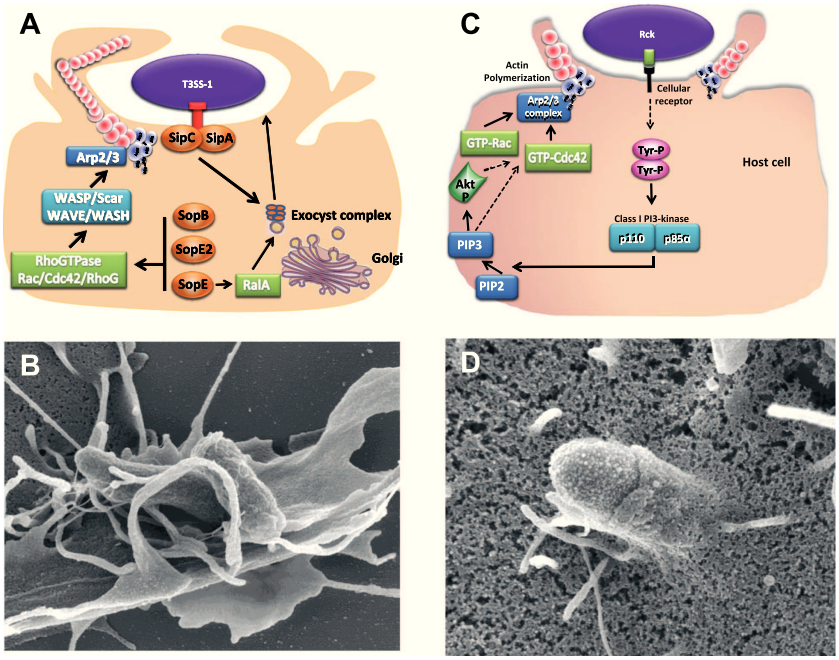


Figure 1. Trigger and Zipper mechanisms used by *Salmonella* to enter cells. (A) Schematic representation of the Trigger mechanism: Using a type III secretion system (T3SS), *Salmonella* bacterial effectors (SipA, SipC, SopB, SopE, SopE2) are directly injected into eukaryotic cells. SopE, SopE2, and SopB activate the RhoGTPases Rac/Cdc42/RhoG to allow actin cytoskeleton remodeling via cellular proteins, such as WASP/Scar/WAVE/WASH, which activate the Arp2/3 complex. In contrast, SipA and SipC bind directly to actin. To induce the formation of membrane ruffles and internalization, the recruitment of the exocyst complex is required and is manipulated by SipC and by SopE via the Ras-related protein RalA. (B) Scanning electron microscopy of *Salmonella* entering into cells via a Trigger mechanism, which is characterized by the apparition of large membrane ruffles at the bacterial entry site. (C) Schematic representation of the Zipper mechanism: the Rck invasin expressed on *Salmonella* outer membrane interacts with its receptor on the host cell membrane, leading to phosphorylation of at least one tyrosine kinase. Activation of the class I PI 3-kinase induces PI (3,4,5)P3 formation, participating to Akt activation. The activation of the GTPase Rac1, downstream of the Akt/PI 3-kinase activation, and the GTPase Cdc42 trigger actin polymerization via the Arp2/3 nucleator complex. The mechanism controlling Cdc42 during Rck-induced signaling pathway is still unknown. Dotted arrows represent possible signaling events and/or interactions. (D) Scanning electron microscopy of *Salmonella* entering into cells via a Zipper mechanism, which is characterized by weak membrane rearrangements.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

them (Groisman and Ochman 1996; Shames et al. 2009). Currently, 21 different *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs) have been identified in *Salmonella* (Blondel et al. 2009). However, many of the identified PAI-encoded genes have only predicted putative functions with no clear role in *Salmonella* pathogenesis (Blondel et al. 2010). The SPI-1 locus is a 40-kb chromosomal island, which carries among others all the genes required for the biosynthesis of a functional T3SS apparatus, a number of effector proteins and their chaperones, and some regulatory proteins (Galan and Curtiss 1989; Galan and Collmer 1999). A T3SS is a multi-subunit protein complex capable of injecting effectors directly from bacterial cytoplasm into the host cell cytosol. These effectors modulate cellular processes to the benefit of the pathogen. The T3SS consists of a needle complex and an export apparatus allowing the secreted proteins to pass through the bacterial inner and outer membranes, and of a translocon which creates a pore in the host cell membrane. The T3SS-1, encoded by SPI-1, is among the best characterized of all *Salmonella* virulence factors and triggers entry of *Salmonella* in a wide range of eukaryotic cells.

Of all SPIs reported in *Salmonella* only SPI-1, SPI-4, and SPI-9 are present in both *Salmonella bongori* and *S. enterica* species suggesting that they were acquired by *Salmonella* at the beginning of the evolution of *Salmonella* and prior to speciation. Moreover, 10 of the 15 known T3SS-1 translocated effectors are almost entirely conserved in *S. enterica* and *S. bongori.* Genes encoding effectors are even found at the same genomic loci in *S. bongori* as they are in *S. enterica*, that is, carried on SPI-1 itself or on SPI-5 or at identical sites in the chromosomal backbone (Fookes et al. 2011). The use of microarrays to identify the virulence gene profiles in 24 *Salmonella* strains of different serotypes from food and/or food animal environment showed that nearly 58% of the virulence-associated genes tested were present in all *Salmonella* strains tested. In general, genes belonging to *inv, prg, sic, sip*, or *spa* families were detected in more than 90% of the isolates, whereas the *iacP, avrA, invH, sopB*, or *sopE* genes were detected in 40–80% of the isolates (Zou et al. 2011). Moreover, an epidemiological analysis suggested that *sopE,* which is encoded by a temperate bacteriophage, appears to be associated with epidemic strains (Hopkins and Threlfall 2004), whereas *sopE2* is present in all *Salmonella* strains tested (Bakshi et al. 2000).

Role of T3SS-1 in cell invasion

Inside the host, after entering the lumen of the small intestine, *Salmonella* sense the environment (pH, oxygen tension, osmolarity, etc.), enabling T3SS-1 genes to be expressed and subsequently the secretion apparatus to be assembled at the bacterial membrane (Galan and Collmer 1999; Rosselin et al. 2012). Host cell invasion is initiated by pathogen binding to the host cell surface, which activates the insertion of the translocon into the host cell membrane through its affinity for cholesterol (Hayward et al. 2005). This bacteria-cell contact allows translocation of effectors into the host cell. This translocation is precisely coordinated ensuring that bacterial proteins engage in a coherent order through a cytoplasmic sorting platform, which ensures secretion of the translocases (SipB, SipC, and SipD) before the effectors. The sequential loading on this platform may be facilitated by the different affinities of the T3SS-chaperones, ensuring the hierarchy in type III effector secretion (Lara-Tejero et al. 2011). Cell entry is characterized by profuse rearrangements of the actin cytoskeleton at the site of bacteria–host-cell contact, which envelop external bacteria and internalize them into membrane-bound vacuoles. Currently, it seems difficult to know whether the entry process mediated by the T3SS-1 is the same for all cell types (phagocytic and nonphagocytic cells), mainly because no experiment has been designed to compare the entry processes between cell lines. Only one experiment was performed to compare the transcriptome of a *S.* Typhimurium strain within a phagocytic and a nonphagocytic cell line (Hautefort et al. 2008). This study especially showed that SPI-1- and flagella-related genes were expressed inside epithelial cells at later stages of the infection than in macrophage-like cells. At least 15 effectors can be translocated into the host cell by T3SS-1 to induce bacterial entry (reviewed in McGhie et al. 2009). Among them, five major *Salmonella* effectors, each being able to manipulate the cytoskeletal machinery within the host, are known to drive engulfment (SopE, SopE2, SopB, SipA, and SipC) (Fig. 1A).

SopE, SopE2, and SopB target the RhoGTPase switch and promote activation of the Rho family members Cdc42 and Rac, leading to activation of N-WASP- and Scar/WAVE-Arp2/Arp3 (Arp2/3) complexes which trigger actin remodeling. Despite their differing biochemical activities, these effectors have key redundant roles during internalization. Indeed, *Salmonella* strains lacking just one of these effectors display only a modest reduction in entry, whereas a triple Δ*sopE/E2/B* mutant is completely abrogated for cytoskeletal remodeling and entry (Zhou et al. 2001). SopE and SopE2 function as guanine exchange factors (GEFs) and directly catalyze GTPase activation. SopB is an inositol phosphatase that acts on host cell membrane phospholipids and thus functions indirectly by activating endogenous eukaryotic SH-3-containing GEF (SGEF), an exchange factor for the Rho-family GTPase: RhoG (Patel and Galan 2006). Recent data also showed that SopB constitutes an important regulator

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

of an additional entry pathway which activates RhoA, the Rho kinase, and myosin II leading to stress fiber formation and contractility (Hanisch et al. 2011).

SipA and SipC can engage actin directly controlling and localizing actin polymerization at bacterial attachment site. SipC possesses distinct C- and N-terminal domains which are able to nucleate filamentous actin (F-actin) and promote F-actin bundling (Myeni and Zhou 2010). Chang et al. (2005) demonstrated that the effector translocation function of SipC is dissociable from the actin-nucleating function. In vitro, SipA stimulates these SipC activities and can stabilize F-actin by directly antagonizing the action within the cell of depolymerizing factors (Zhou et al. 1999), such as ADF/cofilin and gelsolin (McGhie et al. 2004). However, recent single molecule imaging studies have questioned the latter finding (Popp et al. 2008). SipA also plays an important role in induction of invasion-competent membrane ruffles in synergy with the other major effectors (Perrett and Jepson 2009). Invasion efficiency is also increased by promoting localized membrane expansion directly through SipC-dependent recruitment of the exocyst and indirectly via SopE-dependent activation of RalA (Braun and Brumell 2010; Nichols and Casanova 2010). Nichols and Casanova (2010) have proposed a role for the exocyst in delivering vesicles to the site of bacterial entry to provide additional membranes to allow the extension and ruffling of the plasma membrane necessary to promote invasion.

The actin remodeling events initiated by these five major effectors which undergo profuse membrane ruffling after 10–30 min of contact are transient and typically reversed 2–3 h postentry to display a normal actin cytoskeleton, despite the presence of a large number of intracellular bacteria (Kubori and Galan 2003). Remarkably, *Salmonella* actively helps the host cell to regain its normal cellular architecture through the action of SptP, a SPI-1 effector with GAP activity that returns Cdc42 and Rac1 to the nonactivated state. The interplay between the bacterial effectors acting as GEFs and GAPs (SopE/SptP) is based on different half-lives of these proteins following translocation (Kubori and Galan 2003). SptP shows a higher resistance to the ubiquitin-proteasome system, and downregulates Cdc42 and Rac1 once SopE is degraded.

These effectors involved in T3SS-1-dependent entry also have profound effects on later processes, such as membrane trafficking, cell division, apoptosis, bacterial killing, cytokine and chemokine production, and antigen presentation (reviewed in Santos et al. 2009). It is noteworthy that several T3SS-1 effectors also mediate the disruption of tight junctions and thus impair intestinal barrier integrity (Boyle et al. 2006). After bacterial entry, SopB also plays a role in *Salmonella*-containing vacuole (SCV) biogenesis, sealing, and trafficking. Recently, it has been reported that ubiquitination downregulates SopB activity at the plasma membrane, but prolongs retention of SopB on the induced vesicles enriched in phosphoinositide (3)P (Knodler et al. 2009; Patel et al. 2009). The SCV initially acquires the early endosome markers, which are sequentially replaced by the late endosome and lysosome markers. However, the SCV does not fuse directly with the lysosomes, thereby avoiding *Salmonella* destruction, partly due to the phospho-inositide phosphatase activity of SopB (Rudge et al. 2004). By reducing the local concentration of PI(4,5)P2, SopB cooperates with SopD to destabilize cytoskeleton-plasma membrane interactions and to reduce membrane rigidity, promoting the fission and the sealing of the future SCV (Bakowski et al. 2007).

As infection progresses, *Salmonella* uses a second type III secretion system, the T3SS-2, encoded by the SPI-2 which delivers additional effector proteins through the SCV membrane allowing bacterial survival and replication (reviewed in Malik-Kale et al. 2011). Nevertheless, it has been demonstrated that SPI-1 T3SS effectors may be involved in vacuole biogenesis and intracellular survival, functions which were previously attributed solely to the actions of SPI-2 T3SS effectors (Steele-Mortimer et al. 2002).

Role of T3SS-1 in *Salmonella* Pathogenesis

Involvement of the T3SS-1 in host infection

Based on studies on the cellular and molecular mechanisms of *S.* Typhimurium infection, SPI-1 is considered to be essential for the invasion of animal cells by *Salmonella*, and SPI-2 is required for intracellular proliferation and survival. In vivo experiments have been performed in different animal species to investigate the role of SPI-1 T3SS during the course of *Salmonella* infection.

In a mouse model of systemic lethal infection, it was observed that *S.* Typhimurium mutants unable to assemble functional T3SS-1 were recovered from intestinal contents and systemic sites at a lower level than the wild-type strain after oral but not after intraperitoneal inoculation (Galan and Curtiss 1989). The T3SS-1 is also involved in a mouse model of *Salmonella*-induced colitis based on the pretreatment of animals with streptomycin. It was demonstrated that the SPI-1 effectors SipA, SopE, and SopE2, in addition to flagella and chemotaxis, were required to induce intestinal inflammation and significant histopathological changes (Hapfelmeier et al. 2004; Stecher et al. 2004).

Within minutes of injecting *Salmonella* into ligated ileal loops in calves, *Salmonella* can be seen to invade both M cells and enterocytes (Frost et al. 1997). This is in marked

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

contrast to what is seen in mice where the major portal of entry appears to be through M cells (Jones et al. 1994). Different in vivo studies have demonstrated that mutations in T3SS-1 decrease enterocyte invasion and abolish induction of fluid secretion and the recruitment of polymorphonuclear cells in bovine ligated ileal loops (Galyov et al. 1997).

Similarly, *S.* Typhimurium SPI-1 mutants are impaired in their ability to colonize the porcine gut in a ligated intestinal loop model (Boyen et al. 2006). The involvement of SPI-1 and not of other SPIs in proinflammatory signaling and heterophil infiltration in the intestine has also been demonstrated in chicks infected with *S.* Enteritidis (Rychlik et al. 2009). In this model, the role of SPI-1 and SPI-2 in the liver and spleen colonization has also been shown. Mutants lacking all the five major pathogenicity islands (SPI 1-5), but expressing only SPI-1 or SPI-2 have a medium virulence compared with the wild-type *S.* Enteritidis strain, whereas mutants bearing both SPI-1 and SPI-2 are almost as virulent as the wild-type strain (Rychlik et al. 2009). The role of SPI-1 T3SS has also been shown with *sipD* and *iacP* (invasion associated ACP) mutants which were unable to colonize spleens, whereas the wild-type *S.* Enteritidis strain could, three days postinfection in chickens infected subcutaneously (Parker and Guard-Petter 2001). However, numerous other data have shown that the role of the T3SS-1 is controversial in chicken and especially for the intestinal translocation (see the section "In vivo evidences for a non-essential role of T3SS-1").

Until recently, little was known about the infection mechanisms of *Salmonella* in the plant kingdom. Contaminated plants are nonetheless responsible for 25% of food poisoning outbreaks in the United States (Rangel et al. 2005). Generally, it was believed that *Salmonella* could survive on leaves. However, a growing body of evidence points to an active process in which *Salmonella* infects plant organs and uses them as a viable host or vector between animals (Golberg et al. 2011). This invasion process uses both SPI-1 and SPI-2-encoded apparatus because the proliferation rate in plant of *invA* and *prgH* (encoded by SPI-1) mutants and *ssaJ* and *ssaV* (encoded by SPI-2) mutants are lower than the wild-type *S.* Typhimurium strain (Schikora et al. 2011). Moreover, *Salmonella* actively suppresses plant defense mechanisms using the SPI-1 T3SS. Mutants defective in virulence factors induced, indeed, disease symptoms (tissue damage, oxidative burst, and pH changes) contrary to the wild-type *S.* Typhimurium strain (Schikora et al. 2011; Shirron and Yaron 2011). Involvement of the T3SS appears to depend on the *Salmonella* serotype, plant species, and even the cultivar. Barak et al. (2011) showed, for example, diverse resistant/susceptible phenotypes to *Salmonella* in different tomato cultivars.

In vivo evidences for a non-essential role of T3SS-1

Although numerous studies demonstrate a role of T3SS-1 in host infection, recent evidence from bovine, chicken, and murine models suggests that *S.* Typhimurium and other serotypes can also cause infection in a SPI-1-independent manner (Coombes et al. 2005; Hapfelmeier et al. 2005; Desin et al. 2009). For example, Morgan et al. (2004) concluded that *S.* Typhimurium uses different strategies to colonize calves and chicks. They observed that T3SS-1 and T3SS-2 are required for efficient colonization of cattle, whereas disruption of these secretion systems only caused a minor defect in *S.* Typhimurium colonization of chicks. The role of SPI-1 T3SS in chicken infection remains unclear. Desin et al. (2009) showed, for example, that a *S.* Enteritidis ΔSPI-1 mutant was not impaired in the caecal colonization of 1-week-old chicks, whereas the deletion of this region caused a delay in systemic infection. Similar results were observed by Rychlik et al. (2009), who showed that SPI-1 from *S.* Enteritidis was poorly involved in intestinal chick colonization, but was involved in internal organ colonization. Another argument for a nonessential role of the T3SS-1 in vivo was reported by Murray and Lee (2000) in a murine model of infection. They found that a *S.* Typhimurium strain, in which SPI-1 was entirely deleted, was recovered from spleens of infected mice at a frequency similar to that of its parental wild-type strain, indicating that *S.* Typhimurium did not require T3SS-1 genes to cross the intestinal epithelium and infect systemic tissues. Moreover, it has been reported that nonfunctional SPI-1 mutants, which render them severely deficient for invasion of polarized epithelial cells, retain their ability to invade M cells in a murine gut loop model, implying that intestinal invasion may involve other factors (Clark et al. 1996).

The large majority of the in vivo studies on T3SS-1 have been performed with broad host range serotypes (*S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis), and only a few analyses have involved host-specific serotypes. The translocation mechanism of typhoidal serotypes from the gut to other organs in farm animals, thus remains elusive. For *S.* Gallinarum, which induces a typhoid-like disease, the molecular and cellular mechanisms of fowl typhoid are relatively poorly understood, but the 85-kb *S.* Gallinarum plasmid has been shown to be essential for virulence, whereas a functional SPI-1 T3SS is not required. In addition, unidentified gene(s) under the control of ppGpp has (have) been shown to be involved in internalization (Jones et al. 2001; Jeong et al. 2008).

Overall, numerous articles have reported that *Salmonella* strains impaired in their capacities to use their T3SS-1 can

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

still colonize the intestinal tissue and induce different pathologies in different animals, whereas others demonstrate an in vivo role of this T3SS. Discrepancies that exist between studies could, in part, be due to the type of infection induced (systemic/enteric), the time analyzed postinoculation, the serotype used, the host resistance, and the immune status of the host. The differences could also be due to the mutant used. For example, Murray and Lee (2000) using a ΔSPI-1 mutant demonstrated that SPI-1 is not essential, but they also found that *S.* Typhimurium strains containing a mutation in *hilA* or *invG,* which are encoded by SPI-1, were recovered from the intestinal tissues and internal organs of mice at a lower frequency than their parental wild-type strain. One explanation for such results is that deletion of SPI-1 genes suppresses the *hilA* infection defect and allows *Salmonella* to colonize and infect their hosts in a SPI-1-independent manner (Murray and Lee 2000).

All these in vivo experimental studies support clinical observations. Indeed, some *Salmonella* Senftenberg and *Salmonella* Litchfield isolates carrying a deletion encompassing a vast segment of SPI-1 have been identified (Ginocchio et al. 1997), and some of them have been responsible for food-borne disease outbreaks, indicating that SPI-1 is not required for enteropathogenesis in humans (Hu et al. 2008; Li et al. 2011).

Existence of Other Entry Mechanisms

To infect different hosts, and cause various diseases ranging from typhoid fever to gastroenteritis or to an asymptomatic carrier state, *Salmonella* needs to cross several barriers. Crossing these barriers and multiplying within the host require invasion of a large variety of phagocytic and nonphagocytic cells. Research on the invasion mechanisms has until recently focused on SPI-1 and SPI-2 due to their key roles in entry and intracellular multiplication within different cell types, in particular enterocyte cell lines (Agbor and McCormick 2011). However, the role of outer membrane proteins (OMP) as possible adhesion molecules and virulence factors has been demonstrated in different pathogenic bacteria. In *Salmonella,* the association of OMP with host cells is known to trigger a variety of biological events that include induction of innate and adaptative immune response (Galdiero et al. 2003). More recently, some *Salmonella* OMP, namely Rck and PagN, have been shown to be able to induce cell invasion (Heffernan et al. 1994; Rosselin et al. 2010).

Role of the OMP Rck

Rck is a 19-kDa OMP encoded by the *rck* gene located on the large virulence plasmid which contributes to the expression of virulence genes like the *spvRABCD* (*Salmonella* plasmid virulence), *pef* (plasmid-encoded fimbriae), *srgA* (SdiA-regulated gene, putative disulphide bond oxidoreductase), or *mig-5* (macrophage-inducible gene coding for putative carbonic anhydrase) genes (Rychlik et al. 2006). Among the different serotypes harboring a virulence plasmid (i.e., Typhimurium, Enteritidis, Gallinarum, Pullorum, Dublin, Abortus-ovis, and Choleraesuis), only a few carries the *rck* gene (Buisan et al. 1994). It is highly conserved in most isolates of *S.* Enteritidis and *S.* Typhimurium (Futagawa-Saito et al. 2010), found in some isolates of *S.* Dublin, but was not detected on the virulence plasmid of *S.* Choleraesuis, *S.* Gallinarum, and *S.* Pullorum (Chu et al. 1999; Rychlik et al. 2006). This gene is therefore present in the serovars which are frequently associated with infections of both humans and farm animals, and which have the wider range of hosts.

This protein belongs to a family of five homologous OMP characterized in *Salmonella* (Rck and PagC), *Escherichia coli* (Lom), *Yersinia enterocolitica* (Ail), and *Enterobacter cloacae* (OmpX) (Heffernan et al. 1992). A role in complement resistance, cell attachment and invasion has been attributed to individual members of this family. Molecular analysis has shown that Rck is homologous to PagC and Ail with 53% and 42% identity, respectively, but both complement resistance and invasion phenotypes have been attributed to only Rck and Ail. However, these proteins do not exhibit homologous regions that could support this role (Heffernan et al. 1992).

Rck alone is able to promote adhesion and internalization of coated beads (Rosselin et al. 2010) or of noninvasive *E. coli* strains (Heffernan et al. 1994). Fourty-six amino acids of Rck were identified as being necessary and sufficient in this process. Their binding to the cell surface is inhibited by soluble Rck and induces discrete membrane rearrangements due to reprogramming of cell signaling (Rosselin et al. 2010). These findings demonstrate that Rck induces a Zipper-like entry mechanism supporting the fact that *Salmonella* is the first bacterium to be described as able to induce both Zipper and Trigger mechanisms for host cell invasion. This Zipper entry process requires protein tyrosine kinase activation and class I PI3 kinase, which activate Akt and the small GTPase Rac1 and Cdc42 (but not Rho), leading to activation of the Arp2/3 complex and actin polymerization (Mijouin et al. 2012). The cellular receptor of Rck required in this process, however, remains unknown.

In spite of the absence of Rck expression in usual laboratory culture conditions, its role in *Salmonella* invasion has been demonstrated in vitro after growing *Salmonella* in swarming culture conditions (Rosselin et al. 2010). However, its role in *Salmonella* pathogenesis is still poorly

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

understood. The fact that Rck expression is dependent on SdiA, a LuxR homolog which is a quorum sensing regulator, suggests an intestinal role of this invasin (Ahmer et al. 1998; Michael et al. 2001). However, *Salmonella* cannot synthesize the acyl homoserine lactones (AHL) that allow SdiA activation, but can detect AHL signaling molecules of other microbes using SdiA. Surprisingly, AHL have not been found in the intestinal tract of healthy mammals, with the exception of the bovine rumen (Erickson et al. 2002). SdiA from *Salmonella* could be activated in mice whose intestinal flora contained the AHL-producing *Yersinia enterocolitica* strain (Dyszel et al. 2010) or in turtle carrying *Aeromonas hydrophila* (Smith et al. 2008). After co-infection of mice with two *S.* Typhimurium strains engineered to produce AHL, a *sdiA* mutant and a *sdiA*$^+$ strain, it was shown that the constant activation of SdiA conferred a selective advantage to *Salmonella* (Dyszel et al. 2010). However, under physiological conditions, SdiA activation did not confer a fitness advantage for intestinal colonization, suggesting that even if SdiA activation is achieved, it is not always sufficient to induce the expression of the Rck regulon. This hypothesis is supported by the fact that *rck* is also regulated by an unidentified SdiA-independent system (Smith and Ahmer 2003). Moreover, in relation to its role in resistance to the complement-dependent bactericidal action, it is conceivable that Rck also plays a role in systemic infection.

Role of the OMP PagN

PagN is a 26-kDa OMP, which displays similarities with the Hek and Tia adhesins/invasins of pathogenic *E. coli*. *pagN* is widely conserved in the *Salmonella* genus. All the subspecies of *S. enterica* and two strains of *S. bongori* represented in the *Salmonella* reference collection C (SARC) carry the *pagN* gene (Boyd et al. 1996). This gene was originally identified in a Tn*phoA* random-mutagenesis screen of *phoP*-activated *S.* Typhimurium genes (Belden and Miller 1994) and through the use of in vivo expression technology performed in BALB/c mice (Heithoff et al. 1997). These studies showed that *pagN* is a PhoP-activated gene and thus is not expressed in *S.* Typhimurium strains grown under typical laboratory culture conditions, but is maximally expressed intracellularly as observed using gene fusion (Conner et al. 1998) or microarray analysis (Eriksson et al. 2003). The function of PagN as an invasin is supported by the fact that PagN over-expressed in a noninvasive *E. coli* strain induced cell invasion (Lambert and Smith 2008). However, PagN-defective bacteria displayed a consistent two- to fivefold reduction in cell invasion when compared to the wild-type strain only after overnight culture in pH 5.8 minimal media, suggesting that PagN is induced in the intracellular compartment. To correlate the intracellular expression pattern of PagN to its role as an invasin, Lambert and Smith (2008) postulated that *Salmonella* exiting from epithelial cells or macrophages might have an optimal level of PagN expression. Thus, PagN might facilitate interactions between *Salmonella* and mammalian cells in specific conditions that do not allow SPI-1 expression (Lambert and Smith 2008). This hypothesis is supported by the low T3SS-1 expression detected inside macrophages at 4 h postinfection (Eriksson et al. 2003) but not by the more recent data showing that SPI-1 genes remained expressed or were even upregulated few hours after invasion into different cell types (Drecktrah et al. 2005; Hautefort et al. 2008).

The PagN protein interacts with cell surface heparin sulfate proteoglycans to invade the mammalian cell line CHO-K1 (Lambert and Smith 2009). However, because proteoglycans cannot transduce a signaling cascade, they might act as co-receptors for invasion and not as the receptor per se. More studies are necessary to identify the PagN receptor at the molecular level.

Role of the hemolysin HlyE

HlyE is a pore-forming hemolysin that is encoded by SPI-18, a small 2.3 kb genomic island missing in *S.* Typhimurium, but present in *S.* Typhi and *S.* Paratyphi A. HlyE shares more than 90% identity with the 34 kDa *E. coli* HlyE (ClyA) hemolysin. *S.* Typhi hlyE mutants are impaired in their ability to invade HEp-2 cells, compared with their wild-type parental strain. Moreover, the heterologous expression of HlyE in *S.* Typhimurium improves the colonization of deep organs in mice, demonstrating that HlyE is a new virulence determinant (Fuentes et al. 2008). This result is consistent with those from other laboratories showing that pore-forming hemolysins play critical roles in invasion of eukaryotic cells (Strauss et al. 1997; Doran et al. 2002). However, the precise mechanism by which hemolysins enhance invasion of intracellular pathogens remains unknown. It is possible that these hemolysins are invasins, but they could also modulate the entry of bacteria by inducing changes in calcium flux as described for *Listeria monocytogenes* (Dramsi and Cossart 2003).

Existence of unknown factors involved in *Salmonella* invasion

The different data mentioned above show that *Salmonella* has developed different strategies to invade cells. Currently, three invasion pathways have been described for the broad host range serotypes (T3SS-1, Rck, PagN). However, recent data have shown that other unknown

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

entry routes may be used depending on the serotype, the host and the cell-type considered.

Rosselin et al. (2011) have demonstrated that a *S.* Enteritidis strain which does not express Rck, PagN, and the T3SS-1 is still able to invade fibroblasts, epithelial, and endothelial cells significantly. The relative degree of the unknown entry processes depends on the cell type and the cell line. Among the cell types tested, 3T3 fibroblasts and MA104 kidney epithelial cells are the most permissive to these mechanisms, allowing one bacterium out of three (33% of the invasion) to enter independently of T3SS-1, PagN, and Rck. In contrast, nonpolarized HT29 human enterocytes are not prone to the unknown entry mechanisms, as less than 4% of the internalized bacteria invade cells in the absence of these known invasion processes. This heterogeneity in invasion profiles demonstrates a cell specificity of the T3SS-1, Rck, PagN-independent mechanisms. Other results reinforce the idea that nonidentified invasion factors are involved during the entry of *S.* Typhimurium. Indeed, Aiastui et al. (2010) and Sorge et al. (2011) have shown that nonidentified invasion factors are involved during entry of *S.* Typhimurium strains lacking the T3SS-1 into rat and mouse fibroblasts or into human brain microvascular endothelial cells. The entry mechanism used by *Salmonella* into immortalized human foreskin fibroblasts seems different from those described for Rck and PagN, as none of the GTPases tested (Rac1, Cdc42, RhoA, or RhoG) was essential for invasion of these cells (Aiastui et al. 2010). Moreover, the *Salmonella* SPI-1 T3SS is not required to invade intestinal cells grown in three dimensions as an *invA S.* Typhimurium mutant unable to express the T3SS-1, invades 3-D HT-29 cells at similar levels to the wild-type strain (Radtke et al. 2010). To our knowledge Rck and PagN are not expressed in bacterial culture conditions used in these studies; therefore, these results also highlight the fact that *Salmonella* possesses noncharacterized invasion factors.

Certain indications about the nature of the unknown invasion mechanisms have been obtained. Indeed, a *Salmonella* mutant expressing none of the known invasion factors displayed both local and massive actin accumulations, as well as discrete and intense membrane rearrangements. These observations obtained using different cell types show that invasion factors other than PagN, Rck, and the T3SS-1 apparatus are able to induce either a Zipper or a Trigger mechanism (Rosselin et al. 2011). Moreover, Zipper-like entry processes have been observed with fibroblast, epithelial, and endothelial cells (Aiastui et al. 2010; Rosselin et al. 2011; Sorge et al. 2011).

Overall and contrary to the prevailing theory, *Salmonella* can enter cells through a Zipper-like mechanism mediated by Rck and other unknown invasins, in addition to the Trigger mechanism mediated by its T3SS-1 apparatus and also other unknown determinants. These observations thus open new avenues for the identification of new invasion factors.

Possible invasion factors

The cell specificity and consequently the organs or hosts targeted by *Salmonella* serotypes could be determined by the cells targeted by the different entry processes, in particular, by the Zipper mechanisms which involve a cell receptor. However, in addition to these different entry processes, the role of adhesins in cell specificity and invasion should also be taken into account. Fimbriae and/or nonfimbrial adhesins may indeed mediate attachment to cell surfaces, and thus could mediate part of the cell specificity. Moreover, some "typical" adhesins in some species are known to be involved, in other species, in entry in professional phagocytes or in nonprofessional phagocytes. This has been clearly described for *E. coli* where FimH mediates not only bacterial adherence but also invasion of numerous epithelial cells (Martinez et al. 2000).

Depending on the serotype, *Salmonella* can express a wide range of adhesion factors. *Salmonella* gene clusters encode more than 13 different fimbrial adhesins, such as Fim (type I fimbriae), Lpf (long polar fimbriae), Tafi (thin aggregative fimbriae, formerly SEF17), or the type IV pili of serotype Typhi (reviewed in Wagner and Hensel 2011). In addition, auto-transporter adhesins, such as ShdA, MisL, SadA, the type I secreted large repetitive adhesins SiiE, and BapA have been identified. Although the functions of various adhesins are not well understood, different studies have shown how they act in concert with other virulence determinants. For example, type 1 fimbrial adhesin FimH mediates binding to epithelial cells and it also helps to induce actin-dependent uptake in the absence of T3SS-1 in murine dendritic (Guo et al. 2007) or HeLa cells (Horiuchi et al. 1992; Lara-Tejero and Galan 2009). Similarly, Hensel's group has shown that SiiE mediates intimate contact of *Salmonella* with polarized cell surface allowing entry through the T3SS-1 (Gerlach et al. 2008). Mutant strains lacking SiiE fail to invade polarized cells. This giant nonfimbrial adhesin SiiE is secreted by a T1SS both encoded by the SPI-4. SPI-4 seems to be involved in calves but not in chickens or pigs challenged with *S.* Typhimurium (Morgan et al. 2004, 2007). The role of SPI-4 in virulence has also been demonstrated in mice following the oral challenge of BALB/c mice but not following the intraperitoneal infection of Nramp^r mice (Morgan et al. 2004; Lawley et al. 2006).

These adhesion factors could also be involved in cell specificity. To invade epithelial cells, *Salmonella* first binds to the cell surface. For instance, it is well known that

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

some fimbrial adhesins play a role in targeting in vivo *S.* Typhimurium to a particular cell lineage in the host. For example, in an intestinal-organ culture model, the *pef* fimbrial operon mediates attachment to the murine villous small intestine, whereas selective adhesion of *S.* Typhimurium to murine ileal Peyer's patches is mediated by the *lpf* fimbrial operon. Similarly, MisL and ShdA are outer membrane fibronectin-binding proteins that are expressed in the intestine and could be involved in carrier state in mice (Kingsley et al. 2002; Dorsey et al. 2005). This synergy between adhesion and entry has been described for fimbriae and T3SS-1-independent internalization (Guo et al. 2007) and also for adhesins and T3SS-1 (Gerlach et al. 2008; Lara-Tejero and Galan 2009; Misselwitz et al. 2011).

The ability of some bacteria to invade human intestinal epithelial cells is also linked to outer membrane vesicles (OMV). It has been suggested that OMV carry effector proteins into the host cell resulting in the uptake of bacteria. In support of this hypothesis, purified *Treponema denticola* vesicles have been shown to harbor the chymotrypsin-like protease, dentilisin (PrtP), a protease that allows *T. denticola* to penetrate the epithelial barrier and Hep2 cells (Chi et al. 2003). In addition, a nonadherent-invasive *E. coli* mutant was discovered to have a defect in OMV formation (Rolhion et al. 2005). Recently, Kitagawa et al. (2010) have demonstrated that the OMP PagC is a major constituent of *Salmonella* OMV. However, until now, there has been no evidence of the role of these OMV in cell invasion by *Salmonella* because they could also function as a delivery system for virulence-related proteins from the SCV to the cytoplasm of macrophage cells (Kitagawa et al. 2010).

The T6SS represents a new paradigm of protein secretion that is crucial for the pathogenesis of many gram-negative bacteria. T6SS has been linked to a wide variety of functions ranging from inter-bacterial relationships, biofilm formation, cytotoxicity, survival in phagocytic cells, and also host cell invasion (Schwarz et al. 2010). Bioinformatic studies in different *S. enterica* serotypes have revealed four gene clusters encoding T6SS, acquired by independent lateral transfer events. These T6SS loci are located in different genomic islands: SPI-6, SPI-19, SPI-20, and SPI-21. The T6SS encoded in the SPI-19 is present in at least four serotypes: Dublin, Agona, Gallinarum, and Enteritidis. Interestingly, whereas *S.* Gallinarum appears to encode a complete T6SS, *S.* Enteritidis has a degenerate genetic element lacking most of the T6SS-related components (Blondel et al. 2009). SPI-19 contributes to the efficient colonization of the intestinal tract and systemic sites in chicks infected by *S.* Gallinarum strain 287/91 (Blondel et al. 2010). However, the transfer of a complete T6SS locus from *S.* Gallinarum to *S.* Enteritidis impaired the ability of this bacterium to efficiently colonize chicken tissues. The T6SS associated with SPI-6, formerly known as the *S. enterica* centisome seven islands (Sci), is present in at least 16 serotypes including Typhimurium and Typhi. Complete deletion of the Sci genomic island resulted in a decreased ability of *S.* Typhimurium to enter host cells (Folkesson et al. 2002). Similarly, increased levels of a dominant negative variant of *S.* Typhimurium ClpV strongly reduced the ability of this bacterium to invade epithelial cells (Schlieker et al. 2005). These results differ from the data obtained with a *sciS* (*icmF*-like) transposon mutant (Parsons and Heffron 2005). In that case, SciS limited intracellular growth in macrophages at late stages of infection, and attenuated the lethality of *S.* Typhimurium in a murine host. However, it is difficult to compare these studies due to the cell lines used (epithelial vs. macrophage). The function and characteristics of the T6SS are far from being understood, but this secretion system appears as a novel key player in bacterial pathogenesis and bacteria–host interaction.

In contrast, some bacterial invasion factors remain unidentified, whereas their cell receptors have been identified. Pier et al. found that human epithelial cells expressing wild-type CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) are significantly more infected by *S.* Typhi than cells expressing ΔF508 *Cftr*. Moreover, a 15-amino-acid peptide derived from the first CFTR extracellular domain inhibited *S.* Typhi invasion of T84 cells, whereas a scrambled synthetic peptide of these residues did not. These results indicate that CFTR is a major epithelial-cell receptor for *S.* Typhi internalization (Pier et al. 1998). In line with in vitro results, translocation of *S.* Typhi into the intestinal submucosa of ΔF508 *Cftr* heterozygotes was 86% less effective than in wild-type mice, and in homozygotes it was almost completely abrogated. In contrast, there was no significant difference between wild-type, heterozygous, or homozygous ΔF508 *Cftr* mice in intestinal barrier translocation of *S.* Typhimurium, demonstrating the specificity of the CFTR receptor for *S.* Typhi internalization (Pier et al. 1998).

Conclusion

The precise traits associated with the zoonotic and epidemic potential of *Salmonella* strains remain unknown. This is particularly true with the recent identification of human clinical cases associated with SPI-1 deficient *Salmonella* strains indicating that SPI-1 T3SS is not required to cause entero-pathogenesis (Hu et al. 2008; Li et al. 2011). Identification of such traits is vital to assess the risk posed to humans by *S. enterica* strains found in animals or plants and for effective targeting of intervention

 © 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

strategies. Moreover, the reasons why some *Salmonella* serotypes are confined to the intestines while others translocate to internal organs remain unclear. A common feature of pathogens associated with enteric fevers is their use of different strategies to evade detection or subvert host innate immunity. Until recently, it was accepted that *Salmonella* entered cells only via its T3SS-1. However, new evidence has shown that *Salmonella* is able to use other pathways to enter phagocytic and nonphagocytic cells. Moreover, these T3SS-1-independent processes could mediate several Trigger and Zipper entry processes. We can thus speculate that these different entry mechanisms are efficient for particular cell types or species and could thus be involved in particular diseases induced by the different *Salmonella* serotypes. The coexistence of several invasion processes also raises the interesting possibility that synergy might exist between these different bacterial entry proteins or between the two invasion pathways (Zipper vs. Trigger) used by this pathogen. We can hypothesize that the receptor-ligand interaction mediated by the Zipper mechanism improves bacteria-cell contact and starts a process which facilitates the injection and the effects of bacterial effectors injected via the Trigger mechanism.

Several studies performed in different models suggest that the T3SS-1-independent entry processes might enhance bacterial entry into some cell lines or cell types of one or several species. They could also mediate invasion into polarized epithelial cells. Thus, particular invasins or entry processes may contribute to the invasion of specific host cells, and be involved in cell and tissue tropism as well as host specificity in both animals and plants. However, the number of identified adhesins or invasins which are only expressed in vivo is continually increasing, thus making it difficult to unravel the function of these new virulence factors. The use of more sophisticated in vivo studies, such as noninvasive in vivo imaging methods should help to understand the role of the entry factors in the interplay between bacteria and their hosts.

The new paradigm presented here stating that *Salmonella* strains are able to enter nonphagocytic cells by various routes should modify our view of the mechanisms that lead to the different *Salmonella*-induced diseases and should encourage us to revisit the host specificity bases. Future studies will undoubtedly focus on whether cell entry mechanisms are different according to the host and the serotype, and whether there is a link between host specificity, cell tropism, cell entry mechanism, cell response, and disease outcomes.

Acknowledgments

We apologize to all whose work could not be cited because of space limitations. Work on the new invasion routes has been funded by the Région Centre. N. Abed holds a Post-Doctoral fellowship funded and performed within the "SAVIRE" project, funded by the Délégation Régionale à la Recherche et à la Technologie du Centre (FEDER) number 1634-32245 and by the Région Centre number 2008-00036085. F. Namdari holds a Doctoral fellowship funded by the Région Centre. A. Rossignol holds a Doctoral fellowship funded by the Région Centre and the Institut National de la Recherche Agronomique. Z. Boumart holds a Doctoral fellowship funded by the Institut National de la Recherche Agronomique and the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Conflict of Interest

All authors certify that they have no commercial associations (e.g., consultancies, stock ownership, equity interests, patent license arrangement, etc.) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted article.

References

Agbor, T. A., and B. A. McCormick. 2011. *Salmonella* effectors: important players modulating host cell function during infection. Cell Microbiol. 13:1858–1869.

Ahmer, B. M. M., J. Vanreeuwijk, C. D. Timmers, P. J. Valentine, and F. Heffron. 1998. *Salmonella* Typhimurium encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the luxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. J. Bacteriol. 180:1185–1193.

Aiastui, A., M. G. Pucciarelli, and F. Garcia-del Portillo. 2010. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. Infect. Immun. 78:2700–2713.

Bakowski, M. A., J. T. Cirulis, N. F. Brown, B. B. Finlay, and J. H. Brumell. 2007. SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. Cell Microbiol. 9:2839–2855.

Bakshi, C. S., V. P. Singh, M. W. Wood, P. W. Jones, T. S. Wallis, and E. E. Galyov. 2000. Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. J. Bacteriol. 182:2341–2344.

Barak, J. D., L. C. Kramer, and L. Y. Hao. 2011. Colonization of tomato plants by *Salmonella enterica* is cultivar dependent, and type 1 trichomes are preferred colonization sites. Appl. Environ. Microbiol. 77:498–504.

Belden, W. J., and S. I. Miller. 1994. Further characterization of the phoP regulon: identification of new phoP-activated virulence loci. Infect. Immun. 62:5095–5101.

Blondel, C. J., J. C. Jimenez, I. Contreras, and C. A. Santiviago. 2009. Comparative genomic analysis uncovers 3

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. BMC Genomics 10:354.

Blondel, C. J., H. J. Yang, B. Castro, S. Chiang, C. S. Toro, M. Zaldivar, et al. 2010. Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by *Salmonella enterica* serotypes Gallinarum and Enteritidis. PLoS ONE 5:e11724.

Boyd, E. F., F. S. Wang, T. S. Whittam, and R. K. Selander. 1996. Molecular genetic relationships of the *Salmonellae*. Appl. Environ. Microbiol. 62:804–808.

Boyen, F., F. Pasmans, F. Van Immerseel, E. Morgan, C. Adriaensen, J. P. Hernalsteens, et al. 2006. *Salmonella* Typhimurium SPI-1 genes promote intestinal but not tonsillar colonization in pigs. Microbes Infect. 8:2899–2907.

Boyle, E. C., N. F. Brown, and B. B. Finlay. 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. Cell Microbiol. 8:1946–1957.

Braun, V., and J. H. Brumell. 2010. Bacterial invasion: entry through the exocyst door. Curr. Biol. 20:R677–R679.

Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan. 2000. *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol. 38:2465–2467.

Buisan, M., J. M. Rodriguez-Pena, and R. Rotger. 1994. Restriction map of the *Salmonella* Enteritidis virulence plasmid and its homology with the plasmid of *Salmonella* Typhimurium. Microb. Pathog. 16:165–169.

Calenge, F., F. Lecerf, J. Demars, K. Feve, F. Vignoles, F. Pitel, et al. 2009. QTL for resistance to *Salmonella* carrier state confirmed in both experimental and commercial chicken lines. Anim. Genet. 40:590–597.

Calenge, F., P. Kaiser, A. Vignal, and C. Beaumont. 2010. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. Genet. Sel. Evol. 42:11.

Chang, J., J. Chen, and D. Zhou. 2005. Delineation and characterization of the actin nucleation and effector translocation activities of *Salmonella* SipC. Mol. Microbiol. 55:1379–1389.

Chi, B., M. Qi, and H. K. Kuramitsu. 2003. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. Res. Microbiol. 154:637–643.

Chiu, C. H., L. H. Su, and C. Chu. 2004. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. Clin. Microbiol. Rev. 17:311–322.

Chu, C. S., S. F. Hong, C. J. Tsai, W. S. Lin, T. P. Liu, and J. T. Ou. 1999. Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis, and Dublin. Infect. Immun. 67:2611–2614.

Clark, M. A., M. A. Jepson, N. L. Simmons, and B. H. Hirst. 1994. Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse peyer's patch m cells. Res. Microbiol. 145: 543–552.

Clark, M. A., K. A. Reed, J. Lodge, J. Stephen, B. H. Hirst, and M. A. Jepson. 1996. Invasion of murine intestinal M cells by *Salmonella typhimurium inv* mutants severely deficient for invasion of cultured cells. Infect. Immun. 64:4363–4368.

Conner, C. P., D. M. Heithoff, S. M. Julio, R. L. Sinsheimer, and M. J. Mahan. 1998. Differential patterns of acquired virulence genes distinguish *Salmonella* strains. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95:4641–4645.

Coombes, B. K., B. A. Coburn, A. A. Potter, S. Gomis, K. Mirakhur, Y. Li, et al. 2005. Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. Infect. Immun. 73:7161–7169.

Desin, T. S., P. K. Lam, B. Koch, C. Mickael, E. Berberov, A. L. Wisner, et al. 2009. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island 1 is not essential for but facilitates rapid systemic spread in chickens. Infect. Immun. 77: 2866–2875.

Doran, K. S., J. C. Chang, V. M. Benoit, L. Eckmann, and V. Nizet. 2002. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. J. Infect. Dis. 185:196–203.

Dorsey, C. W., M. C. Laarakker, A. D. Humphries, E. H. Weening, and A. J. Baumler. 2005. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. Mol. Microbiol. 57:196–211.

Dramsi, S., and P. Cossart. 2003. Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line. Infect. Immun. 71:3614–3618.

Drecktrah, D., L. A. Knodler, K. Galbraith, and O. Steele-Mortimer. 2005. The Salmonella SPI1 effector SopB stimulates nitric oxide production long after invasion. Cell Microbiol. 7:105–113.

Dyszel, J. L., J. N. Smith, D. E. Lucas, J. A. Soares, M. C. Swearingen, M. A. Vross, et al. 2010. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium can detect acyl homoserine lactone production by *Yersinia enterocolitica* in mice. J. Bacteriol. 192:29–37.

Erickson, D. L., V. L. Nsereko, D. P. Morgavi, L. B. Selinger, L. M. Rode, and K. A. Beauchemin. 2002. Evidence of quorum sensing in the rumen ecosystem: detection of N-acyl homoserine lactone autoinducers in ruminal contents. Can. J. Microbiol. 48:374–378.

Eriksson, S., S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, and J. C. Hinton. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. Mol. Microbiol. 47:103–118.

Folkesson, A., S. Lofdahl, and S. Normark. 2002. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. Res. Microbiol. 153:537–545.

 © 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Fookes, M., G. N. Schroeder, G. C. Langridge, C. J. Blondel, C. Mammina, T. R. Connor, et al. 2011. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the *Salmonellae*. PLoS Pathog. 7:e1002191.

Frost, A. J., A. P. Bland, and T. S. Wallis. 1997. The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. Vet. Pathol. 34:369–386.

Fuentes, J. A., N. Villagra, M. Castillo-Ruiz, and G. C. Mora. 2008. The *Salmonella* Typhi *hlyE* gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to *S. typhimurium* promotes deep organ infection in mice. Res. Microbiol. 159:279–287.

Futagawa-Saito, K., A. T. Okatani, N. Sakurai-Komada, W. Ba-Thein, and T. Fukuyasu. 2010. Epidemiological characteristics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from healthy pigs in Japan. J. Vet. Med. Sci. 72:61–66.

Galan, J. E., and A. Collmer. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science 284:1322–1328.

Galan, J. E., and R. Curtiss III. 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:6383–6387.

Galdiero, M., M. G. Pisciotta, E. Galdiero, and C. R. Carratelli. 2003. Porins and lipopolysaccharide from *Salmonella* Typhimurium regulate the expression of CD80 and CD86 molecules on B cells and macrophages but not CD28 and CD152 on T cells. Clin. Microbiol. Infect. 9:1104–1111.

Galyov, E. E., M. W. Wood, R. Rosqvist, P. B. Mullan, P. R. Watson, S. Hedges, et al. 1997. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. Mol. Microbiol. 25:903–912.

Gerlach, R. G., N. Claudio, M. Rohde, D. Jackel, C. Wagner, and M. Hensel. 2008. Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. Cell Microbiol. 10:2364–2376.

Ginocchio, C. C., K. Rahn, R. C. Clarke, and J. E. Galan. 1997. Naturally occurring deletions in the centisome 63 pathogenicity island of environmental isolates of *Salmonella* spp. Infect. Immun. 65:1267–1272.

Golberg, D., Y. Kroupitski, E. Belausov, R. Pinto, and S. Sela. 2011. *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. Int. J. Food Microbiol. 145:250–257.

Groisman, E. A., and H. Ochman. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell 87:791–794.

Guibourdenche, M., P. Roggentin, M. Mikoleit, P. I. Fields, J. Bockemuhl, P. A. Grimont, et al. 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res. Microbiol. 161:26–29.

Guo, A., M. A. Lasaro, J. C. Sirard, J. P. Kraehenbuhl, and D. M. Schifferli. 2007. Adhesin-dependent binding and uptake of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by dendritic cells. Microbiology 153:1059–1069.

Hanisch, J., R. Kolm, M. Wozniczka, D. Bumann, K. Rottner, and T. E. Stradal. 2011. Activation of a RhoA/myosin II-dependent but Arp2/3 complex-independent pathway facilitates *Salmonella* invasion. Cell Host Microbe 9:273–285.

Hapfelmeier, S., K. Ehrbar, B. Stecher, M. Barthel, M. Kremer, and W. D. Hardt. 2004. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. Infect. Immun. 72:795–809.

Hapfelmeier, S., B. Stecher, M. Barthel, M. Kremer, A. J. Muller, M. Heikenwalder, et al. 2005. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar Typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. J. Immunol. 174:1675–1685.

Hautefort, I., A. Thompson, S. Eriksson-Ygberg, M. L. Parker, S. Lucchini, V. Danino, et al. 2008. During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. Cell Microbiol. 10:958–984.

Hayward, R. D., R. J. Cain, E. J. McGhie, N. Phillips, M. J. Garner, and V. Koronakis. 2005. Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. Mol. Microbiol. 56:590–603.

Heffernan, E. J., J. Harwood, J. Fierer, and D. Guiney. 1992. The *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and ail. J. Bacteriol. 174:84–91.

Heffernan, E. J., L. Wu, J. Louie, S. Okamoto, J. Fierer, and D. G. Guiney. 1994. Specificity of the complement resistance and cell association phenotypes encoded by the outer membrane protein genes *rck* from *Salmonella* Typhimurium and *ail* from *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 62: 5183–5186.

Heithoff, D. M., C. P. Conner, P. C. Hanna, S. M. Julio, U. Hentschel, and M. J. Mahan. 1997. Bacterial infection as assessed by in vivo gene expression. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94:934–939.

Heithoff, D. M., W. R. Shimp, P. W. Lau, G. Badie, E. Y. Enioutina, R. A. Daynes, et al. 2008. Human *Salmonella* clinical isolates distinct from those of animal origin. Appl. Environ. Microbiol. 74:1757–1766.

Hopkins, K. L., and E. J. Threlfall. 2004. Frequency and polymorphism of *sopE* in isolates of *Salmonella enterica* belonging to the ten most prevalent serotypes in England and Wales. J. Med. Microbiol. 53:539–543.

Horiuchi, S., Y. Inagaki, N. Okamura, R. Nakaya, and N. Yamamoto. 1992. Type 1 pili enhance the invasion of

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Salmonella braenderup and *Salmonella typhimurium* to HeLa cells. Microbiol. Immunol. 36:593–602.

Hu, Q., B. Coburn, W. Deng, Y. Li, X. Shi, Q. Lan, et al. 2008. *Salmonella enterica* serovar Senftenberg human clinical isolates lacking SPI-1. J. Clin. Microbiol. 46:1330–1336.

Jeong, J. H., M. Song, S. I. Park, K. O. Cho, J. H. Rhee, and H. E. Choy. 2008. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells. J. Bacteriol. 190:6340–6350.

Jones, B. D., N. Ghori, and S. Falkow. 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the peyer's patches. J. Exp. Med. 180:15–23.

Jones, M. A., P. Wigley, K. L. Page, S. D. Hulme, and P. A. Barrow. 2001. *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. Infect. Immun. 69:5471–5476.

Kingsley, R. A., R. L. Santos, A. M. Keestra, L. G. Adams, and A. J. Baumler. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. Mol. Microbiol. 43:895–905.

Kitagawa, R., A. Takaya, M. Ohya, Y. Mizunoe, A. Takade, S. Yoshida, et al. 2010. Biogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium membrane vesicles provoked by induction of PagC. J. Bacteriol. 192:5645–5656.

Knodler, L. A., S. Winfree, D. Drecktrah, R. Ireland, and O. Steele-Mortimer. 2009. Ubiquitination of the bacterial inositol phosphatase, SopB, regulates its biological activity at the plasma membrane. Cell Microbiol. 11:1652–1670.

Kubori, T., and J. E. Galan. 2003. Temporal regulation of *Salmonella* virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. Cell 115:333–342.

Lambert, M. A., and S. G. Smith. 2008. The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. BMC Microbiol. 8:142.

Lambert, M. A., and S. G. Smith. 2009. The PagN protein mediates invasion via interaction with proteoglycan. FEMS Microbiol. Lett. 297:209–216.

Lara-Tejero, M., and J. E. Galan. 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. Infect. Immun. 77:2635–2642.

Lara-Tejero, M., J. Kato, S. Wagner, X. Liu, and J. E. Galan. 2011. A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. Science 331:1188–1191.

Lawley, T. D., K. Chan, L. J. Thompson, C. C. Kim, G. R. Govoni, and D. M. Monack. 2006. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. PLoS Pathog. 2:e11.

Li, Y. H., X. B. Xu, Q. H. Hu, X. L. Shi, Y. M. Lin, and Y. Q. Qiu. 2011. [Characteristics of Salmonella enterica serovar Senftenberg lacking Salmonella pathogenicity island 1]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 45:899–903.

Malik-Kale, P., C. E. Jolly, S. Lathrop, S. Winfree, C. Luterbach, and O. Steele-Mortimer. 2011. *Salmonella* – at home in the host cell. Front. Microbiol. 2:125.

Martinez, J. J., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. EMBO J. 19:2803–2812.

McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, et al. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature 413:852–856.

McGhie, E. J., R. D. Hayward, and V. Koronakis. 2004. Control of actin turnover by a *Salmonella* invasion protein. Mol. Cell 13:497–510.

McGhie, E. J., L. C. Brawn, P. J. Hume, D. Humphreys, and V. Koronakis. 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. Curr. Opin. Microbiol. 12:117–124.

Michael, B., J. N. Smith, S. Swift, F. Heffron, and B. M. Ahmer. 2001. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. J. Bacteriol. 183:5733–5742.

Mijouin, L., M. Rosselin, E. Bottreau, J. Pizarro-Cerda, P. Cossart, P. Velge, et al. 2012. *Salmonella* Enteritidis Rck-mediated invasion requires activation of Rac1, which is dependent on the class I PI 3-kinases-Akt signaling pathway. FASEB J. 26:1569–1581.

Misselwitz, B., S. K. Kreibich, S. Rout, B. Stecher, B. Periaswamy, and W. D. Hardt. 2011. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium binds to HeLa cells via Fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking. Infect. Immun. 79:330–341.

Morgan, E., J. D. Campbell, S. C. Rowe, J. Bispham, M. P. Stevens, A. J. Bowen, et al. 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol. Microbiol. 54:994–1010.

Morgan, E., A. J. Bowen, S. C. Carnell, T. S. Wallis, and M. P. Stevens. 2007. SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. Infect. Immun. 75:1524–1533.

Muller, A. J., P. Kaiser, K. E. Dittmar, T. C. Weber, S. Haueter, K. Endt, et al. 2012. *Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. Cell Host Microbe 11:19–32.

Murray, R. A., and C. A. Lee. 2000. Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that *salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. Infect. Immun. 68:5050–5055.

 © 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Myeni, S. K., and D. Zhou. 2010. The C terminus of SipC binds and bundles F-actin to promote *Salmonella* invasion. J. Biol. Chem. 285:13357–13363.

Nichols, C. D., and J. E. Casanova. 2010. *Salmonella*-directed recruitment of new membrane to invasion foci via the host exocyst complex. Curr. Biol. 20:1316–1320.

Nygard, K., J. Lassen, L. Vold, Y. Andersson, I. Fisher, S. Lofdahl, et al. 2008. Outbreak of *Salmonella* Thompson infections linked to imported rucola lettuce. Foodborne Pathog. Dis. 5:165–173.

Parker, C. T., and J. Guard-Petter. 2001. Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicks. FEMS Microbiol. Lett. 204:287–291.

Parsons, D. A., and F. Heffron. 2005. *sciS*, an *icmF* homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. Infect. Immun. 73:4338–4345.

Pascopella, L., B. Raupach, N. Ghori, D. Monack, S. Falkow, and P. L. Small. 1995. Host restriction phenotypes of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Gallinarum. Infect. Immun. 63:4329–4335.

Patel, J. C., and J. E. Galan. 2006. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. J. Cell Biol. 175:453–463.

Patel, J. C., K. Hueffer, T. T. Lam, and J. E. Galan. 2009. Diversification of a Salmonella virulence protein function by ubiquitin-dependent differential localization. Cell 137:283–294.

Paulin, S. M., P. R. Watson, A. R. Benmore, M. P. Stevens, P. W. Jones, B. Villarreal-Ramos, et al. 2002. Analysis of *Salmonella enterica* serotype-host specificity in calves: avirulence of *S. enterica* serotype Gallinarum correlates with bacterial dissemination from mesenteric lymph nodes and persistence in vivo. Infect. Immun. 70:6788–6797.

Perrett, C. A., and M. A. Jepson. 2009. Regulation of *Salmonella*-induced membrane ruffling by SipA differs in strains lacking other effectors. Cell Microbiol. 11:475–487.

Pezzoli, L., R. Elson, C. Little, I. Fisher, H. Yip, T. Peters, et al. 2007. International outbreak of *Salmonella* Senftenberg in 2007. Euro. Surveill. 12:E070614.3.

Pier, G. B., M. Grout, T. Zaidi, G. Meluleni, S. S. Mueschenborn, G. Banting, et al. 1998. *Salmonella* Typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. Nature 393:79–82.

Popp, D., A. Yamamoto, M. Iwasa, Y. Nitanai, and Y. Maeda. 2008. Single molecule polymerization, annealing and bundling dynamics of SipA induced actin filaments. Cell Motil. Cytoskelet. 65:165–177.

Pullinger, G. D., S. M. Paulin, B. Charleston, P. R. Watson, A. J. Bowen, F. Dziva, et al. 2007. Systemic translocation of *Salmonella enterica* serovar Dublin in cattle occurs predominantly via efferent lymphatics in a cell-free niche and requires type III secretion system 1 (T3SS-1) but not T3SS-2. Infect. Immun. 75:5191–5199.

Rabsch, W., H. L. Andrews, R. A. Kingsley, R. Prager, H. Tschape, L. G. Adams, et al. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. Infect. Immun. 70:2249–2255.

Radtke, A. L., J. W. Wilson, S. Sarker, and C. A. Nickerson. 2010. Analysis of interactions of *Salmonella* type three secretion mutants with 3-D intestinal epithelial cells. PLoS ONE 5:e15750.

Rangel, J. M., P. H. Sparling, C. Crowe, P. M. Griffin, and D. L. Swerdlow. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg. Infect. Dis. 11:603–609.

Rolhion, N., N. Barnich, L. Claret, and A. Darfeuille-Michaud. 2005. Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the yfgL gene deleted. J. Bacteriol. 187:2286–2296.

Rosselin, M., I. Virlogeux-Payant, C. Roy, E. Bottreau, P. Y. Sizaret, L. Mijouin, et al. 2010. Rck of *Salmonella enterica*, subspecies *enterica* serovar Enteritidis, mediates Zipper-like internalization. Cell Res. 20:647–664.

Rosselin, M., N. Abed, I. Virlogeux-Payant, E. Bottreau, P. Y. Sizaret, P. Velge, et al. 2011. Heterogeneity of type III secretion system (T3SS)-1-independent entry mechanisms used by *Salmonella* Enteritidis to invade different cell types. Microbiology 157:839–847.

Rosselin, M., N. Abed, F. Namdari, I. Virlogeux Payant, P. Velge, and A. Wiedemann. 2012. The different strategies used by *Salmonella* to invade host cells. Salmonella/Book2 ISBN 979-953-307-690-3. In Tech, Rijeka, Croatia.

Rudge, S. A., D. M. Anderson, and S. D. Emr. 2004. Vacuole size control: regulation of PtdIns(3,5)P2 levels by the vacuole-associated Vac14-Fig 4 complex, a PtdIns(3,5)P2-specific phosphatase. Mol. Biol. Cell 15:24–36.

Rychlik, I., D. Gregorova, and H. Hradecka. 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. Vet. Microbiol. 112:1–10.

Rychlik, I., D. Karasova, A. Sebkova, J. Volf, F. Sisak, H. Havlickova, et al. 2009. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. BMC Microbiol. 9:268.

Salcedo, S. P., M. Noursadeghi, J. Cohen, and D. W. Holden. 2001. Intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. Cell Microbiol. 3:587–597.

Santos, R. L., S. Zhang, R. M. Tsolis, R. A. Kingsley, L. G. Adams, and A. J. Baumler. 2001. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. Microbes Infect. 3:1335–1344.

Santos, R. L., M. Raffatellu, C. L. Bevins, L. G. Adams, C. Tukel, R. M. Tsolis, et al. 2009. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. Trends Microbiol. 17:498–506.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Schikora, A., I. Virlogeux-Payant, E. Bueso, A. V. Garcia, T. Nilau, A. Charrier, et al. 2011. Conservation of *Salmonella* infection mechanisms in plants and animals. PLoS ONE 6: e24112.

Schlieker, C., H. Zentgraf, P. Dersch, and A. Mogk. 2005. ClpV, a unique Hsp100/Clp member of pathogenic proteobacteria. Biol. Chem. 386:1115–1127.

Schwarz, S., T. E. West, F. Boyer, W. C. Chiang, M. A. Carl, R. D. Hood, et al. 2010. *Burkholderia* type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. PLoS Pathog. 6:e1001068.

Shames, S. R., S. D. Auweter, and B. B. Finlay. 2009. Co-evolution and exploitation of host cell signaling pathways by bacterial pathogens. Int. J. Biochem. Cell Biol. 41:380–389.

Shirron, N., and S. Yaron. 2011. Active suppression of early immune response in tobacco by the human pathogen *Salmonella* Typhimurium. PLoS ONE 6:e18855.

Shivaprasad, H. L. 2000. Fowl typhoid and pullorum disease. Rev. Sci. Tech. 19:405–424.

Smith, J. N., and B. M. Ahmer. 2003. Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. J. Bacteriol. 185:1357–1366.

Smith, J. N., J. L. Dyszel, J. A. Soares, C. D. Ellermeier, C. Altier, S. D. Lawhon, et al. 2008. SdiA, an N-acylhomoserine lactone receptor, becomes active during the transit of *Salmonella enterica* through the gastrointestinal tract of turtles. PLoS ONE 3:e2826.

van Sorge, N. M., P. A. Zialcita, S. H. Browne, D. Quach, D. G. Guiney, and K. S. Doran. 2011. Penetration and activation of brain endothelium by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Infect. Dis. 203:401–405.

Stecher, B., S. Hapfelmeier, C. Muller, M. Kremer, T. Stallmach, and W. D. Hardt. 2004. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. Infect. Immun. 72:4138–4150.

Steele-Mortimer, O., J. H. Brumell, L. A. Knodler, S. Meresse, A. Lopez, and B. B. Finlay. 2002. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. Cell Microbiol. 4:43–54.

Stevens, M. P., T. J. Humphrey, and D. J. Maskell. 2009. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 364:2709–2723.

Strauss, E. J., N. Ghori, and S. Falkow. 1997. An *Edwardsiella tarda* strain containing a mutation in a gene with homology to *shlB* and *hpmB* is defective for entry into epithelial cells in culture. Infect. Immun. 65:3924–3932.

Takeuchi, A. 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by Salmonella typhimurium. Am. J. Pathol. 50:109–136.

Uzzau, S., D. J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, et al. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. Epidemiol. Infect. 125:229–255.

Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. J. Baumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, et al. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. Nature 401:804–808.

Velge, P., A. Cloeckaert, and P. Barrow. 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet. Res. 36:267–288.

Wagner, C., and M. Hensel. 2011. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. Adv. Exp. Med. Biol. 715:17–34.

Zhou, D., M. S. Mooseker, and J. E. Galan. 1999. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein Sipa in bacterial internalization. Science 283:2092–2095.

Zhou, D., L. M. Chen, L. Hernandez, S. B. Shears, and J. E. Galan. 2001. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. Mol. Microbiol. 39:248–260.

Zou, W., S. F. Al-Khaldi, W. S. Branham, T. Han, J. C. Fuscoe, J. Han, et al. 2011. Microarray analysis of virulence gene profiles in *Salmonella* serovars from food/food animal environment. J. Infect. Dev. Ctries. 5:94–105.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

17

The Different Strategies Used by *Salmonella* to Invade Host Cells

Rosselin Manon, Abed Nadia, Namdari Fatémeh,
Virlogeux-Payant Isabelle, Velge Philippe and Wiedemann Agnès
INRA Centre de Tours, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, Nouzilly
IFR 136, Agents Transmissibles et Infectiologie, Nouzilly
France

1. Introduction

Salmonella enterica are members of a Gram-negative enteropathogenic bacteria family, which are able to infect a great diversity of hosts, including human. According to serotypes and hosts, *Salmonella enterica* cause a wide range of food- and water-borne diseases ranging from self-limiting gastroenteritis to systemic typhoid fever. Moreover, no other known bacterial pathogens belonging to a single species show such a remarkable variation in their host specificity. Ubiquitous serotypes such as Typhimurium and Enteritidis tend to produce acute but self-limiting enteritis in a wide range of hosts, whereas host-specific serotypes are associated with severe systemic disease in healthy outbred adults of a single species that may not involve diarrhoea (e.g. Gallinarum in poultry). Host-restricted serotypes are primarily associated with systemic disease in one host (e.g. Dublin in cattle, Choleraesuis in pigs), but may cause disease in a limited number of other species (Velge *et al.*, 2005).

For all these serotypes, the intestinal barrier crossing constitutes a crucial step for infection establishment. As shown in Figure 1, *Salmonella* can induce their own entry into enterocytes, but M cells and CD18-expressing phagocytes also facilitate their translocation through the intestinal epithelium (Watson & Holden, 2010). During gastroenteritis pathology, host colonization is restricted to the intestinal tract. However, *Salmonella* also have the ability to disseminate to extra-intestinal sites at least via CD18-expressing phagocytes, leading to deep organ colonization (Vazquez-Torres *et al.*, 1999).

Bacterial pathogens have developed two different mechanisms to invade non-phagocytic host cells by hijacking physiological cellular processes. Bacteria, such as *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis* express surface proteins that interact with receptor on the host cell plasma membrane. This interaction promotes an activation of host cell signaling pathways, leading to actin remodelling. This process is referred to as a Zipper mechanism and is characterized by the induction of little protrusive activity and thin membrane extensions (Figure 2A and C) (Cossart & Sansonetti, 2004). Other bacteria, such as *Shigella flexneri*, do not require a receptor but trigger internalization from "inside" via the action of pathogen-effector proteins delivered by specialized protein secretion systems (Schroeder & Hilbi, 2008). Translocated effector proteins effectively allow the bacteria to "hijack" many essential

intracellular processes and induce a massive reorganization of the host actin cytoskeleton, resulting in intense membrane ruffling and internalization of the bacteria. This invasion process is referred to as a Trigger mechanism (Figure 2B and D) (Cossart & Sansonetti, 2004).

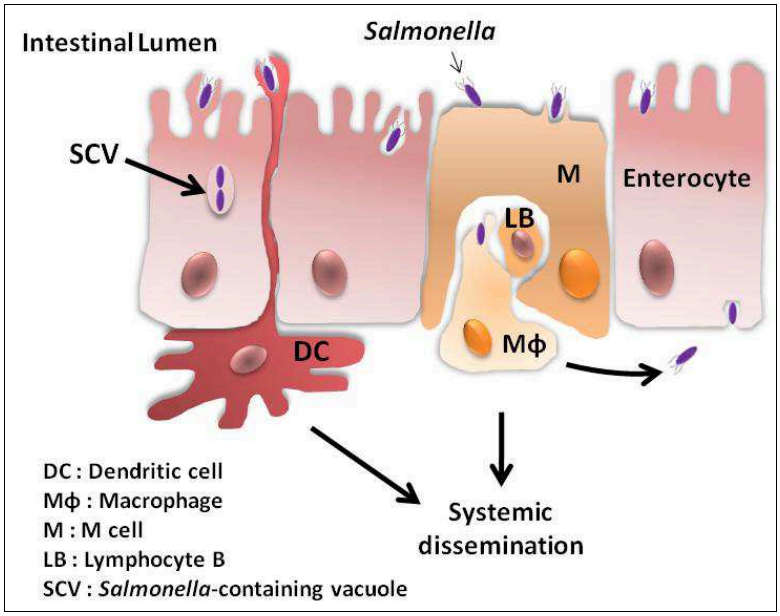


Fig. 1. Intestinal barrier crossing by *Salmonella enterica* through M cells, enterocytes or following a luminal capture by CD18+ phagocytes such as dendritic cells.

The reorganization of actin cytoskeleton at the entry site is a crucial step for Trigger and Zipper bacterial internalization. In eukaryotic cells, actin exists as a globular monomer (G-actin) which can assemble to form a filamentous structure (F-actin). In physiological conditions, actin polymerization requires different steps. First, nucleation of actin which consists in regrouping three actin monomers, is stimulated by cellular factors such as the Arp2/3 complex (Mullins *et al.*, 1998). Once nucleated, the addition of ATP-actin-monomers at the barbed extremity of the filaments allows actin elongation (Pollard *et al.*, 2000). The three-dimensional structure of actin filaments is ensured by capping proteins and other actin-binding proteins such as actinin, gelsolin, and villin that enable bundling of filaments (Bretscher, 1991; Hartwig & Kwiatkowski, 1991). Actin dynamics regulation is closely associated with small Rho guanosine triphosphatase protein (RhoGTPase) activity. RhoGTPases cycle between an inactive guanine di-phosphate (GDP)-bound form and an active guanine tri-phosphate (GTP)-bound form. The switch between inactive and active state is regulated by guanine exchange factors (GEF) which catalyze the exchange of GDP with GTP and GTPase activating proteins (GAP) which hydrolyze GTP into GDP to switch off their active state. When bound to GTP, Rho GTPases target and activate downstream effectors such as proteins from the Wiscott-Aldrich Syndrome protein (WASP) / N-WASP Family, leading to nucleator activation and actin reorganization. All these steps are required during bacterial internalization.

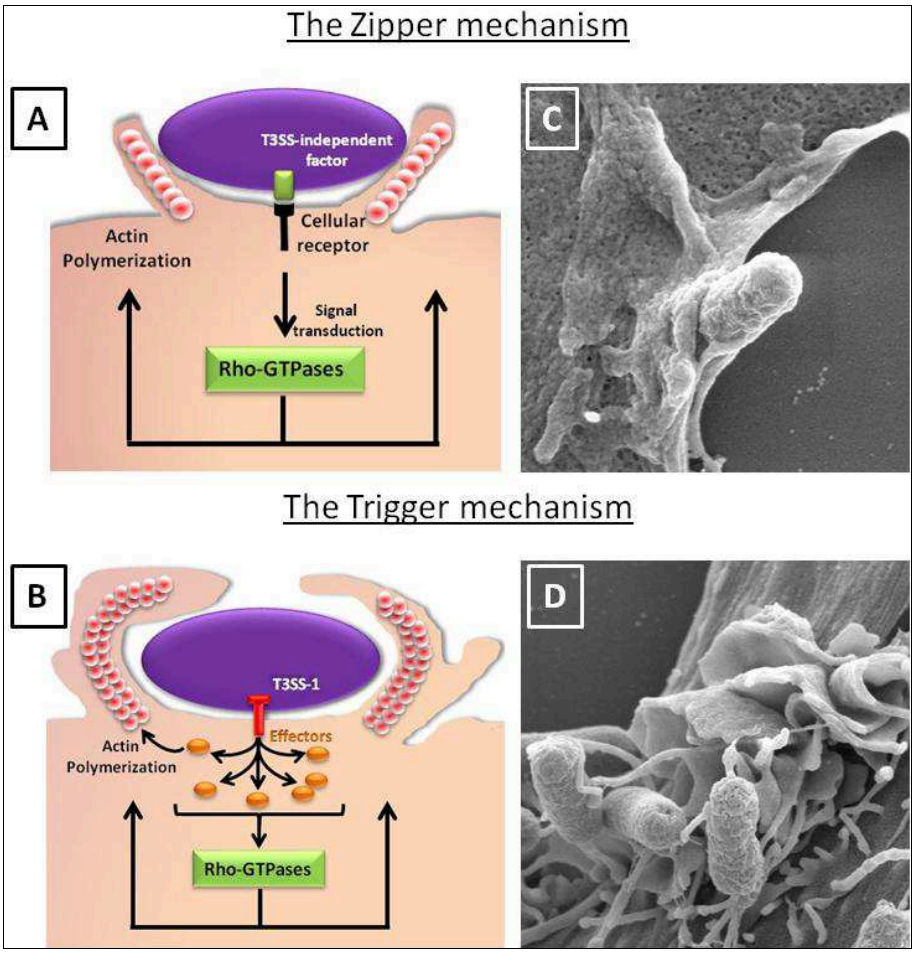


Fig. 2. Models of Zipper and Trigger invasion mechanisms. (A) The Zipper process is initiated by an interaction between a host cell receptor and a bacterial surface protein which allows the activation of RhoGTPases and actin polymerization at the entry site. (B) In contrast, during the Trigger mechanism, RhoGTPases are targeted by bacterial effectors which are directly translocated into host cell via a type–three secretion system, leading to actin polymerization and internalization. Electron scanning microscopy pictures show (C) *S.* Enteritidis invading fibroblasts via a Zipper process which is characterized by weak membrane rearrangements and (D) via a Trigger process which is characterized by intense membrane rearrangements.

The study of host cell invasion by *Salmonella* has been initiated in 1967 by Takeuchi (Takeuchi, 1967). For decades, it was described in the literature that *Salmonella* can enter cells only via a "Trigger" mechanism mediated by a type-three secretion system (T3SS-1) encoded by the *Salmonella* pathogenicity island-1 (SPI-1) (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). Recent data have showed that cell invasion could occur despite the absence of the T3SS-1

(Aiastui *et al.*, 2010; Radtke *et al.*, 2010; Rosselin *et al.*, 2011), indicating that the dominant paradigm postulating that a functional SPI-1/T3SS is absolutely required for cell entry, should be reconsidered. Moreover, the characterization of one T3SS-1-independent invasion pathway revealed that *Salmonella* have also the ability to enter cells via a Zipper process mediated by the Rck invasin (Rosselin *et al.*, 2011). Consequently *Salmonella* are the first bacteria found to be able to invade cells both via a Zipper and a Trigger mechanism.

Here, our current understanding of the different strategies used by *Salmonella* to invade host cells will be summarized and we will focus on how *Salmonella* are able to manipulate the host actin cytoskeleton, leading to discrete or intense membrane rearrangements. The gap of our knowledge about these different entry pathways will be discussed.

2. Invasion mechanism dependent on the T3SS-1

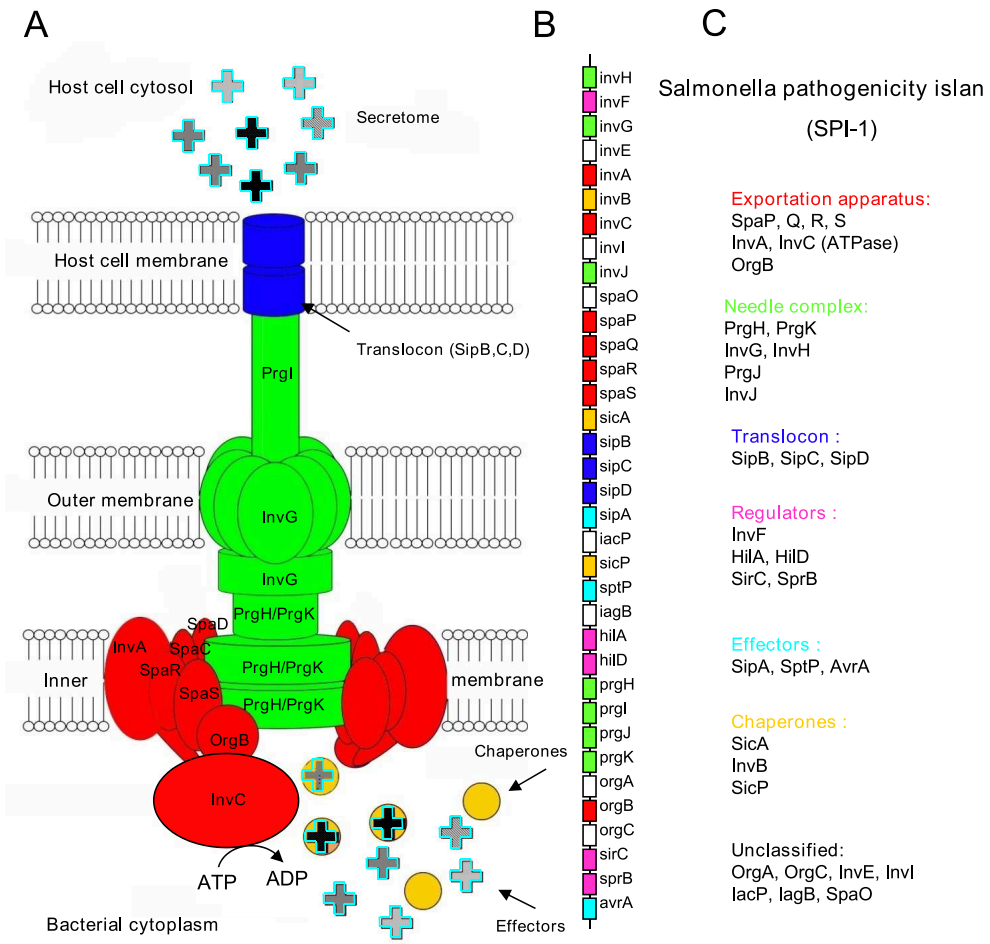
The Type-Three Secretion System (T3SS-1) is the best characterized invasion system of *Salmonella*. It allows bacterial internalization into non-phagocytic cells via a Trigger mechanism which induces massive actin rearrangements and intense membrane ruffling at the entry site (Cossart & Sansonetti, 2004). Under environmental conditions that enable the expression of the T3SS-1, the secretion apparatus is assembled at the bacterial surface and effectors are translocated into the eukaryotic cytosol following an interaction between the bacteria and the host cell (Garner *et al.*, 2002; Hayward *et al.*, 2005).

2.1 T3SS-1 structure

T3SSs are supramolecular complexes that play a major role in the virulence of many Gram-negative pathogens by injecting bacterial protein effectors directly into host cells in an energy-dependent (ATP) manner (Galan & Wolf-Watz, 2006). These complexes cross both inner and outer membranes of bacteria and are able to create a pore in eukaryotic membrane upon contact with a host cell. They are made of an exportation apparatus, a basal body, a needle and a translocon at the tip of the needle (Figure 3A). The structure of these T3SSs shows a high degree of conservation among pathogens (Tampakaki *et al.*, 2004) and the *Salmonella* T3SS-1 apparatus shares in particular a high homology with the T3SS of *Shigella*, also involved in host cell invasion (Groisman & Ochman, 1993).

The basal body of the T3SS anchors the complex into the bacterial inner and outer membranes (Figure 3A). It is composed of PrgH, PrgK and InvG proteins which assemble into an inner ring (PrgH and PrgK) and an outer ring (InvG) (Schraidt & Marlovits, 2011). Anchored to the basal body via its transmembrane part, the needle protrudes from the outer membrane as a long filament of 50 nm length and is composed of the single PrgI protein (Kimbrough & Miller, 2000). At the extremity of the needle, a complex of three proteins (SipB, SipC, SipD), known as the translocon, is able to form a pore in the eukaryotic target cell, allowing the secretion of effector proteins (Mattei *et al.*, 2011). SipB, SipC and SipD proteins (also referred to Ssp proteins) share homology with other translocon proteins such as IpaB, IpaC and IpaD proteins of *Shigella* (Hueck, 1998). SipD has a hydrophilic domain and interacts directly with the PrgI needle protein (Rathinavelan *et al.*, 2011) while the two other proteins of the translocon (SipB and SipC) have a hydrophobic domain and are therefore directly involved in the pore formation (Hayward *et al.*, 2000; Miki *et al.*, 2004). Particularly, it has been shown that the interaction of SipB with cellular cholesterol is necessary for effector translocation (Hayward *et*

al., 2005). Finally, the translocation of T3SS-1 effector proteins requires an exportation apparatus located at the inner membrane level and made of highly conserved proteins among T3SSs (SpaP, SpaQ, SpaR, SpaS, InvA, InvC and OrgB). The unfolded effectors in association with their chaperone are targeted to the exportation apparatus and the ATPase InvC produces the energy necessary to the transport of these proteins through the needle (Akeda & Galan, 2004). The appropriate hierarchy in the secretion process is established by a cytoplasmic sorting platform composed of SpaO, OrgA and OrgB (Lara-Tejero *et al.*, 2011). This platform sequentially loads the secreted proteins by interacting with their chaperones to ensure a specific order of secretion and optimize host cell invasion.



Adapted from Kimbrough and Miller, 2002.
A. Localization of the T3SS-1 structure proteins. **B.** Schematic representation of SPI-1 island encoding the T3SS-1 proteins. **C**. Functional classification of SPI-1-encoded proteins.

Fig. 3. Structure and organization of *Salmonella* T3SS-1.

2.2 Regulation of T3SS-1 expression

During *Salmonella* infection, a crucial step is the crossing of the intestinal barrier. The host environment encountered by the bacteria, and more particularly the small intestine environment, plays a major role in the invasion as it controls expression of the secretion apparatus. Coordination of T3SS-1 expression genes, almost all located on the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) is complex and well-timed. In response to different environmental stimuli, a sophisticated regulatory network controlling the expression of SPI-1 has been established (Figure 4). Our purpose here is not to set up the thorough state-of-the-art on all the regulators involved in *Salmonella* invasion, but to give a general overview of this system (for a review, see (Ellermeier & Slauch, 2007)).

SPI-1 contains 39 genes encoding structural T3SS-1 proteins (*inv/spa* and *prg* operon), translocon proteins (SipB, C, D), some effectors (SipA, SptP and AvrA), some chaperones (SicA, InvB, SicP) and finally four transcriptional regulators (HilA, hilC, HilD and InvF) (Figure 3B and C). Other genes encoding secreted effectors (*sopA, sopB, sopD, sopE, sopE2, slrP, sspH1, sspH2*) are located elsewhere on the chromosome.

HilA is central for SPI-1 transcriptional regulation. This protein activates directly the transcription of *prg*, *inv/spa* and *sip* operons, encoding structural components and some secreted effectors of T3SS-1 respectively. In addition, HilA induces the transcription of *invF*, encoding a transcriptional activator and targeting, among others, *sip* operon, *sopE* and *sopB* genes (Darwin & Miller, 1999). The sequential expression of HilA and InvF regulators allows a hierarchical regulation of invasion genes.

Then, a second crucial level of SPI-1 transcriptional regulation takes place through the regulation of HilA *via* a feed-forward loop, involving three homologous transcriptional regulators: HilC, HilD and RtsA. Each of them binds directly to the *hilA* promoter and is able to activate its own expression. In fact, HilC, HilD and probably RtsA, act as derepressors of *hilA* transcription by counteracting the silencing exerted by nucleoid-structuring proteins such as H-NS or Hha (Akbar *et al.*, 2003; Queiroz *et al.*, 2011). The reason why HilC, HilD and RtsA play such an important role in T3SS-1 expression through *hilA* regulation is that they are at the integration point of a lot of signals that control SPI-1 expression (Figure 4). In this regulatory circuit, it is currently admitted that HilD has a predominant role whereas HilC and RtsA simply act as signal amplifiers. However, it has also been shown that these three regulators are also directly implicated in the regulation of others invasion genes (Akbar *et al.*, 2003; Ellermeier & Slauch, 2004).

Moreover, besides these direct regulators, a great number of other *hilA* regulators, acting mainly through HilD, have been identified. Among them, two-component systems play a major role. They sense environmental conditions and allow the transmission of different signals which modulate T3SS-1 genes expression. Some are able to activate indirectly HilA expression such as BarA/SirA and OmpR/EnvZ, whereas others such as PhoP/PhoQ and PhoB/PhoR repress it. In fact, HilA expression can also be inhibited. HilE has been identified as a negative regulator of *hilA* transcription preventing HilD activity (Fahlen *et al.*, 2000; Baxter *et al.*, 2003). It has been suggested that the two-component systems PhoP/PhoQ and PhoB/PhoR act through HilE to regulate SPI-1 (Baxter & Jones, 2005).

As stated above, environmental signals play a major role in *Salmonella* invasion. Low oxygen tension, high osmolarity, high iron concentration, neutral pH are conditions found in the

ileum, known to be the preferential invasion site of *Salmonella*. Thus, as expected in these conditions, invasion genes are activated through *hilA* expression. In contrast, when *Salmonella* are located at unfavorable sites for invasion in the host organism, the presence of signals such as bile, secreted into the proximal small intestine or cationic peptides, known to exist in macrophages, inhibits T3SS-1 expression (Figure 4).

Although much has already been identified about the regulation of SPI-1, recently, it became more evident that mechanisms regulating this system are more complex than previously thought.

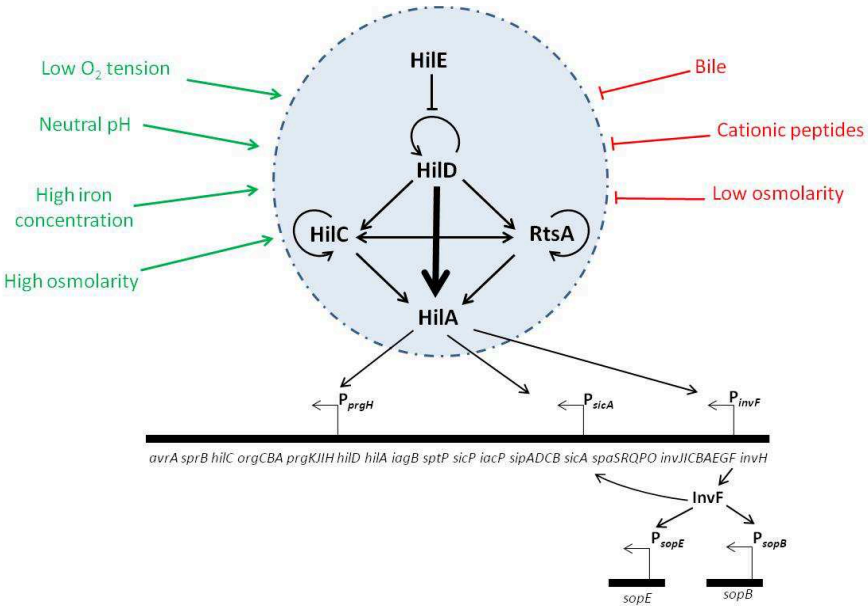


Fig. 4. Environmental and transcriptional regulation of SPI-1 encoded genes. HilA is the major regulator of SPI-1 and is itself regulated by other regulators such as HilC, HilD, RtsA and HilE. When *Salmonella* reach the small intestine, a low O_2 tension, a neutral pH, a high iron concentration and a high osmolarity activate SPI-1 expression. In contrast, the presence of bile or cationic peptides represses its expression.

2.3 Subversion of the cellular machinery during T3SS-1-dependent entry

Among the effectors that are translocated into host cell by the T3SS-1, six are essential to cell invasion (SipA, SipC, SopB, SopD, SopE, SopE2) while the other effectors contribute to a variety of post-invasion processes such as host cell survival and modulation of the inflammatory response (Patel & Galan, 2005). To trigger internalization into cells, effectors manipulate actin cytoskeleton either directly or indirectly. They also manipulate the delivery of vesicles to the site of bacterial entry to provide additional membrane and allow the extension and ruffling of the plasma membrane necessary to promote invasion. In later steps, membrane fission occurs to induce the sealing of the future *Salmonella*-containing vacuole (SCV) and actin filaments are depolymerized, enabling the host cell to recover its normal shape (Figure 5).

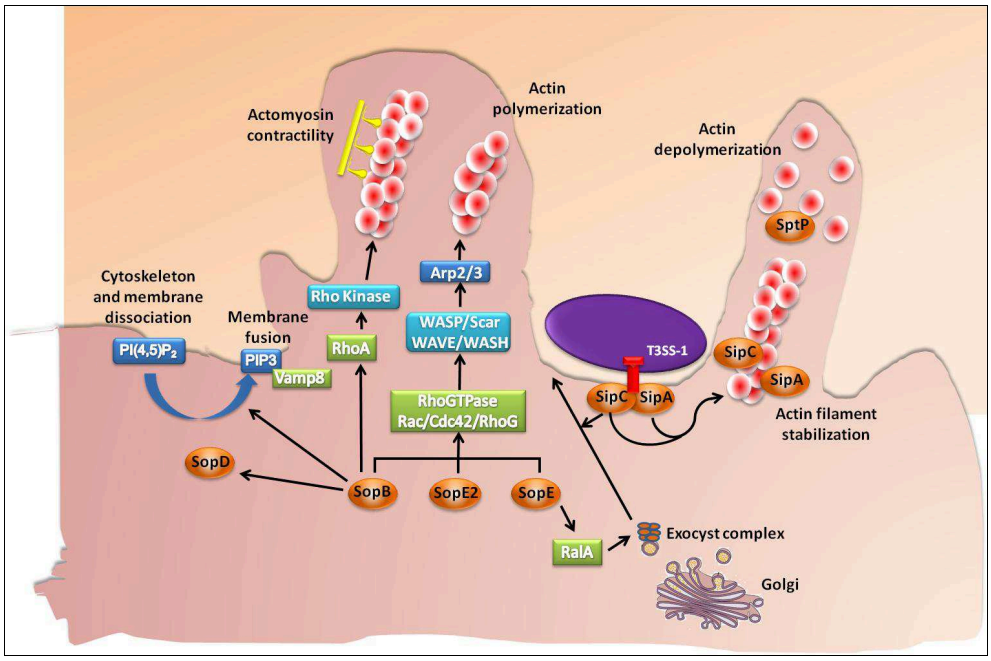


Fig. 5. Intracellular activities of the T3SS-1 effectors: SipA and SipC bind actin directly whereas SopE, SopE2 and SopB stimulate RhoGTPase activity. SipC and SopE also act in cooperation to recruit exocytic vesicles at the entry site. SopB plays diverse roles during invasion: it promotes actomyosin contractility and changes phosphoinositide concentrations to facilitate the dissociation between actin cytoskeleton and membrane at the entry site. SopB also probably triggers the delivery of vesicles to the bacterial entry site in a VAMP-8 dependent way and activate SopD which seems to contribute to the sealing and the formation of the SCV. The last effector SptP turns off the activity of RhoGTPases to allow the host cell to regain its initial shape.

2.3.1 Actin manipulation

Actin polymerization is an essential process induced by T3SS-1 effectors during entry. Some effectors stimulate actin rearrangements indirectly and two effectors, SipA and SipC, manipulate actin directly. SipA and SipC are localized at the eukaryotic plasma membrane during entry (Scherer *et al.*, 2000) but they are also translocated into the host cell cytoplasm (Hueck *et al.*, 1995; Kaniga *et al.*, 1995).

SipC, as part of the translocon, is required for T3SS-1 effector translocation and involved in actin nucleation and bundling. Due to its various functions, a 95% decrease in invasion is observed when *sipC* is deleted (Chang *et al.*, 2005). The C-terminal region of SipC (amino-acids A321-A409) encodes the effector translocation activity (Chang *et al.*, 2005) and its central region (amino-acids N201–S220) binds to actin and induces a rapid nucleation and elongation of actin filaments. More precisely the regions containing the amino acids from H221–M260 and L381–A409 bind to and bundle actin filaments *in vitro* (Myeni & Zhou,

2010). The bundling activity of SipC is essential for internalization as a *sipC* mutant lacking bundling activity is impaired in cell invasion. SipC dimerization / multimerization seems to be required for nucleation and a *sipC* mutant deficient for multimerization and actin nucleation failed to cause severe colitis in a mouse model (Chang *et al.*, 2007).

As SipC, SipA binds directly to actin (amino acids P446-R685) and modulates cytoskeleton dynamics in different ways (Galkin *et al.*, 2002; Higashide *et al.*, 2002). A *Salmonella* Typhimurium *sipA* mutant exhibits a 60-80% decrease in invasion compared to the wild-type strain (Perrett & Jepson, 2009), which can be correlated to the fact that SipA is a multifunctional effector. First, Zhou *et al.* (1999b) have observed that SipA reduces the critical concentration of G-actin in the cytosol required for polymerization. In addition, to facilitate polymerization, SipA also stabilizes actin filaments by displacing ADF / cofilin factor which stimulates actin depolymerization and by protecting F-actin from gelsolin severing (McGhie *et al.*, 2004). Moreover, SipA enhances actin cross-linking both by interacting with T-Plastin, a cellular bundling protein, and by enhancing SipC activity (Zhou *et al.*, 1999a; McGhie *et al.*, 2001). Interestingly, Perrett and Jepson have demonstrated that a *sipA* deletion induces a decrease in host cell invasion but without affecting the frequency of membrane ruffle formation (Perrett & Jepson, 2009). By visualizing the membrane ruffles in the absence of SipA, they have observed that SipA is required to ensure the spatial localization of actin rearrangement beneath invading *Salmonella* for efficient uptake of bacteria.

In contrast to SipA and SipC, SopB, SopE and SopE2 exert their activity into host cells by inducing actin polymerization in an indirect way. They activate RhoGTPases which are key cellular effectors that regulate actin cytoskeleton remodeling (Patel & Galan, 2005).

During *Salmonella* T3SS-1 dependent invasion, SopE and SopE2 effectors mimic GEF activity to activate RhoGTPases. Their activation induces actin polymerization by stimulating downstream cellular proteins such as N-WASP, WAVE and WASH which activate the Arp2/3 nucleator complex (Buchwald *et al.*, 2002; Schlumberger *et al.*, 2003). SopE specifically targets the Rho GTPases Rac and Cdc42 *in vitro* whereas SopE2 only activates Cdc42 (Friebel *et al.*, 2001). The role of Rac in *Salmonella* T3SS-1-dependent entry is well characterized but the role of Cdc42 is controversial. Criss *et al.* (2001) have demonstrated by using dominant negative forms and by pull-down assays that, in contrast to non-polarized cells, Cdc42 is not required and not activated during invasion of MCDK polarized epithelial cells. In the same way, Patel and Galan have observed that the depletion of Cdc42 by RNA interference (RNAi) in COS-2 and Henle-407 had no effect on membrane ruffling and efficient uptake (Patel & Galan, 2006). In contrast, a recent genome-scale RNAi screening in HeLA cells indicated that Cdc42 depletion induced a 70% decrease in invasion, suggesting that it is required for the T3SS-1-dependent invasion process (Misselwitz *et al.*, 2011). All together, it is difficult to conclude about the involvement of Cdc42 during T3SS-1-dependent entry.

Salmonella mutant strains lacking both *sopE* and *sopE2* are still able to invade cells in a SopB dependent way (Zhou *et al.*, 2001). SopB is an inositol phosphatase which shares homology with eukaryotic phopho-inositol (PI) phosphatases (Norris *et al.*, 1998). Like SopE and SopE2, SopB targets a GTPase from the Rho family, RhoG, but in an indirect manner since SopB activates the GEF protein that allows RhoG activation (Patel & Galan, 2006). Once

activated, RhoG induces actin polymerization at the entry site presumably by stimulating the Arp2/3 complex (Patel & Galan, 2006). A *sopB* deletion in *S*. Typhimurium induces a 50% decrease in invasion. But when *sopB* deletion is coupled with a *sopE* deletion, *Salmonella* uptake is drastically impaired (Zhou *et al.*, 2001), demonstrating that all the T3SS-1 effectors work in concert to trigger entry.

Recently, SopB was also shown to manipulate actomyosin contractility to mediate invasion. SopB recruits myosin II by activating RhoA and its Rho kinase downstream effector. In contrast to the process leading to actin polymerization during *Salmonella* entry, myosin II recruitment at the entry site is independent on Arp2/3 nucleator activity (Hanisch *et al.*, 2011).

In addition, different cellular proteins are involved during the T3SS-1 dependent entry of *Salmonella* without the identification of the bacterial effector responsible of this effect. This includes the focal adhesion kinase FAK, the Abelson tyrosine kinase Abl, and Shank3 (Shi & Casanova, 2006; Huett *et al.*, 2009; Ly & Casanova, 2009). During *Salmonella* uptake, FAK acts as a scaffolding protein, but not as a protein tyrosine kinase and its interaction with p130Cas is involved in actin reorganization and membrane ruffle formation (Shi & Casanova, 2006). But how *Salmonella* can nucleate assembly of focal adhesion-like complexes is still unclear and further research is needed to determine if this mechanism involves secreted bacterial effector proteins, other transmembrane host proteins, or both. Another scaffolding protein Shank3 also seems to regulate actin rearrangement during entry but the mechanisms leading to its recruitment and its activation have to be elucidated (Huett *et al.*, 2009). As the experiments were performed using HeLa cells which are highly permissive to the T3SS-1-dependent entry and with bacterial culture conditions that allow T3SS-1 expression, it is more probable that the *Salmonella* entry process inducing Shank3 recruitment is dependent on the T3SS-1. However, a T3SS-1-independent invasion process could also be involved because no mutant deficient for T3SS-1 expression was used as a control to analyze the involvement of Shank3.

Abelson tyrosine kinase Abl is also involved during *Salmonella* invasion as well as its effectors Abi1, a member of the WAVE2 complex, and CrkII (Ly & Casanova, 2009). Abi1 could thus enhance actin polymerization at the entry site but the role of CrkII during the invasion process remains poorly characterized.

2.3.2 Subversion of exocytosis machinery and membrane fusion during entry

Recent data indicate that membrane fusion is a major process involved during entry, suggesting that membrane ruffling requires the addition of intracellular membrane. A study focusing on the subversion of the host exocyst complex during *Salmonella* entry has showed cooperation between SipC and SopE (Nichols & Casanova, 2010). The exocyst is an octomeric complex (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84) involved in vesicular trafficking which directs post-Golgi vesicules at specific site on the plasma membrane prior to their fusion. Nichols and Casanova have demonstrated that the mature exocyst complex is recruited at the entry site through an interaction between its subunit Exo70 and SipC. A depletion of exo70 or Sec5, another component of the exocyst complex, impairs *S*. Typhimurium invasion. Moreover, they have shown that SopE activates the Ras-related protein RalA, a small GTPase required for exocyst complex assembly (Nichols

& Casanova, 2010). It appears that SopE and SipC effectors manipulate the host exocyst to bring new membrane at the entry site in order to allow the formation of membrane ruffles and internalization.

SopB is also involved in this membrane fusion process through its inositol phosphatase activity. Dai *et al.* (2007) have shown that SopB-generated PI3P at the entry site leads to the recruitment of VAMP8, a host V-SNARE protein that mediates fusion between early and late endosomes. Moreover, depletion of VAMP8 by RNAi induces a decrease in invasion rate of a wild-type *S.* Typhimurium strain which is equivalent to that obtained with a *sopB* mutant. Thus, it seems that SopB promotes invasion by manipulating eukaryotic vesicular trafficking probably to induce fusion of intracellular vesicles to the cell membrane at the entry site.

How these events of vesicle-membrane fusion interact with actin cytoskeleton rearrangements to trigger entry has not been investigated yet. These different processes may synergize to induce internalization since actin dynamics is closely related to the metabolism of phosphoinosides (Honda *et al.*, 1999; Sechi & Wehland, 2000). However, VAMP8 which seems to be a marker of membrane fusion involved during *S.* Typhimurium invasion does not co-localize with F-actin during entry (Dai *et al.*, 2007). In addition, it could be interesting to better characterize the role of the cellular factor IQGAP1 which is required for *Salmonella* uptake and acts following an interaction with actin and the RhoGTPases Rac1 and Cdc42 (Brown *et al.*, 2007). Indeed, IQGAP1 is known to regulate actin architecture and interestingly, it also seems to act as a regulator of exocytosis by interacting with Exo70 (Rittmeyer *et al.*, 2008). IQGAP1 could thus be one of the missing links between actin rearrangement and membrane fusion during *Salmonella* entry. Further studies could overcome this issue.

2.3.3 Phagosome closure and restoration of the host cell normal shape

As described above, inositol phosphatase activity of SopB drives to changes in cellular phosphoinosite concentrations at the bacteria/cell contact. In addition to generate PI3P at the entry site, translocation of SopB into host cells also induces $PI(4,5)P_2$ hydrolysis, which leads to an almost complete absence of $PI(4,5)P_2$ at the membrane invagination regions (Terebiznik *et al.*, 2002). By reducing the local concentration of $PI(4,5)P_2$, SopB destabilizes cytoskeleton-plasma membrane interactions, thus reducing the rigidity of the membrane and promoting invasion by facilitating the fission and the sealing of the future *Salmonella*-containing vacuole. In addition to SopB, SopD also contributes to membrane fission. Boonyom *et al.* have demonstrated that a *sopD* deletion, like the *sopB* mutant, leads to a decrease in membrane fission during invasion and that SopD is recruited at the bacterial invasion site dependently on the phosphatase activity of SopB (Bakowski *et al.*, 2007). Thus, SopD seems to cooperate with SopB and contribute to *Salmonella* uptake by facilitating membrane fission at the entry site leading to the formation of the SCV (Bakowski *et al.*, 2007).

Following the formation of intense membrane ruffling and internalization, the eukaryotic cell regains its normal shape, inducing the closure of the vacuole of endocytosis containing the bacteria. The restoration of actin cytoskeleton is promoted by the effector SptP, a tyrosine phosphatase which inactivates the RhoGTPases Rac-1 and Cdc42 by stimulating their intrinsic GTPase activity (Fu & Galan, 1998; Fu & Galan, 1999). The N- terminal region of SptP interacts with Rac-1 and Cdc42 and a structural study of SptP indicates that this effector mimics the

activity of host cell GAPs factors (Stebbins & Galan, 2000). Interestingly, SptP is regulated by two different mechanisms in order to delay its activity in host cell compared to that of SopE or SipA. A microscopy analysis revealed that SipA is injected earlier than SptP in the host cytoplasm, which would imply that SipA has a higher affinity for the exportation apparatus of the T3SS-1 than SptP (Winnen *et al.*, 2008). Moreover, SptP degradation by the host cell proteasome occurs later than SopE degradation (Kubori & Galan, 2003).

2.4 T3SS-1 contribution to *Salmonella* pathogenesis

The T3SS-1 is the main invasion factor of *Salmonella in vitro*. Nevertheless, its contribution to pathogenesis depends on the model used. *In vivo* studies with *S.* Dublin and *S.* Typhimurium serotypes have demonstrated that the T3SS-1 is essential for intestinal colonization and is required to induce enterocolitis in bovine, rabbit and murine models (Wallis & Galyov, 2000). In contrast, recent studies demonstrate that different serotypes of *Salmonella* lacking T3SS-1 still have the ability to invade *in vitro* cells of diverse origins and can be pathogenic in different *in vivo* infection models (Aiastui *et al.*, 2010; Rosselin *et al.*, 2011). In addition, it was shown that the T3SS-1 is not required for *Salmonella* internalization into a 3-Dimensional intestinal epithelium (Radtke *et al.*, 2010). Moreover, a SPI-1 mutant of *S.* Gallinarum exhibits a reduced invasiveness into avian cells but is fully virulent in adult chicken (Jones *et al.*, 2001). In *S.* Enteritidis and *S.* Typhimurium, the T3SS-1 is not essential during systemic infection of one week-old chicken or BalB/c mouse nor during the intestinal colonization of rabbit ileal loops (Coombes *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007; Karasova *et al.*, 2010). Moreover, *S.* Senftenberg strains lacking SPI-1 are isolated from human clinical cases, suggesting that the T3SS-1 is dispensable by this serotype for the establishment of infection in humans (Hu *et al.*, 2008).

Taken together, these results indicate that T3SS-1- independent invasion mechanisms also play an important role in *Salmonella* infection and pathogenesis.

3. Invasion mechanisms independent of the T3SS-1

A *Salmonella* mutant, unable to express its T3SS-1 is still able to invade numerous cell lines and cell types and is shown to induce both intense and local membrane rearrangements (Rosselin et al., 2011). However, to date, little is known about the entry factors mediating these T3SS-1 independent invasion mechanisms. Here, we describe and sum up the state-of-art regarding these new invasion systems. Rck, PagN and HlyE are the three invasins identified as involved in *Salmonella* uptake. Moreover, Rosselin *et al*. (2011) have described that others unknown invasion factors exist although they are still not identified.

3.1 The Rck invasin

Among invasins that play a role in *Salmonella* invasion in a T3SS-1-independent way, Rck is clearly the best characterized. Rck is an 17kDa outer membrane protein (OMP) encoded by the large virulence plasmid of *S.* Enteritidis and *S.* Typhimurium (Heffernan *et al.*, 1992; Rotger & Casadesus, 1999). In addition to its ability to induce adhesion to and invasion of eukaryotic cells, Rck confers a high resistance level to complement killing by preventing the formation of the membrane attack complex (Heffernan *et al.*, 1992; Cirillo *et al.*, 1996; Rosselin *et al.*, 2010).

3.1.1 Rck structure

Rck is a member of an outer membrane protein family named "Ail/Lom family". This family consists of five members (Rck, Ail, Lom, OmpX and PagC) which are predicted to have eight transmembrane beta-sheets and four cell surface-exposed loops. Even if these proteins present a similar conformation, they have different functions. Rck and Ail (encoded by a chromosomal gene of *Yersinia Enterocolitica*) share the ability to promote serum resistance and epithelial cell invasion. These proteins do not exhibit homologous regions that could be related to these two identical roles. In Ail, the cell invasion property is associated with loop2 whereas loop3 and more precisely the region from the amino acids G113 to V159 was shown to be the minimal region of Rck required and sufficient for cell adhesion and invasion (Miller *et al.*, 2001; Rosselin *et al.*, 2010).

Another member of this family involved in virulence is PagC which is encoded by a *phoP*-regulated gene on the *Salmonella* chromosome and plays a role in intracellular macrophage survival in *Salmonella* (Miller *et al.*, 1989; Gunn *et al.*, 1995). Others members of this family are OmpX of *Enterobacter cloacae* (Mecsas *et al.*, 1995) and Lom, a protein expressed by bacteriophage λ from lysogenic *E. coli* (Reeve & Shaw, 1979) but none of them have known virulence-associated phenotype.

3.1.2 Rck regulation

A genetic screening performed in *S.* Typhimurium to identify genes regulated by SdiA (*s*uppressor of *d*ivision *i*nhibition), a transcriptional regulator of quorum sensing, has suggested that *rck* belongs to a putative operon called the "*rck* operon" whose expression is activated by SdiA in an Acyl Homoserine Lactone (AHLs)-dependent manner (Figure 6) (Ahmer *et al.*, 1998; Michael *et al.*, 2001).

The *rck* operon contains 6 open reading frames: *pefI*, *srgD*, *srgA*, *srgB*, *rck* and *srgC* (Figure 6). Two genes in this operon, *pefI* (*p*lasmid *e*ncoded *f*imbriae) and *srgA* (*s*diA-*r*egulated *g*ene), affect the expression and function of the *pef* operon located upstream of the *rck* operon and involved in the biosynthesis of the Pef fimbriae. *pefI* encodes a transcriptional regulator of the *pef* operon, and SrgA is a DsbA paralog that efficiently oxidizes the disulfide bond of PefA, the major structural subunit of the Pef fimbriae (Bouwman *et al.*, 2003). These fimbriae are involved in biofilm formation, adhesion to murine small intestine and fluid accumulation in the infant mouse (Baumler *et al.*, 1996; Ledeboer *et al.*, 2006). Also localized on the *rck* operon, *srgD* encodes a putative transcriptional regulator. Recently, it has been shown that SrgD acts in cooperation with PefI to induce a synergistic negative regulation of flagellar genes expression (Wozniak *et al.*, 2009; Wallar *et al.*, 2011). The remaining genes on the *rck* operon have unknown functions and encode a putative outer membrane protein, SrgB, and a putative transcriptional regulator, SrgC.

Another locus regulated by SdiA-AHLs has been identified during screening. This chromosomal locus encodes a single gene named *srgE* (STM1554) (Ahmer *et al.*, 1998). No function for SrgE is described but a computational approach has suggested that SrgE is secreted by the T3SS-1 (Samudrala *et al.*, 2009) (Figure 6).

As *E. coli* and *Klebsiella*, *Salmonella* lack an AHL synthase and thus do not produce AHLs. However, SdiA can detect and bind AHLs produced by others bacterial species (Michael *et al.*, 2001). SdiA is a LuxR homologue and has two functional domains. The C-terminal

region contains a predicted helix-turn-helix motif implicated in DNA binding and a N-terminal domain called "autoinducer domain" that interacts with AHLs. By NMR analysis, Yao *et al.* (2007) have shown that a direct interaction between SdiA and AHLs is required for SdiA folding and function.

Temperature also affects *rck* operon expression. At temperature below 30°C, the transcription of *rck* operon is repressed, while *srgE* is repressed only at temperature below 22°C (Smith & Ahmer, 2003)(Figure 6). As SdiA expression is not temperature regulated, another level of *rck* operon regulation remains to be identified.

In addition, a transcriptomic study has shown that Hha and its paralogue YdgH could be involved in the regulation of the *rck* operon (Vivero *et al.*, 2008).

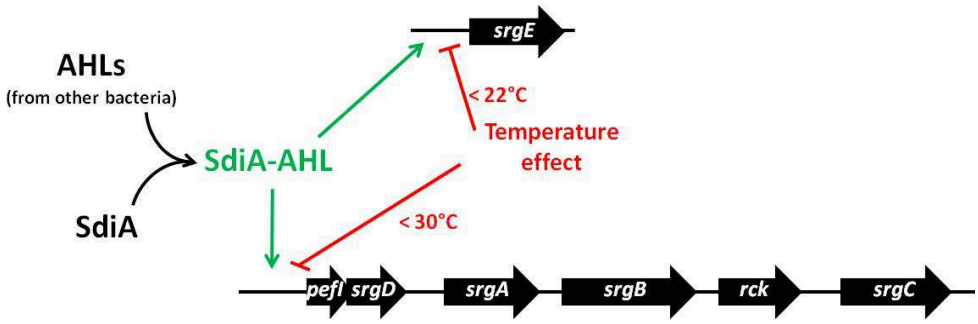


Fig. 6. Regulation of *rck* operon expression. When bound to AHLs, SdiA activates the expression of *rck* operon and *srgE*. Under temperatures that are lower than 30°C or 22°C, the expression of *rck* operon and *srgE* is inhibited, respectively.

3.1.3 Rck-mediated entry mechanism

When a *rck* mutant is grown under swarming conditions known to induce SdiA expression, a 2-3 fold decrease in epithelial cell invasion has been observed compared to the wild-type strain (Rosselin *et al.*, 2010). Moreover, in standard culture conditions, Rck overexpression leads to an increase in invasion.

By using both an initially non-invasive *E. coli* strain overexpressing Rck and latex beads coated with the minimal region of Rck inducing invasion (G113-V159), it was demonstrated that Rck alone is able to induce entry by a receptor-mediated process. This mechanism promotes local actin remodelling and weak and closely adherent membrane extensions (Rosselin *et al.*, 2010). *Salmonella* can thus enter cells through two distinct mechanisms: the Trigger mechanism mediated by its T3SS-1 apparatus and a Zipper mechanism induced by Rck. A model of this Zipper entry process is shown in figure 7. Following an interaction between Rck and its unknown cellular receptor, it was shown by using specific drugs and a dominant negative form that the class I PI3-kinase made of the p85-p110 heterodimer is required for Rck mediated entry. Moreover, Rck induces an increase in the interactions between p85 and phosphotyrosine residues, leading to the class I PI3-Kinase activation. Pharmacological approaches or Akt knockout cells also demonstrate that Akt is necessary to Rck-mediated internalization. Probably by binding to $PI(3,4,5)P_3$, Akt is recruited at the entry site and activated in a PI3-Kinase dependent way (Mijouin *et al.*, 2012).

The GTPase Rho is not involved during the Rck entry process but the use of dominant negatives demonstrates that Rac1 and Cdc42 are required (Rosselin *et al.*, 2010). Moreover, Rac1 is recruited at the entry site and Rck induces an increase in the level of active Rac1, demonstrating that it activates this GTPase (Rosselin *et al.*, 2010; Mijouin *et al.*, 2012). Rac1 activation occurs downstream on the PI-3kinase activity. Finally, overexpression of inhibitory constructs has shown that actin polymerization is dependent on the Arp2/3 nucleator complex during Rck-mediated entry (Rosselin *et al.*, 2010).

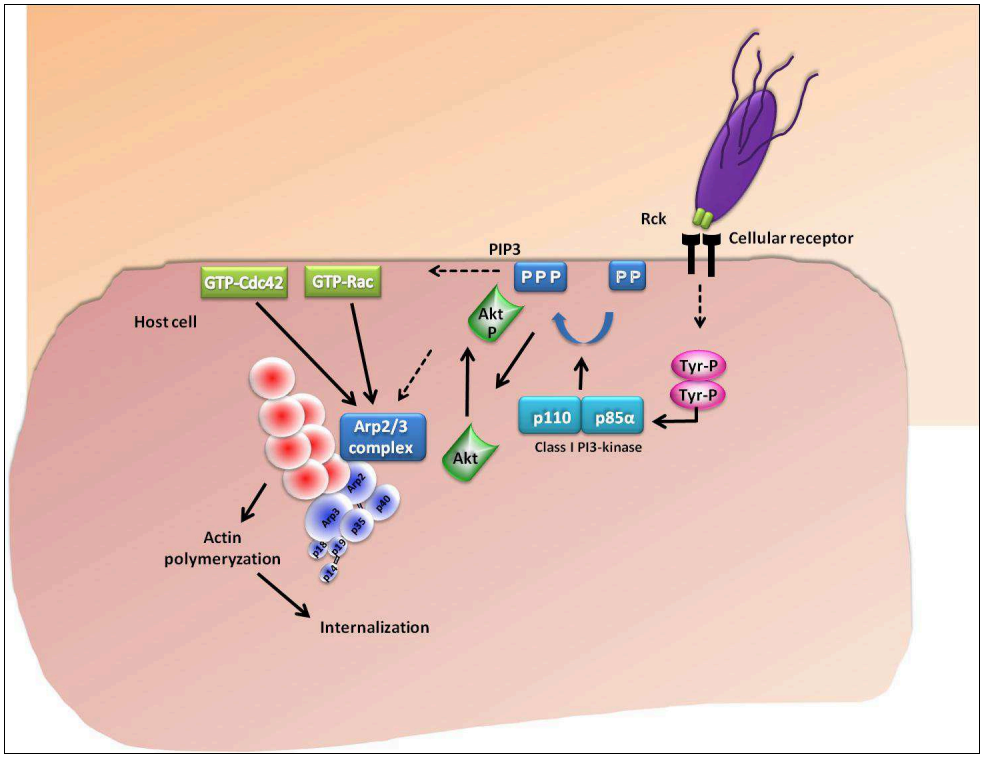


Fig. 7. Model of the cellular signaling pathway induces by Rck and leading to invasion. This Zipper entry process involves different cellular proteins: Class I PI3-Kinase, Akt, Rac and Cdc42, the Arp2/3 complex and actin. Dotted arrows: possible signalling events and/or interactions.

3.1.4 Rck contribution to *Salmonella* pathogenesis

The role of Rck in *Salmonella* invasion is clearly demonstrated *in vitro*, but its role in *Salmonella* pathogenesis is poorly understood. Indeed, *in vivo* conditions allowing *rck* expression are unclear. The fact that Rck is regulated by SdiA, a quorum sensing regulator suggests an intestinal role of this invasin (Ahmer *et al.*, 1998). However, the mechanisms leading to SdiA activation and *rck* expression are not well characterized. SdiA activation has been investigated in different hosts including rabbit, guinea pig, cow, turtle, mouse, pig and chicken but no activated-SdiA has been detected in the gastro-intestinal tract of

these animals, except for turtles which were found to be co-infected with AHLs-producing *Aeromonas hydrophila* (Smith *et al*., 2008). Another work has demonstrated that SdiA is activated in mice previously infected with *Yersinia enterocolitica*, which is able to synthesize AHLs (Dyszel *et al*., 2010). However, in these conditions, SdiA activation does not confer a fitness advantage for *Salmonella* intestinal colonization in comparison to a *sdiA* mutant (Dyszel *et al*., 2010). These results suggest that even if SdiA activation is achieved when AHL-producing strains colonize the gastrointestinal tract, it is not always sufficient to induce the expression of its regulon including *rck*. To assess the role of SdiA and its regulon during intestinal infection, Dyszel *et al.* (2010) have constructed a *Salmonella* strain able to produce AHLs. After co-infection of mice with the AHL-producing *Salmonella* strain and a *sdiA* mutant, it was shown that the constant activation of SdiA confers a selective advantage to *Salmonella*. Moreover, a loss of this selective advantage was observed when all individual SdiA-regulated genes were deleted, including *rck*, suggesting a role during intestinal colonization. Nevertheless, an *in vivo* model allowing a physiological activation of SdiA would be needed to assess the contribution of Rck to intestinal infection.

In addition, as *rck* is also regulated by an unidentified SdiA-independent system (Smith *et al*., 2008), it is conceivable that Rck invasion mechanism is not restricted to the gastrointestinal tract. Considering that Rck is also involved in the resistance to complement killing, a systemic function of Rck is possible.

3.2 The PagN invasin

In addition to the T3SS-1 and Rck, the PagN outer membrane protein has also been identified as being involved in *Salmonella* invasion (Lambert & Smith, 2008). *pagN*, is localized on the centisome 7 genomic island and is widely distributed among *Salmonella enterica* serotypes (Folkesson *et al*., 1999). The *pagN* ORF was originally identified during a Tn*phoA* random-insertion screening in *S.* Typhimurium performed to discover PhoP-activated genes (Belden & Miller, 1994).

3.2.1 PagN structure

PagN shares similarity to both the Tia and Hek invasins of *E. coli*, and presents 39% and 42% identity in amino acids with these two invasins, respectively. Tia and Hek are predicted to have eight transmembrane regions, four long exposed extracellular loops and three short periplasmic turns (Mammarappallil & Elsinghorst, 2000; Fagan *et al*., 2008). Thus, PagN probably adopts a similar conformation as that of Hek and Tia.

3.2.2 PagN regulation

The *pagN* (*phoP*-activated gene) gene is *phoP*-regulated. The PhoP/PhoQ system is a two-component transcriptional regulatory system which modulates transcription of a multitude of virulence genes in *Salmonella*. This regulatory system is composed of the PhoQ sensor kinase (located at the membrane) and the PhoP response regulator. In response to specific stimuli such as acidified macrophage phagosome environment or low Mg^{2+} concentration, PhoQ is auto-phosphorylated and transfers its phosphates to the cytoplasmic DNA-binding protein PhoP, regulating specific genes.

3.2.3 PagN-mediated entry mechanism

Lambert & Smith (2008) have demonstrated that *pagN* deletion in *S.* Typhimurium leads to a 3-fold decrease in invasion of enterocytes without altering cell adhesion. At the cellular level, the PagN-mediated entry process is poorly characterized. It was only shown that actin polymerization is required during invasion (Lambert & Smith, 2008) and that PagN is able to interact with extracellular heparin proteoglycans (Lambert & Smith, 2009). However, proteoglycans cannot transduce a signaling cascade so it is probable that they act as co-receptors for invasion and not as the receptor itself. Moreover, although an interaction between PagN and heparin has been suggested, no clear heparin-binding motif was detected. Moreover, all PagN loops are required for invasion in epithelial cells (Lambert & Smith, 2009).

3.2.4 PagN contribution to *Salmonella* pathogenesis

PagN is required for survival in BALB/c mice (Heithoff *et al.*, 1999) and a *pagN* mutant is less competitive to colonize the spleen of mice compared to its parental strain (Conner *et al.*, 1998). However, the role of PagN in *Salmonella* pathogenesis is still unclear. *pagN* is activated by PhoP and thus maximally expressed intracellularly, a condition in which the SPI-1 island encoding the T3SS-1 is downregulated (Conner *et al.*, 1998; Heithoff *et al.*, 1999; Eriksson *et al.*, 2003). Lambert & Smith (2008) thus postulate that bacteria which exit epithelial cells or macrophages have an optimal level of PagN expression, but have a low T3SS-1 expression and this might facilitate subsequent interactions with mammalian cells that the pathogen encounters after host cell destruction.

3.3 The HlyE invasin

The *hlyE* gene is localized on the *Salmonella* pathogenicity island SPI-18 and is expressed by serotypes associated with systemic infection in humans including *S.* Typhi and *S.* Paratyphi A (Fuentes *et al.*, 2008). The *hlyE* sequence shares more than 90% identity with that of *Escherichia coli* HlyE (ClyA) hemolysin.The HlyE protein is able to lyse epithelial cells when exported from bacterial cell via outer membrane vesicule release (Wai *et al.*, 2003). Recently, Fuentes *et al.* (2008) have demonstratred that HlyE contributes to epithelial cell invasion of *S.* Typhi. However, the cellular events leading to HlyE-mediated invasion have not been characterized.

In vivo studies have shown that HlyE contributes to colonization of mouse deep organs (Fuentes *et al.*, 2008). However, how HlyE participates in establishment of systemic infection of *Salmonella* is not well understood.

3.4 Non-identified invasion factors

Several studies have revealed that invasion systems in *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis are not restricted to the T3SS-1, Rck and PagN. Indeed, a strain which does not express *rck*, *pagN* and the T3SS-1 is still able to significantly invade fibroblasts, epithelial and endothelial cells (Rosselin *et al.*, 2011). Results obtained by Aiastui *et al.* (2010) and van Sorge *et al.* (2011) have reinforced the idea that non-identified invasion factors are involved during entry into these cell types since *Salmonella* strains that cannot express the

T3SS-1 still enter into epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts in a significant way. Moreover, invasion analyses of a 3-D intestinal epithelium by *S.* Typhimurium have also highlighted the fact that *Salmonella* possess non-characterized invasion factors (Radtke *et al.*, 2010).

Actin network remodeling and membrane rearrangements induced by these unknown factors have been visualized by confocal and electron microscopy as well as both Zipper-like and Trigger-like membrane alterations (Rosselin *et al.*, 2011). Identification of these factors is required to confirm these observations. It suggests that *Salmonella* express non-identified invasins able to mediate a Zipper process and factor(s) other than the T3SS-1 that induce Trigger-like invasion process(es). Type IV or type VI secretion systems are good candidates to induce Trigger-like cellular structures as they are able to translocate proteins directly into the host cell cytosol and as they are major virulence determinants involved in the pathogenesis of diverse Gram-negative bacteria (Oliveira *et al.*, 2006; Filloux *et al.*, 2008; Blondel *et al.*, 2010).

These observations thus open new avenues for identification of new invasion factors.

4. Conclusions and perspectives

Until recently, it was accepted that *Salmonella* enter cells only via its T3SS-1, which mediates a Trigger entry process. The T3SS-1-dependent invasion system has been widely described in the literature both at the bacterial and the cellular molecular levels. Moreover, the requirement of the T3SS-1 during intestinal and systemic infections has been demonstrated in some animals (Wallis & Galyov, 2000). However, an increasing number of reports describe that different serotypes of *Salmonella* can induce host infection without a functional T3SS-1 (Penheiter *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2001; Karasova *et al.*, 2010). This has been demonstrated with T3SS-1 mutants but also with clinical *Salmonella* strains (Hu *et al.*, 2008). However, the majority of *Salmonella* invasion system studies have focused on the T3SS-1 and we have little information concerning the T3SS-1-independent entry processes. Several invasins including PagN, Rck and HlyE have been recently identified in *Salmonella* and different investigations have provided evidences for other non-identified invasion factors (Aiastui *et al.*, 2010; Radtke *et al.*, 2010; Rosselin *et al.*, 2011; van Sorge *et al.*, 2011). In addition, the vast majority of this information has been obtained in a mouse model and with *S.* Typhimurium and much less data are available for other serotypes especially those adapted to pigs, cattle or poultry which represent major reservoirs of *Salmonella*. *Salmonella enterica* contain, over 2,500 diverse serotypes that have different host ranges, and cause diseases with severity ranging from subclinical colonization to serious systemic disease. Because the essential feature of the pathogenicity of *Salmonella* is its interaction with host cells, the identification of new entry routes could, in part, explain their different host ranges and disease symptoms.

The finding that *Salmonella* serotypes use different cell receptors and cell routes for host infection shows that the contribution of *Salmonella* genes to pathogenesis may be more complex than previously thought. These findings are changing our classical view of *Salmonella* pathogenicity. This new paradigm will modify the understanding of the mechanisms that lead to the different *Salmonella*-induced diseases and could allow us to revisit the host specificity bases.

5. References

Ahmer, B. M., van Reeuwijk, J., Timmers, C. D., Valentine, P. J. & Heffron, F. (1998). *Salmonella* typhimurium encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. *J Bacteriol*. Vol. 180, No. 5, pp. 1185-93.

Aiastui, A., Pucciarelli, M. G. & Garcia-del Portillo, F. (2010). *Salmonella* enterica serovar typhimurium invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. *Infect Immun*. Vol. 78, No. 6, pp. 2700-13.

Akbar, S., Schechter, L. M., Lostroh, C. P. & Lee, C. A. (2003). AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella* typhimurium. *Mol Microbiol*. Vol. 47, No. 3, pp. 715-28.

Akeda, Y. & Galan, J. E. (2004). Genetic analysis of the *Salmonella* enterica type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J Bacteriol*. Vol. 186, No. 8, pp. 2402-12.

Bakowski, M. A., Cirulis, J. T., Brown, N. F., Finlay, B. B. & Brumell, J. H. (2007). SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella* enterica serovar Typhimurium invasion. *Cell Microbiol*. Vol. 9, No. 12, pp. 2839-55.

Baumler, A. J., Tsolis, R. M., Bowe, F. A., Kusters, J. G., Hoffmann, S. & Heffron, F. (1996). The pef fimbrial operon of *Salmonella* typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun*. Vol. 64, No. 1, pp. 61-8.

Baxter, M. A., Fahlen, T. F., Wilson, R. L. & Jones, B. D. (2003). HilE interacts with HilD and negatively regulates hilA transcription and expression of the *Salmonella* enterica serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun*. Vol. 71, No. 3, pp. 1295-305.

Baxter, M. A. & Jones, B. D. (2005). The fimYZ genes regulate *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infect Immun*. Vol. 73, No. 3, pp. 1377-85.

Belden, W. J. & Miller, S. I. (1994). Further characterization of the PhoP regulon: identification of new PhoP-activated virulence loci. *Infect Immun*. Vol. 62, No. 11, pp. 5095-101.

Blondel, C. J., Yang, H. J., Castro, B., Chiang, S., Toro, C. S., Zaldivar, M., Contreras, I., Andrews-Polymenis, H. L. & Santiviago, C. A. (2010). Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by *Salmonella* enterica serotypes Gallinarum and Enteritidis. *PLoS One*. Vol. 5, No. 7, pp. e11724.

Boonyom, R., Karavolos, M.H., Bulmer, D.M. & Khan, C.M. (2010). /*Salmonella*/ pathogenicity island 1 (SPI-1) type III secretion of SopD involves N- and C-terminal signals and direct binding to the InvC ATPase. Microbiology. vol.156, No.6, pp 1805-14.

Bouwman, C. W., Kohli, M., Killoran, A., Touchie, G. A., Kadner, R. J. & Martin, N. L. (2003). Characterization of SrgA, a *Salmonella* enterica serovar Typhimurium virulence plasmid-encoded paralogue of the disulfide oxidoreductase DsbA, essential for biogenesis of plasmid-encoded fimbriae. *J Bacteriol*. Vol. 185, No. 3, pp. 991-1000.

Bretscher, M. S. (1991). Lipid flow in locomoting cells. *Science*. Vol. 251, No. 4991, pp. 317-8.

Brown, M. D., Bry, L., Li, Z. & Sacks, D. B. (2007). IQGAP1 regulates *Salmonella* invasion through interactions with actin, Rac1, and Cdc42. *J Biol Chem*. Vol. 282, No. 41, pp. 30265-72.

Buchwald, G., Friebel, A., Galan, J. E., Hardt, W. D., Wittinghofer, A. & Scheffzek, K. (2002). Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *EMBO J*. Vol. 21, No. 13, pp. 3286-95.

Chang, J., Chen, J. & Zhou, D. (2005). Delineation and characterization of the actin nucleation and effector translocation activities of *Salmonella* SipC. *Mol Microbiol*. Vol. 55, No. 5, pp. 1379-89.

Chang, J., Myeni, S. K., Lin, T. L., Wu, C. C., Staiger, C. J. & Zhou, D. (2007). SipC multimerization promotes actin nucleation and contributes to *Salmonella*-induced inflammation. *Mol Microbiol*. Vol. 66, No. 6, pp. 1548-56.

Cirillo, D. M., Heffernan, E. J., Wu, L., Harwood, J., Fierer, J. & Guiney, D. G. (1996). Identification of a domain in Rck, a product of the *Salmonella* typhimurium virulence plasmid, required for both serum resistance and cell invasion. *Infect Immun*. Vol. 64, No. 6, pp. 2019-23.

Conner, C. P., Heithoff, D. M. & Mahan, M. J. (1998). In vivo gene expression: contributions to infection, virulence, and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. Vol. 225, No., pp. 1-12.

Coombes, B. K., Wickham, M. E., Lowden, M. J., Brown, N. F. & Finlay, B. B. (2005). Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 102, No. 48, pp. 17460-5.

Cossart, P. & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*. Vol. 304, No. 5668, pp. 242-8.

Criss, A. K., Ahlgren, D. M., Jou, T. S., McCormick, B. A. & Casanova, J. E. (2001). The GTPase Rac1 selectively regulates *Salmonella* invasion at the apical plasma membrane of polarized epithelial cells. *J Cell Sci*. Vol. 114, No. Pt 7, pp. 1331-41.

Dai, S., Zhang, Y., Weimbs, T., Yaffe, M. B. & Zhou, D. (2007). Bacteria-generated PtdIns(3)P recruits VAMP8 to facilitate phagocytosis. *Traffic*. Vol. 8, No. 10, pp. 1365-74.

Darwin, K. H. & Miller, V. L. (1999). InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella* typhimurium. *J Bacteriol*. Vol. 181, No. 16, pp. 4949-54.

Dyszel, J. L., Smith, J. N., Lucas, D. E., Soares, J. A., Swearingen, M. C., Vross, M. A., Young, G. M. & Ahmer, B. M. (2010). *Salmonella* enterica serovar Typhimurium can detect acyl homoserine lactone production by Yersinia enterocolitica in mice. *J Bacteriol*. Vol. 192, No. 1, pp. 29-37.

Ellermeier, C. D. & Slauch, J. M. (2004). RtsA coordinately regulates DsbA and the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *J Bacteriol*. Vol. 186, No. 1, pp. 68-79.

Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2007). Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol*. Vol. 10, No. 1, pp. 24-9.

Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. & Hinton, J. C. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella* enterica. *Mol Microbiol*. Vol. 47, No. 1, pp. 103-18.

Fagan, R. P., Lambert, M. A. & Smith, S. G. (2008). The hek outer membrane protein of Escherichia coli strain RS218 binds to proteoglycan and utilizes a single extracellular loop for adherence, invasion, and autoaggregation. *Infect Immun*. Vol. 76, No. 3, pp. 1135-42.

Fahlen, T. F., Mathur, N. & Jones, B. D. (2000). Identification and characterization of mutants with increased expression of hilA, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella* typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Vol. 28, No. 1, pp. 25-35.

Filloux, A., Hachani, A. & Bleves, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*. Vol. 154, No. Pt 6, pp. 1570-83.

Folkesson, A., Advani, A., Sukupolvi, S., Pfeifer, J. D., Normark, S. & Lofdahl, S. (1999). Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. *Mol Microbiol*. Vol. 33, No. 3, pp. 612-22.

Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W. & Hardt, W. D. (2001). SopE and SopE2 from *Salmonella* typhimurium activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem*. Vol. 276, No. 36, pp. 34035-40.

Fu, Y. & Galan, J. E. (1998). The *Salmonella* typhimurium tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol*. Vol. 27, No. 2, pp. 359-68.

Fu, Y. & Galan, J. E. (1999). A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*. Vol. 401, No. 6750, pp. 293-7.

Fuentes, J. A., Villagra, N., Castillo-Ruiz, M. & Mora, G. C. (2008). The *Salmonella* Typhi hlyE gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to S. Typhimurium promotes deep organ infection in mice. *Res Microbiol*. Vol. 159, No. 4, pp. 279-87.

Galan, J. E. & Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*. Vol. 444, No. 7119, pp. 567-73.

Galkin, V. E., Orlova, A., VanLoock, M. S., Zhou, D., Galan, J. E. & Egelman, E. H. (2002). The bacterial protein SipA polymerizes G-actin and mimics muscle nebulin. *Nat Struct Biol*. Vol. 9, No. 7, pp. 518-21.

Garner, M. J., Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2002). The *Salmonella* pathogenicity island 1 secretion system directs cellular cholesterol redistribution during mammalian cell entry and intracellular trafficking. *Cell Microbiol*. Vol. 4, No. 3, pp. 153-65.

Groisman, E. A. & Ochman, H. (1993). Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella* typhimurium and Shigella flexneri. *EMBO J*. Vol. 12, No. 10, pp. 3779-87.

Gunn, J. S., Alpuche-Aranda, C. M., Loomis, W. P., Belden, W. J. & Miller, S. I. (1995). Characterization of the *Salmonella* typhimurium pagC/pagD chromosomal region. *J Bacteriol*. Vol. 177, No. 17, pp. 5040-7.

Hanisch, J., Kolm, R., Wozniczka, M., Bumann, D., Rottner, K. & Stradal, T. E. (2011). Activation of a RhoA/myosin II-dependent but Arp2/3 complex-independent pathway facilitates *Salmonella* invasion. *Cell Host Microbe*. Vol. 9, No. 4, pp. 273-85.

Hartwig, J. H. & Kwiatkowski, D. J. (1991). Actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*. Vol. 3, No. 1, pp. 87-97.

Hayward, R. D., Cain, R. J., McGhie, E. J., Phillips, N., Garner, M. J. & Koronakis, V. (2005). Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol Microbiol*. Vol. 56, No. 3, pp. 590-603.

Hayward, R. D., McGhie, E. J. & Koronakis, V. (2000). Membrane fusion activity of purified SipB, a *Salmonella* surface protein essential for mammalian cell invasion. *Mol Microbiol*. Vol. 37, No. 4, pp. 727-39.

Heffernan, E. J., Harwood, J., Fierer, J. & Guiney, D. (1992). The *Salmonella* typhimurium virulence plasmid complement resistance gene rck is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including pagC and ail. *J Bacteriol*. Vol. 174, No. 1, pp. 84-91.

Heithoff, D. M., Conner, C. P., Hentschel, U., Govantes, F., Hanna, P. C. & Mahan, M. J. (1999). Coordinate intracellular expression of *Salmonella* genes induced during infection. *J Bacteriol*. Vol. 181, No. 3, pp. 799-807.

Higashide, W., Dai, S., Hombs, V. P. & Zhou, D. (2002). Involvement of SipA in modulating actin dynamics during *Salmonella* invasion into cultured epithelial cells. *Cell Microbiol*. Vol. 4, No. 6, pp. 357-65.

Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A. & Kanaho, Y. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*. Vol. 99, No. 5, pp. 521-32.

Hu, Q., Coburn, B., Deng, W., Li, Y., Shi, X., Lan, Q., Wang, B., Coombes, B. K. & Finlay, B. B. (2008). *Salmonella* enterica serovar Senftenberg human clinical isolates lacking SPI-1. *J Clin Microbiol*. Vol. 46, No. 4, pp. 1330-6.

Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*. Vol. 62, No. 2, pp. 379-433.

Hueck, C. J., Hantman, M. J., Bajaj, V., Johnston, C., Lee, C. A. & Miller, S. I. (1995). *Salmonella* typhimurium secreted invasion determinants are homologous to Shigella Ipa proteins. *Mol Microbiol*. Vol. 18, No. 3, pp. 479-90.

Huett, A., Leong, J. M., Podolsky, D. K. & Xavier, R. J. (2009). The cytoskeletal scaffold Shank3 is recruited to pathogen-induced actin rearrangements. *Exp Cell Res*. Vol. 315, No. 12, pp. 2001-11.

Ibarra, J. A. & Steele-Mortimer, O. (2009). *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol*. Vol. 11, No. 11, pp. 1579-86.

Jones, M. A., Hulme, S. D., Barrow, P. A. & Wigley, P. (2007). The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in the chicken. *Avian Pathol*. Vol. 36, No. 3, pp. 199-203.

Jones, M. A., Wigley, P., Page, K. L., Hulme, S. D. & Barrow, P. A. (2001). *Salmonella* enterica serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. *Infect Immun*. Vol. 69, No. 9, pp. 5471-6.

Kaniga, K., Trollinger, D. & Galan, J. E. (1995). Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the inv and spa loci of *Salmonella* typhimurium that have homology to the Shigella IpaD and IpaA proteins. *J Bacteriol*. Vol. 177, No. 24, pp. 7078-85.

Karasova, D., Sebkova, A., Havlickova, H., Sisak, F., Volf, J., Faldyna, M., Ondrackova, P., Kummer, V. & Rychlik, I. (2010). Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. *BMC Microbiol*. Vol. 10, No., pp. 75.

Kimbrough, T. G. & Miller, S. I. (2000). Contribution of *Salmonella* typhimurium type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 97, No. 20, pp. 11008-13.

Kimbrough, T. G. & Miller, S. I. (2002). Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella* typhimurium. *Microbes Infect*. Vol. 4, No. 1, pp. 75-82.

Kubori, T. & Galan, J. E. (2003). Temporal regulation of *Salmonella* virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell*. Vol. 115, No. 3, pp. 333-42.

Lambert, M. A. & Smith, S. G. (2008). The PagN protein of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol*. Vol. 8, No., pp. 142.

Lambert, M. A. & Smith, S. G. (2009). The PagN protein mediates invasion via interaction with proteoglycan. *FEMS Microbiol Lett*. Vol. 297, No. 2, pp. 209-16.

Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X. & Galan, J. E. (2011). A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science*. Vol. 331, No. 6021, pp. 1188-91.

Ledeboer, N. A., Frye, J. G., McClelland, M. & Jones, B. D. (2006). *Salmonella* enterica serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infect Immun*. Vol. 74, No. 6, pp. 3156-69.

Ly, K. T. & Casanova, J. E. (2009). Abelson tyrosine kinase facilitates *Salmonella* enterica serovar Typhimurium entry into epithelial cells. *Infect Immun*. Vol. 77, No. 1, pp. 60-9.

Mammarappallil, J. G. & Elsinghorst, E. A. (2000). Epithelial cell adherence mediated by the enterotoxigenic Escherichia coli tia protein. *Infect Immun*. Vol. 68, No. 12, pp. 6595-601.

Mattei, P. J., Faudry, E., Job, V., Izore, T., Attree, I. & Dessen, A. (2011). Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J*. Vol. 278, No. 3, pp. 414-26.

McGhie, E. J., Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2001). Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J*. Vol. 20, No. 9, pp. 2131-9.

McGhie, E. J., Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2004). Control of actin turnover by a *Salmonella* invasion protein. *Mol Cell*. Vol. 13, No. 4, pp. 497-510.

Mecsas, J., Welch, R., Erickson, J. W. & Gross, C. A. (1995). Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in Escherichia coli that is homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of Yersinia enterocolitica. *J Bacteriol*. Vol. 177, No. 3, pp. 799-804.

Michael, B., Smith, J. N., Swift, S., Heffron, F. & Ahmer, B. M. (2001). SdiA of *Salmonella* enterica is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol*. Vol. 183, No. 19, pp. 5733-42.

Mijouin, L., Rosselin, M., Bottreau, E., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., Velge, P. & Wiedemann A (2012). /*Salmonella*/ Enteritidis Rck-mediated invasion requires activation of Rac1 dependent of Class I PI 3-kinases-Akt signalling pathway. /FASEB J./ vol.26, No.4, pp 1569-81.

Miki, T., Okada, N., Shimada, Y. & Danbara, H. (2004). Characterization of *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion-dependent hemolytic activity in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *Microb Pathog*. Vol. 37, No. 2, pp. 65-72.

Miller, S. I., Kukral, A. M. & Mekalanos, J. J. (1989). A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella* typhimurium virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 86, No. 13, pp. 5054-8.

Miller, V. L., Beer, K. B., Heusipp, G., Young, B. M. & Wachtel, M. R. (2001). Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol Microbiol*. Vol. 41, No. 5, pp. 1053-62.

Misselwitz, B., Dilling, S., Vonaesch, P., Sacher, R., Snijder, B., Schlumberger, M., Rout, S., Stark, M., von Mering, C., Pelkmans, L. & Hardt, W. D. (2011). RNAi screen of *Salmonella* invasion shows role of COPI in membrane targeting of cholesterol and Cdc42. *Mol Syst Biol*. Vol. 7, No., pp. 474.

Mullins, R. D., Heuser, J. A. & Pollard, T. D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 95, No. 11, pp. 6181-6.

Myeni, S. K. & Zhou, D. (2010). The C terminus of SipC binds and bundles F-actin to promote *Salmonella* invasion. *J Biol Chem*. Vol. 285, No. 18, pp. 13357-63.

Nichols, C. D. & Casanova, J. E. (2010). *Salmonella*-directed recruitment of new membrane to invasion foci via the host exocyst complex. *Curr Biol*. Vol. 20, No. 14, pp. 1316-20.

Norris, F. A., Wilson, M. P., Wallis, T. S., Galyov, E. E. & Majerus, P. W. (1998). SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* dublin, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 95, No. 24, pp. 14057-9.

Oliveira, M. J., Costa, A. C., Costa, A. M., Henriques, L., Suriano, G., Atherton, J. C., Machado, J. C., Carneiro, F., Seruca, R., Mareel, M., Leroy, A. & Figueiredo, C. (2006). Helicobacter pylori induces gastric epithelial cell invasion in a c-Met and type IV secretion system-dependent manner. *J Biol Chem*. Vol. 281, No. 46, pp. 34888-96.

Patel, J. C. & Galan, J. E. (2005). Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*--all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol*. Vol. 8, No. 1, pp. 10-5.

Patel, J. C. & Galan, J. E. (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol*. Vol. 175, No. 3, pp. 453-63.

Penheiter, K. L., Mathur, N., Giles, D., Fahlen, T. & Jones, B. D. (1997). Non-invasive *Salmonella* typhimurium mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. *Mol Microbiol*. Vol. 24, No. 4, pp. 697-709.

Perrett, C. A. & Jepson, M. A. (2009). Regulation of *Salmonella*-induced membrane ruffling by SipA differs in strains lacking other effectors. *Cell Microbiol*. Vol. 11, No. 3, pp. 475-87.

Pollard, T. D., Blanchoin, L. & Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. Vol. 29, No., pp. 545-76.

Queiroz, M. H., Madrid, C., Paytubi, S., Balsalobre, C. & Juarez, A. (2011). Integration Host Factor alleviates H-NS silencing of the *Salmonella* enterica serovar Typhimurium master regulator of SPI1, hilA. *Microbiology*. Vol. No.

Radtke, A. L., Wilson, J. W., Sarker, S. & Nickerson, C. A. (2010). Analysis of interactions of *Salmonella* type three secretion mutants with 3-D intestinal epithelial cells. *PLoS One*. Vol. 5, No. 12, pp. e15750.

Rathinavelan, T., Tang, C. & De Guzman, R. N. (2011). Characterization of the interaction between the *Salmonella* type III secretion system tip protein SipD and the needle protein PrgI by paramagnetic relaxation enhancement. *J Biol Chem*. Vol. 286, No. 6, pp. 4922-30.

Reeve, J. N. & Shaw, J. E. (1979). Lambda encodes an outer membrane protein: the lom gene. *Mol Gen Genet*. Vol. 172, No. 3, pp. 243-8.

Rittmeyer, E. N., Daniel, S., Hsu, S. C. & Osman, M. A. (2008). A dual role for IQGAP1 in regulating exocytosis. *J Cell Sci*. Vol. 121, No. Pt 3, pp. 391-403.

Rosselin, M., Abed, N., Virlogeux-Payant, I., Bottreau, E., Sizaret, P. Y., Velge, P. & Wiedemann, A. (2011). Heterogeneity of type III secretion system (T3SS)-1-independent entry mechanisms used by *Salmonella* Enteritidis to invade different cell types. *Microbiology*. Vol. 157, No. Pt 3, pp. 839-47.

Rosselin, M., Virlogeux-Payant, I., Roy, C., Bottreau, E., Sizaret, P. Y., Mijouin, L., Germon, P., Caron, E., Velge, P. & Wiedemann, A. (2010). Rck of *Salmonella* enterica, subspecies enterica serovar enteritidis, mediates zipper-like internalization. *Cell Res*. Vol. 20, No. 6, pp. 647-64.

Rotger, R. & Casadesus, J. (1999). The virulence plasmids of *Salmonella. Int Microbiol*. Vol. 2, No. 3, pp. 177-84.

Samudrala, R., Heffron, F. & McDermott, J. E. (2009). Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems. *PLoS Pathog*. Vol. 5, No. 4, pp. e1000375.

Scherer, C. A., Cooper, E. & Miller, S. I. (2000). The *Salmonella* type III secretion translocon protein SspC is inserted into the epithelial cell plasma membrane upon infection. *Mol Microbiol*. Vol. 37, No. 5, pp. 1133-45.

Schlumberger, M. C., Friebel, A., Buchwald, G., Scheffzek, K., Wittinghofer, A. & Hardt, W. D. (2003). Amino acids of the bacterial toxin SopE involved in G nucleotide exchange on Cdc42. *J Biol Chem*. Vol. 278, No. 29, pp. 27149-59.

Schraidt, O. & Marlovits, T. C. (2011). Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science*. Vol. 331, No. 6021, pp. 1192-5.

Schroeder, G. N. & Hilbi, H. (2008). Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev*. Vol. 21, No. 1, pp. 134-56.

Sechi, A. S. & Wehland, J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci*. Vol. 113 Pt 21, No., pp. 3685-95.

Shi, J. & Casanova, J. E. (2006). Invasion of host cells by *Salmonella* typhimurium requires focal adhesion kinase and p130Cas. *Mol Biol Cell*. Vol. 17, No. 11, pp. 4698-708.

Smith, J. N. & Ahmer, B. M. (2003). Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. *J Bacteriol*. Vol. 185, No. 4, pp. 1357-66.

Smith, J. N., Dyszel, J. L., Soares, J. A., Ellermeier, C. D., Altier, C., Lawhon, S. D., Adams, L. G., Konjufca, V., Curtiss, R., 3rd, Slauch, J. M. & Ahmer, B. M. (2008). SdiA, an N-acylhomoserine lactone receptor, becomes active during the transit of *Salmonella* enterica through the gastrointestinal tract of turtles. *PLoS One*. Vol. 3, No. 7, pp. e2826.

Stebbins, C. E. & Galan, J. E. (2000). Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the *Salmonella* effector SptP bound to Rac1. *Mol Cell*. Vol. 6, No. 6, pp. 1449-60.

Takeuchi, A. (1967). Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella* typhimurium. *Am J Pathol*. Vol. 50, No. 1, pp. 109-36.

Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J. & Kokkinidis, M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol*. Vol. 6, No. 9, pp. 805-16.

Terebiznik, M. R., Vieira, O. V., Marcus, S. L., Slade, A., Yip, C. M., Trimble, W. S., Meyer, T., Finlay, B. B. & Grinstein, S. (2002). Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella. Nat Cell Biol*. Vol. 4, No. 10, pp. 766-73.

van Sorge, A. J., Termote, J. U., de Vries, M. J., Boonstra, F. N., Stellingwerf, C. & Schalij-Delfos, N. E. (2011). The incidence of visual impairment due to retinopathy of prematurity (ROP) and concomitant disabilities in the Netherlands: a 30 year overview. *Br J Ophthalmol*. Vol. 95, No. 7, pp. 937-41.

Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A. J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W. T. & Fang, F. C. (1999). Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*. Vol. 401, No. 6755, pp. 804-8.

Velge, P., Cloeckaert, A. & Barrow, P. (2005). Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res*. Vol. 36, No. 3, pp. 267-88.

Vivero, A., Banos, R. C., Mariscotti, J. F., Oliveros, J. C., Garcia-del Portillo, F., Juarez, A. & Madrid, C. (2008). Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *J Bacteriol*. Vol. 190, No. 3, pp. 1152-6.

Wai, S. N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y. & Uhlin, B. E. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*. Vol. 115, No. 1, pp. 25-35.

Wallar, L. E., Bysice, A. M. & Coombes, B. K. (2011). The non-motile phenotype of *Salmonella* hha ydgT mutants is mediated through PefI-SrgD. *BMC Microbiol*. Vol. 11, No., pp. 141.

Wallis, T. S. & Galyov, E. E. (2000). Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol*. Vol. 36, No. 5, pp. 997-1005.

Watson, K. G. & Holden, D. W. (2010). Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella* in vivo. *Cell Microbiol*. Vol. 12, No. 10, pp. 1389-97.

Winnen, B., Schlumberger, M. C., Sturm, A., Schupbach, K., Siebenmann, S., Jenny, P. & Hardt, W. D. (2008). Hierarchical effector protein transport by the *Salmonella* Typhimurium SPI-1 type III secretion system. *PLoS One*. Vol. 3, No. 5, pp. e2178.

Wozniak, C. E., Lee, C. & Hughes, K. T. (2009). T-POP array identifies EcnR and PefI-SrgD as novel regulators of flagellar gene expression. *J Bacteriol*. Vol. 191, No. 5, pp. 1498-508.

Yao, Y., Dickerson, T. J., Hixon, M. S. & Dyson, H. J. (2007). NMR detection of adventitious xylose binding to the quorum-sensing protein SdiA of Escherichia coli. *Bioorg Med Chem Lett*. Vol. 17, No. 22, pp. 6202-5.

Zhou, D., Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B. & Galan, J. E. (2001). A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol*. Vol. 39, No. 2, pp. 248-59.

Zhou, D., Mooseker, M. S. & Galan, J. E. (1999a). An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 96, No. 18, pp. 10176-81.

Zhou, D., Mooseker, M. S. & Galan, J. E. (1999b). Role of the *S*. typhimurium actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science*. Vol. 283, No. 5410, pp. 2092-5.

Centre de recherche
Val de Loire

Fatémeh NAMDARI

Caractérisation fonctionnelle de BamB, protéine impliquée dans la biogénèse de la membrane externe et la virulence de *Salmonella*

Résumé

La protéine BamB est une lipoprotéine de membrane externe appartenant au complexe BAM (β-Barrel Assembly Machinery) et impliquée dans l'assemblage des protéines de membrane externe (PME), la sensibilité aux antibiotiques, le contrôle de l'expression des trois systèmes de sécrétion de type III (T3SS) et la virulence de *Salmonella*. Chez *E. coli,* au sein du complexe BAM, elle interagit directement avec la protéine BamA. De plus, chez cette bactérie, BamB présente une activité sérine-thréonine kinase. Afin de mieux caractériser le rôle de BamB, nos objectifs ont été d'étudier (1) l'impact de l'altération de l'interaction de BamB avec le complexe BAM ou de sa séquestration dans le cytoplasme sur l'ensemble des rôles décrits de BamB et (2) l'activité kinase putative de BamB chez *Salmonella*. Nos résultats montrent que certains rôles de BamB sont dissociables entre eux et que l'interaction BamA/BamB n'est pas requise pour le rôle de BamB dans le contrôle de l'expression des T3SS, la virulence de *Salmonella* et l'assemblage des PME à la membrane externe. Aucune activité kinase ni aucune activité cytoplasmique de la protéine n'a pu être formellement démontrée.

Mots-clés: *Salmonella*, BamB, complexe BAM, biogénèse de la membrane externe, protéines de membrane externe (PME), appareils de sécrétion de type III (T3SS), virulence.

Résumé en anglais

BamB is an outer-membrane lipoprotein belonging to the BAM complex (β-Barrel Assembly Machinery). In *Salmonella*, it is involved in the assembly of outer membrane proteins (OMP), in antibiotic susceptibility, in the transcriptional control of the three Type-Three-Secretion-Systems (T3SS) related genes and also in virulence. In *E. coli*, BamB interacts directly with the BamA protein. Moreover, BamB has been shown to have a serine-threonin kinase activity in this bacterium. In order to better characterize the roles of the BamB protein, our purposes were to study (1) the impact of the alteration of the interaction of BamB with the BAM complex or of its cytoplasmic sequestration and (2) its putative kinase activity in *Salmonella*. Our results show that some of the BamB roles are dissociable and that the BamA/BamB interaction is not required for T3SS expression, *Salmonella* virulence or OMP assembly in the outer membrane. Currently, neither a kinase activity nor a cytoplasmic activity has been clearly demonstrated for this protein.

Keywords: *Salmonella*, BamB, BAM complex, outer-membrane biogenesis, outer membrane proteins (OMP), Type III-secretion systems (T3SS), virulence.